



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

**GENOTOXICIDADE DE AGENTES CLAREDORES DE
ALTA CONCENTRAÇÃO – UM ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO**

JÉSSICA BRUNA CORRÊA LINDOSO

**MANAUS-AM
2017**

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

**GENOTOXICIDADE DE AGENTES CLAREDORES DE
ALTA CONCENTRAÇÃO – UM ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO**

JÉSSICA BRUNA CORRÊA LINDOSO

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

**ORIENTADORA: PROFa. DRa. NIKEILA CHACON DE OLIVEIRA
CONDE**

**MANAUS-AM
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

L747g Lindoso, Jessica Bruna Corrêa
Genotoxicidade de Agentes Clareadores de Alta Concentração /
Jessica Bruna Corrêa Lindoso. 2017
78 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Teste para Micronúcleos. 2. Genotoxicidade. 3. Clareamento
Dentário. 4. Ensaio Clínico. I. Conde, Nikeila Chacon de Oliveira II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

JÉSSICA BRUNA CORRÊA LINDOSO

**GENOTOXICIDADE DE AGENTES CLAREDORES DE
ALTA CONCENTRAÇÃO – UM ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO**

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

Manaus, 07 de abril de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Professora Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Professor Dra. Carina Toda, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Professor Dr. Erivan Clamentino Gualberto Jr, Membro
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Jorge Byron da Rocha Lindoso** e **Clineides Corrêa de Araújo Lindoso**, por terem sonhado e vivido esse sonho comigo. Por vocês e graças à vocês!

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida e pelas oportunidades concedidas.

Aos meus pais e irmão, **Jorge Byron Lindoso, Clineides Lindoso, Jonathan Byron Lindoso**, meus incentivadores e verdadeiras fontes de inspiração.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGO/UFAM)** pela possibilidade a mim conferida de concluir com êxito o mestrado nas dependências da Faculdade de Odontologia – FAO/UFAM e a **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** pela concessão de bolsa de estudo durante a realização do curso.

A todos os **professores do PPGO/UFAM e FAO/UFAM** por todo conhecimento compartilhado ao longo desta jornada.

Ao **Prof. Dr. Alessandro Loguércio** por todo ensinamento, suporte e experiência passados.

A toda equipe de **alunos da iniciação científica e mestrado** que colaboraram e foram essenciais para a execução desta pesquisa, em especial, **Marcílio Monteiro, Bárbara Quércia e Tébana Toffol**.

À **Profa. Dra. Márcia Rezende**, que me recebeu atenciosamente na Universidade Estadual de Ponta Grossa – EUPG e apresentou ferramentas e conhecimentos imprecindíveis para a realização deste ensaio clínico.

Aos **amigos** com os quais essa jornada me presenteou, **Verônica Bertocco, Luana Barros, Diego Cordeiro, Rodrigo Kiyuna, Gerson Neto, Gabriel Azevedo**. Vocês foram minha fonte de consolo, apoio e companheirismo.

Às amigas **Nicole Lins e Marcela Amorim** presentes desde o processo de seleção do mestrado, verdadeiras cúmplices e apoios.

À minha eterna dupla de graduação, companheira de mestrado tardia e amiga de infância, **Bianca Trajano**, por mais uma vez embarcar comigo em uma jornada de crescimento e por sempre incentivar o meu melhor.

Ao meu namorado **Pierre Teles**, pelo companheirismo, paciência e incentivo.

Ao **Prof. Dr. Erivan Clamentino Gualberto Jr** e **Profa. Dra. Carina Toda** por aceitarem constituir minha banca examinadora e por todas as contribuições que virão a fazer por esta pesquisa.

À **Profa. Dra. Juliana Pereira** por todo suporte ao longo dessa caminhada. Sua co-orientação foi fundamental do início ao fim desde ensaio clínico.

À **minha orientadora Profa. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde**, minha professora da graduação e co-orientadora da iniciação científica, por mais esses dois anos de orientação, paciência e conhecimento compartilhado. Minha eterna gratidão.

JÉSSICA BRUNA CORRÊA LINDOSO. Genotoxicidade de agentes clareadores de alta concentração – um ensaio clínico randomizado. 2017. 78 f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

RESUMO

O presente estudo avaliou o potencial genotóxico dos agentes clareadores em alta concentração, peróxido de carbamida (PC) 37% e peróxido de hidrogênio (PH) 38%, bem como a influência da barreira gengival fotopolimerizável e seu tempo de polimerização neste potencial genotóxico. Tratou-se de um ensaio clínico randomizado duplo cego onde 56 pacientes foram selecionados e divididos aleatoriamente em dois grupos principais de pesquisa. Foi utilizado o delineamento de boca-dividida em ambos os grupos. No primeiro grupo, o PC37, o agente clareador foi o PC 37%, utilizado na arcada superior com aplicação prévia da barreira gengival fotopolimerizável, formando o subgrupo PCCBG, e em paralelo, na arcada inferior sem a aplicação da barreira gengival, formando o subgrupo PCSBG. No segundo grupo, o PH38, foi utilizado o agente clareador PH 38%, de maneira que na arcada superior a barreira gengival foi aplicada, previamente ao gel clareador, em dois tempos diferentes de polimerização (10 e 30 segundos) gerando, respectivamente, os subgrupos PH10s e PH30s, e ainda, na arcada inferior foi aplicada apenas a barreira gengival, formando o subgrupo BG. Foram realizadas duas sessões de clareamento dentário em consultório com o intervalo de uma semana entre elas. Coletas de esfregaço da região gengival foram realizadas, a partir da técnica de citologia esfoliativa, no *baseline*, 14 e 37 dias após o início do tratamento. A genotoxicidade foi aferida a partir do teste de micronúcleos (MN), segundo critérios pré estabelecidos. Os resultados registrados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e ambos os grupos (PC37 e PH38) apresentaram anormalidade na distribuição dos dados. Analisando os subgrupos como amostras independentes, realizou-se o teste Kruskal-Wallis de igualdade de populações, mostrando que não houve diferença entre eles comparando os três pontos de seguimento (*baseline*, 14 dias e 37 dias), apresentando $P = 0,8721$ no grupo PC37 e $P = 0.3548$ no grupo PH38. Nenhum dos agentes apresentou potencial genotóxico, assim como a utilização da barreira gengival em diferentes tempos de polimerização não causou aumento na taxa de MN encontrada. Estudos clínicos na exploração desse campo são escassos na literatura, havendo necessidade de mais exploração.

PALAVRAS-CHAVES: Clareamento Dentário, Teste para Micronúcleos, Genotoxicidade, Ensaio Clínico

JÉSSICA BRUNA CORRÊA LINDOSO. Genotoxicity of high concentration bleaching agents – a randomized clinical trial. 2017. 78 p. Master's dissertation submitted to the Graduate Program in Dentistry, Federal University of Amazonas, Manaus-AM.

ABSTRACT

The present study evaluated the genotoxic potential of high concentration bleaching agents, 37% carbamide peroxide and 38% hydrogen peroxide, as well as the influence of light-cured gingival barrier and its curing time. It was a randomized double-blind clinical trial where 56 patients were randomly selected and divided into two major research groups. The mouth-split design was used in both groups. In the first group, PC37, the bleaching agent used was 37% carbamide peroxide, applied in the upper arch with prior application of the light-cured gingival barrier, forming the subgroup PCCBG, and in parallel, in the lower arch without the application of the gingival barrier, forming the subgroup PCSBG. In the second group, the PH38, the 38% hydrogen peroxide bleaching agent was used, so that in the upper arch the gingival barrier was applied, prior to the bleaching gel, in two different light-cured times (10 and 30 seconds), generating, respectively, PH10s and PH30s subgroups, and in the lower arch, only the light-cured gingival barrier, forming the BG subgroup. Following this protocol, two in the office bleaching sessions were performed with the interval of one week between them. Swab collections were performed from the gingival region, using the exfoliative cytology technique, at the baseline, 14 and 37 days after the start of treatment. The protocol for treatment and staining of the slides was applied immediately after the collection of the smear and the genotoxicity was assessed from the micronucleus test, according to pre-established criteria. The results were submitted to the Shapiro-Wilk normality test and both groups (PC37 and PH38) presented an abnormality in the data distribution. Analyzing the subgroups as independent samples, the Kruskal-Wallis test of equality of populations was carried out, showing that there was no difference between them comparing the three follow-up points (baseline, 14 days and 37 days), presenting $P = 0.8721$ in the Group PC37 and $P = 0.3548$ in the PH38 group. Both agents, hydrogen peroxide and peroxide of carbamide in high concentration, did not present genotoxic potential after two sessions of in office bleaching, as well as the use of the gingival barrier in different times of light-cure did not cause increase in the micronucleus rate found. Further clinical studies in the exploration of this field are necessary, taking into account that bleaching has increased in demand in the office.

KEY-WORDS: Tooth bleaching, Micronucleus Testing, Genotoxicity, Clinical Trial

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

MN	Micronúcleos
PC	Peróxido de Carbamida
PCCBG	Peróxido de Carbamida com Barreira Gengival
PCSBG	Peróxido de Carbamida sem Barreira Gengival
PH	Peróxido de Hidrogênio
PH10s	Peróxido de Hidrogênio com Barreira gengival fotopolimerizada por 10 segundos
PH30	Peróxido de Hidrogênio com Barreira gengival fotopolimerizada por 30 segundos
BG	Barreira gengival

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
2.1 DESENHO DA PESQUISA	18
2.2 DESFECHO PRIMÁRIO.....	18
2.3 DESFECHO SECUNDÁRIO	18
2.4 ÁREA DE ESTUDO	18
2.5 SELEÇÃO DE PACIENTES E CÁLCULO AMOSTRAL.....	18
2.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	19
2.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	19
2.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	20
2.8.1 Riscos	20
2.8.2 Benefícios.....	20
2.9 ALEATORIZAÇÃO EM BLOCO DOS GRUPOS E CEGAMENTO	20
2.10 PROTOCOLO DE TRATAMENTO	20
2.11 SELEÇÃO DOS MATERIAIS E PROCEDIMENTO CLÍNICO	22
2.12 PROTOCOLO PARA A AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE POR FREQUÊNCIA DE MN	23
2.12.1 Coleta e esfregaço	24
2.12.2 Fixação	24
2.12.3 Coloração do esfregaço.....	24
2.12.4 Critérios para contagem de MN	24
3. ARTIGO 1.....	26
3.1 TÍTULO	26
3.2 RELEVÂNCIA CLÍNICA	26
3.3 RESUMO.....	26
3.4 INTRODUÇÃO	27
3.5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.5.1 Cálculo do tamanho amostral	28
3.5.2 Grupos experimentais	28
3.5.3 Procedimento clareador	28
3.5.4 Coleta de amostras para MN em células esfoliadas.....	29
3.5.5 Protocolo de coloração.....	29
3.5.6 Avaliação das lâminas.....	30

3.5.7 Análise estatística	31
3.6 RESULTADOS	31
3.7 DISCUSSÃO	33
3.8 CONCLUSÃO	35
3.9 REFERÊNCIAS.....	35
4. ARTIGO 2.....	38
4.1 TÍTULO	38
4.2 RESUMO.....	38
4.3 INTRODUÇÃO	39
4.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.4.1 Cálculo do tamanho amostral	39
4.4.2 Grupos experimentais	40
4.4.3 Procedimento clareador	40
4.4.4 Coleta de amostras para MN em células esfoliadas.....	41
4.4.5 Protocolo de coloração	41
4.4.6 Avaliação das lâminas.....	41
4.4.7 Análise estatística	42
4.5 RESULTADOS	43
4.6 DISCUSSÃO.....	44
4.7 CONCLUSÃO	46
4.8 REFERÊNCIAS.....	47
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
6 . REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICE I.....	55
APÊNDICE II.....	57
ANEXO I	59
ANEXO II	65
ANEXO III	67
ANEXO IV	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

O clareamento dentário é atualmente um dos procedimentos estéticos mais procurados para os pacientes em clínicas odontológicas, uma vez que é um tratamento eficaz e não invasivo (Almeida *et al.*, 2014; Pligina *et al.*, 2010; Goldberg *et al.*, 2010). Os sistemas de clareamento dentário contemporâneos são principalmente compostos pelos agentes peróxido de hidrogênio (PH) ou um dos seus precursores, o peróxido de carbamida (PC) (Tredwin *et al.*, 2005; Li, 2011).

As técnicas para clareamento dentário baseiam-se nas propriedades oxidativas do PH, podendo este ser aplicado diretamente sobre o dente, ou formado após uma reação química a partir de precursores tais como perborato de sódio ou PC. O PH pode se difundir através do esmalte e, sob condições alcalinas, age como um agente de oxidação forte, através da formação de radicais livres: as moléculas de oxigênio reativas e ânions de PH. Especulou-se que estes radicais pudessem eliminar os cromóforos, clivando ligações duplas em moléculas orgânicas ou oxidantes, resultando em moléculas solúveis, ou menos fortemente pigmentadas, constituintes que refletem menos luz, criando assim um efeito de clareamento. (Kihn, 2007; Eimar, 2012).

Os dois métodos mais comumente utilizados são o clareamento de consultório e o clareamento caseiro prescrito e acompanhado pelo cirurgião-dentista. O sucesso do clareamento depende principalmente da combinação entre concentração de peróxido e o tempo de aplicação. No clareamento de consultório utiliza-se uma maior concentração de peróxido por um curto período de tempo e no clareamento caseiro uma concentração baixa de peróxido por um período mais longo de tratamento (Vano *et al.*, 2014).

Comparado com o clareamento caseiro, o clareamento em consultório tem vantagens em termos de controle clínico, resultados de clareamento rápidos, redução do

tempo de tratamento, risco menor de ingestão de material e ausência do desconforto ao usar moldeiras (Vano *et al.*, 2014). Porém, também é conhecido que este tratamento pode resultar em efeitos adversos locais na mucosa oral e tecidos dentários. A maioria desses efeitos locais resulta da elevada concentração do PH no produto utilizado e da técnica de aplicação durante os tratamentos repetidos (Ghalili *et al.*, 2014). Além disso, o agente pode, por vezes, entrar em contato com a gengiva ou mucosa oral do paciente durante o procedimento, mesmo quando a gengiva é protegida com uma barreira de resina fotopolimerizável e o clareamento é realizado por um dentista experiente (Lucier *et al.*, 2013; Furukawa *et al.*, 2015).

Os efeitos adversos que já foram relatados em estudos de cultura de células e estudos em animais e humanos incluem: reabsorção radicular cervical associada ao clareamento em dentes não vitais, aumento da sensibilidade dentária associada ao clareamento de dentes vitais, alteração da topografia da superfície de esmalte, redução na resistência de união de materiais à base de resina e a genotoxicidade (Tredwin *et al.*, 2005).

Os efeitos mutagênico e carcinogênico de agentes genotóxicos na população humana, exposta no ambiente de trabalho acidentalmente ou através de tratamento médico ou devido ao seu estilo de vida, aumentou consideravelmente (Roth *et al.*, 2008).

Estudos de segurança e toxicidade de produtos de clareamento indicam que o PH contido nestes produtos podem produzir efeitos genotóxicos a partir da formação de radicais livres capazes de provocar danos celulares, quebra e modificações de base do DNA (Dahl, Pallesen., 2003; Munro *et al.*, 2006; Pligina *et al.*, 2010; Klaric *et al.*, 2013; Lucier *et al.*, 2013). Os efeitos genotóxicos do PH e PC têm sido avaliados *in vitro* e mostram que o contato com PH induz a danos celulares em bactérias e cultura de células. Porém, os dados ainda não são claros para os estudos *in vivo*. (Dahl, Pallesen., 2003, Tredwin *et al.* 2005, Klaric *et al.* 2013)

Além disso, estudos relatam que a resina fotopolimerizável que é utilizada em géis de proteção gengival contém monômeros de metacrilato com um potencial efeito genotóxico, principalmente quando não é completamente polimerizada, deixando uma quantidade residual de monômero em contato com a gengiva durante todo o período de clareamento (Furukawa *et al.* 2015, Klaric *et al.*, 2013).

A ação genotóxica de substâncias que entram em contato com o epitélio oral refletida em danos ao DNA pode ocasionar a formação de micronúcleos (MN) nas células epiteliais (Geus., *et al.* 2014). Os MN consistem em pequenas quantidades de DNA que surgem no citoplasma quando fragmentos de cromossomos ou cromátides ou cromossomos inteiros não são incorporados dentro do núcleo da célula filha durante a mitose, frequentemente, por que estes fragmentos não possuem um centrômero. Fragmentos acêntricos não migram e permanecem atrasados na anáfase, enquanto que os elementos cromossômicos com centrômero são orientados em direção aos polos do fuso (Fenech. 2000; Shashikala *et al.*, 2015).

Durante a telófase, um envoltório nuclear forma-se em torno dos cromossomos perdidos e/ou dos fragmentos dos cromossomos, os quais se desespiralizam e gradualmente assumem a morfologia de um núcleo interfásico, com exceção do tamanho, sendo esse menor que o núcleo principal da célula, surgindo, assim, o nome de MN. (Dietz., *et al.* 2000; Fenech. 2000; Shashikala *et al.*, 2015). Portanto, os MN fornecem um índice confiável de quebra cromossômica e perda de cromossomos (Fenech, 2000).

Ao microscópio, os MN são definidos como uma massa de cromatina citoplásmica circular oval próximo ao núcleo, sendo portanto, corpos citoplasmáticos extranucleares. Situam-se ao redor do núcleo principal dentro da metade interna do citoplasma, possuem diâmetro inferior a 1/3 do núcleo principal, e por isso podem ser prontamente diferenciados de uma célula binucleada. (Shashikala *et al.*, 2015).

Vários estudos concluíram que o aumento gradual das contagens de MN na mucosa oral normal sugeriu uma ligação desse biomarcador com a progressão neoplásica para distúrbios potencialmente malignos para o carcinoma oral, A pontuação de MN pode ser usada como biomarcador para identificar diferentes condições pré neoplásicas muito mais cedo do que as manifestações de características clínicas e pode ser especificamente explorada na triagem de população de alto risco para um câncer específico (Geus *et al.*, 2014; Shashikala *et al.*, 2015; Bolognesia *et al.*, 2015).

Nesse sentido, surgiu a necessidade da exploração de testes para contagem de MN. Atualmente, o ensaio de MN com bloqueio da citocinese, com a capacidade de detectar alterações cromossômicas estruturais e numéricas nos linfócitos periféricos humanos, é o método mais bem validado para monitorar a exposição recente de indivíduos a agentes genotóxicos químicos e físicos (Bolognesia *et al.*, 2015).

Porém, o uso de células supletas, com exceção dos linfócitos, tais como as células esfoliadas de tecidos epiteliais, é de particular interesse, porque podem ser recolhidos com métodos não invasivos, e está cada vez mais a ser explorado com o objetivo de avaliar a sua adequação em estudos de biomonitorização. (Holland *et al.*, 2008; Nersesyanyan *et al.*, 2014; Bolognesia *et al.*, 2015)

A análise de MN em células bucais esfoliadas em humanos é uma técnica citogenética minimamente invasiva e relativamente simples capaz de monitorizar danos em DNA em seres humanos (Tolbert *et al.*, 1992; Holland *et al.*, 2008; Klaric *et al.*, 2013), que foi iniciada na década de 1980, para avaliar a exposição local a agentes genotóxicos, o impacto da nutrição e os fatores de estilo de vida (Shashikala *et al.*, 2015; Bolognesia *et al.*, 2015).

Facilidade de uso e método indolor podem incentivar a utilização de testes. Em tal situação, a citologia esfoliativa seria um procedimento relativamente seguro, que também

pode ser realizado ao lado da cadeira durante o exame oral de rotina. Com o avanço no campo da citologia esfoliativa quantitativa, há o retorno da citologia oral como uma poderosa ferramenta de diagnóstico e de triagem. A triagem envolve a verificação da presença de doença em uma pessoa que está livre de sintomas. A citopatologia convencional melhorou na detecção precoce de alterações em células esfoliadas individuais (Shashikala *et al.*, 2015).

O teste de MN envolve, portanto, o exame de esfregaços epiteliais para determinar a prevalência de células com MN (Tolbert *et al.*, 1992).

Bolognesia et al (2015) realizaram uma revisão sistemática de literatura com foco na aplicação clínica do ensaio de MN em esfregaços de células epiteliais para monitorar o desenvolvimento de lesões bucais locais e como um biomarcador precoce para tumores e diferentes doenças crônicas. Observou-se um excesso significativo de MN em pacientes comparados com controles pareados para subgrupos de câncer de boca e pescoço (metaMR de 2,40, IC 95%: 2,02-2,85) e leucoplasia (metaMR 1,88, IC 95%: 1,51-2,35). O conjunto da análise evidenciou uma potencial utilidade do ensaio MN aplicado em células esfoliadas bucais no pré-exame e no seguimento de lesões orais pré cancerosas.

A maioria das pesquisas clínicas com agentes de clareamento dentário avaliam principalmente sua efetividade e alguns de seus efeitos adversos como a sensibilidade pós-operatória e irritação gengival. Levando em consideração que um dos requisitos mais importantes de um material a ser utilizado em aplicações médicas é a sua biocompatibilidade (Tandi *et tal.*, 2014), este estudo justifica-se como forma de suprir a escassez de dados científicos a cerca do potencial genotóxico dos agentes clareadores de alta concentração, PH e PC, possibilitando seu uso de forma segura aos tecidos orais.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi parte de um estudo maior em que foi avaliado a efetividade do agente clareador (com utilização ou não de ativação sônica), genotoxicidade e qualidade de vida em um mesmo grupo amostral.

2.1 DESENHO DA PESQUISA

Tratou-se de um ensaio clínico controlado, randomizado e duplo-cego (participantes e avaliadores), estruturado com base nas normas do CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials).

2.2 DESFECHO PRIMÁRIO

Potencial genotóxico dos agentes clareadores de alta concentração, PH 38% e PC 37%.

2.3 DESFECHOS SECUNDÁRIOS

Potencial genotóxico do gel clareador peróxido de carbamida a 37% com e sem utilização de barreira gengival.

Potencial genotóxico do gel clareador peróxido de hidrogênio a 35%, com utilização de barreira gengival em diferentes tempos de polimerização.

Potencial genotóxico da barreira gengival isoladamente.

2.4 ÁREA DE ESTUDO

Este estudo prospectivo clínico randomizado, duplo cego, foi realizado em pacientes com interesse na realização de clareamento dentário na Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, de Setembro de 2015 a Junho de 2016, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade do Amazonas (FUA-UFAM) para pesquisa envolvendo seres humanos, CAAE 47411515.8.0000.5020. (ANEXO I)

2.5 SELEÇÃO DE PACIENTES E CÁLCULO AMOSTRAL

O recrutamento dos voluntários foi realizado por meio de anúncios publicitários locais (jornais, estações de rádio e site da Universidade), e os critérios de inclusão foram avaliados por meio da anamnese (ANEXO II).

Para cada paciente ingressante do estudo, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE I) foi obtida após as devidas explicações acerca da natureza do estudo e dos possíveis riscos dos tratamentos propostos. Duas semanas antes do início do clareamento, os participantes foram submetidos a um exame intra-oral e profilaxia dental com pedra-pomes e água com o uso de uma taça de borracha.

O cálculo do tamanho amostral foi baseado na frequência de MN (MN) por 1000 células. Em um estudo prévio da literatura observou-se que a frequência normal de MN é de aproximadamente $1 \pm 1,1$ (Geus, 2015). Para que o procedimento clareador seja considerado seguro, espera-se não encontrar diferença de média superior a 1,0. Com esse embasamento, o cálculo amostral do estudo foi realizado por meio do site www.sealedenvelope.com. E, dessa forma, 52 pacientes (26 por grupo) foram necessários para que se tivesse uma possibilidade de 90% de detectar, com significância ao nível de 5%, um aumento da medida do resultado primário a partir de 1 no grupo controle para 2 nos grupos experimentais. Foram recrutados 56 pacientes para atender também ao objetivo do desfecho de efetividade dos agentes clareadores com e sem ativação ultrassônica, como relatado anteriormente.

2.6 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os pacientes incluídos no estudo apresentaram idade a partir de 18 anos, dentes superiores livres de cárie e os anteriores superiores livres de restaurações na face vestibular, além de incisivos centrais ou caninos apresentando coloração C2 ou mais escura, avaliados em comparação com uma escala visual de cor orientada pelo valor dos dentes (Vita Classical, Vita-Zahnfabrik- Alemanha).

2.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os indivíduos a serem excluídos da pesquisa, por sua vez, foram: grávidas ou lactantes, tabagistas, ex-tabagistas, etilistas usuários de aparelho ortodôntico fixo, indivíduos com manchas intrínsecas graves nos dentes (manchas pelo uso de tetraciclina, fluorose e dentes despolpados), usuários de drogas com ação anti-inflamatória e

antioxidante e participantes com histórico prévio de sensibilidade dentária ou qualquer patologia associada (bruxismo, recessão gengival, lesão não cariosa com exposição de dentina), uma vez que estes não seriam pacientes elegíveis, de imediato, para um tratamento estético, tal como o clareamento dentário

2.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

2.8.1 RISCOS

Possibilidade de haver efeitos colaterais como: sensibilidade pós-operatória, irritação gengival e dentes inicialmente manchados como resultado de um clareamento não uniforme, mas que se normaliza conforme o passar das semanas.

2.8.2 BENEFÍCIOS

Alteração estética da cor dos dentes e melhora na qualidade de vida com relação a auto-estima dos participantes.

2.9 ALEATORIZAÇÃO EM BLOCO DOS GRUPOS E CEGAMENTO

O processo de randomização foi realizado por meio de uma aleatorização em bloco, através de tabelas geradas pelo computador, a partir da lista de pacientes previamente triados e aceitos pelos critérios que a pesquisa exigiu. Uma terceira pessoa não envolvida diretamente na parte clínica da pesquisa foi responsável por esta etapa.

Os participantes e avaliadores encontraram-se cegos tanto para o tipo/concentração do material utilizado quanto para a utilização e o tempo de polimerização empregados na barreira gengival. O fluxograma apresentado na FIGURA 1 foi utilizado para organizar o estudo randomizado.

2.10 PROTOCOLO DE TRATAMENTO

O estudo foi constituído por dois grupos principais delineados e divididos aleatoriamente segundo o tipo/concentração do agente clareador: pacientes tratados com PC a 37% - PC37 e pacientes tratados com PH a 38% - PH38.

Estes grupos foram divididos da seguinte forma: no grupo PC37, em delineamento de boca-dividida, o agente foi utilizado na arcada superior com aplicação da barreira gengival previamente, formando o subgrupo PCCBG, e em paralelo, na arcada inferior, o mesmo agente foi utilizado, porém, sem a aplicação da barreira gengival, formando o subgrupo PCSBG; no grupo PH38, novamente em delineamento de boca dividida, na arcada superior, a barreira gengival foi utilizada em dois tempos diferentes de polimerização (10 e 30 segundos) gerando, respectivamente, os subgrupos PH10s e PH30s e paralelo a isso, na arcada inferior foi utilizada apenas a barreira gengival, para aferir seu potencial genotóxico isoladamente, formando o subgrupo BG. Sendo assim, foram totalizados 5 subgrupos de pesquisa. (Tabela 1)

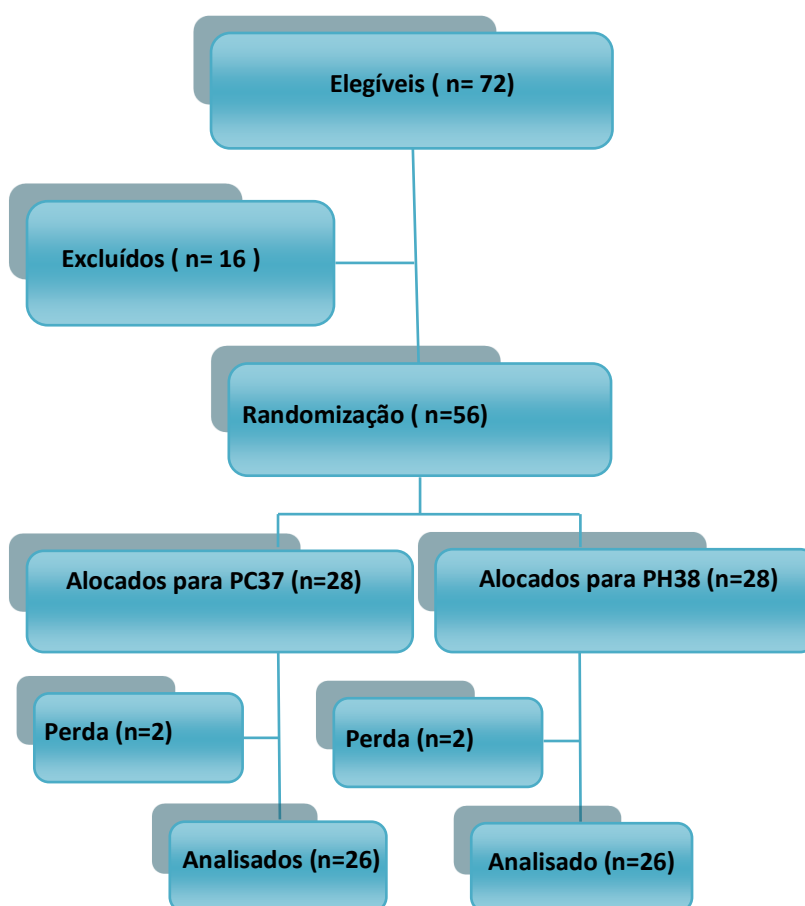


Figura 1. Fluxograma de controle para ensaios clínicos randômicos

Uma vez que os grupos principais não foram tratados simultaneamente e que apresentaram objetivos distintos, os mesmos constituíram duas pesquisas com potencial de publicação independentes.

Tabela 1 - Grupos de estudo

Grupos principais	Subgrupos	Delineamento
PC37 Power Bleaching Office ® (BM4, brazil)	PCCBG – com barreira gengival (Arcada superior) PCSBG – sem barreira gengival (Arcada inferior)	Boca-dividida
PH38 Opalescence Boost 38% ® (ULTRADENT, Brazil)	PH10s – com barreira gengival polimerizada por 10s (arcada superior) PH30s – com barreira gengival polimerizada por 30s (arcada superior) BG – barreira gengival isoladamente (arcada inferior)	Boca-dividida

2.11 SELEÇÃO DOS MATERIAIS E PROCEDIMENTO CLÍNICO

Dois diferentes agentes clareadores foram utilizados no estudo pela técnica de consultório. Sendo estes, o gel Power Bleaching Office ® (BM4, brazil) contendo 37% de PC e o Opalescence Boost 38% ® (ULTRADENT, Brazil) apresentando 38% de PH. As instruções dos fabricantes encontram-se no APENDICÊ II.

O clareamento efetuado com o PC a 37% (PC37) (Power Bleaching Office - BM4, Brazil) foi realizado na arcada superior e inferior, em diferentes protocolos sugeridos pelo fabricante, por um período de 45 minutos consecutivos (sem a substituição ou renovação do gel, conforme instruções do fabricante). Na arcada superior foi efetuado com a aplicação prévia da barreira gengival de resina fotopolimerizável (Top Dam - FGM, Joinville, Brazil) (subgrupo PCCBG), fotopolimerizada por 30s, e paralelo a isso, na arcada sem a aplicação prévia da barreira gengival fotopolimerizável (subgrupo PCSBG).

O clareamento efetuado com o PH a 38% (PH38) (Opalescence Boost 38% ® (ULTRADENT, Brazil)) foi realizado na arcada superior por 40 min consecutivos (sem a substituição ou renovação do gel) com a aplicação prévia da barreira gengival com resina fotopolimerizável (Opal Dam ®- ULTRADENT , Brazil), conforme instruções do fabricante, e realizado no modelo de boca dividida. Assim, a partir da linha média, a arcada superior foi dividida em duas meia-arcadas. Em um lado a barreira gengival foi polimerizada por 10 segundos (PH10s) e do outro lado por 30 segundos (PH30s), e ainda, na arcada inferior a barreira gengival foi disposta isoladamente de canino à canino, e fotopolimerizada por 30 segundos (BG).

Esses critérios foram realizados como uma forma de padronização e simplificação do processo para o operador e foi levado em consideração que a aleatorização das arcadas não afetaria a diferenças no resultado final.

A determinação dos tempos de polimerização da barreira gengival foi realizada em torno de todas as marcas do produto encontradas no mercado (Total Blanc, Top Dam e Ultradent) e as instruções de seus fabricantes, retirando-se o menor tempo recomendável (10 segundos) e o maior tempo recomendável (30 segundos), a fim de encontrar um bom parâmetro para análise das suas repercussões em genotoxicidade.

No total, foram realizadas duas sessões de clareamento de consultório com uma semana de intervalo uma semana entre estas em ambos os grupos, PC37 e PH38.

2.12 PROTOCOLO PARA A AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE POR FREQUÊNCIA DE MN

Foi utilizada a técnica de citologia esfoliativa. (De Geus *et al.*, 2014; Klaric *et al.*, 2013; Tolbert *et al.*, 1992)

2.12.1 COLETA E ESFREGAÇO

A coleta foi realizada antes do clareamento dentário (D0), 14 (D14) e 37 (D37) dias após o início do tratamento. O paciente foi orientado a realizar um bochecho com água potável por 1 minuto previamente à coleta do esfregaço, que foi realizado em tecido gengival com uma Escova Cervical Descartável® (Labor Import, Paraná, Brazil). A escova foi friccionada firmemente, sem muita pressão para não lesionar o tecido, uma vez em sentido único e em movimento rotatório, na extensão dos elementos que serão submetidos ao clareamento. Foi utilizada uma escova para cada região de coleta estabelecida no delineamento de boca dividida. Em seguida, o esfregaço foi distribuído em lâmina de vidro, novamente em sentido único e movimento rotatório, e seco com jato de ar de seringa tríplice por um minuto em uma distância de 30 cm, a fim de evitar a desidratação excessiva das células.

2.12.2 FIXAÇÃO

Procedeu-se imediatamente com a fixação dos esfregaços em 80% de metanol por 1 minuto (Tolbert *et al.*, 1992; Holland et al. 2008 e Klaric *et al.*, 2013).

2.12.3 COLORAÇÃO DO ESFREGAÇO

O protocolo de coloração foi preparado após a fixação do esfregaço.

O corante Giemsa ® (Newprov, Paraná, Brazil) foi aplicado sobre as lâminas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, por um minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em dois recipiente com água (recipiente 1 = 3 a 4 lavagens, recipiente 2 = 2 a 3 lavagens). Após esse processo, foram aplicadas de 2 a 3 gotas do adesivo Entellan ® (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) sobre esfregaço visivelmente seco para posicionamento da lamínula de vidro (Tolbert *et al.*, 1992; Holland *et al.*, 2008 e Klaric *et al.*, 2013).

2.12.4 CRITÉRIOS PARA CONTAGEM DE MN

Dois examinadores foram treinados e calibrados para a avaliação das lâminas por um especialista em Patologia Oral.

Os mesmo foram previamente submetidos a calibração intra-examinador e o grau de concordância foi verificado através do índice Kappa. A leitura das lâminas do estudo

somente foi iniciada após o teste Kappa apresentar coeficiente igual ou acima de 0,8. A calibração foi realizada por meio da análise de 10 fotos de esfregaços de mucosa bucal com a identificação de variáveis de leitura a serem observados no estudo. Estas fotos foram codificadas e reapresentadas ao examinador após 7 dias e em ordem aleatória. Após a segunda leitura, foi determinado o coeficiente Kappa intra-examinador, os quais foram: 0,824 e 1,000.

A contagem das células foi realizada sob um microscópio óptico (Coleman, modelo N701 ®) com 100x de magnificação, e quando os MN foram encontrados, a magnificação aumentou para 400x. Cada amostra foi avaliada em 1000 células por cada período (D0, D14, D37).

Os critérios para inclusão na contagem total de células seguiram os procedimentos descritos por Tolbert *et al.*, 1992.

As células selecionadas e contadas deveriam possuir:

1. Citoplasma intacto e em posição relativamente plana
2. Pequena ou nenhuma sobreposição de células
3. Pouco ou nenhum detrito
4. Núcleo normal e intacto, com perímetro liso e distinto

Os parâmetros para identificação de MN foram os seguintes:

1. Arredondados com perímetro liso sugestivo de membrana
2. Ter menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas grande o suficiente para discernir a forma e a cor
3. Intensidade de coloração similar a do núcleo
4. Textura similar à do núcleo
5. Estar no mesmo plano focal do núcleo
6. Ausência de sobreposição com o núcleo
7. Não ter ponte com o núcleo

Morte ou degeneração celular (cariólise, cariorrexe, fragmentação nuclear) serão excluídos da avaliação.

3. ARTIGO 1

O presente artigo será submetido ao periodico Operative Dentistry (ISSN: 1559-2863), o qual apresentou classificação Qualis A1, em 2015. (ANEXO III)

3.1 TÍTULO

Avaliação da genotoxicidade do clareamento dentário a base de peróxido de hidrogênio de uso em consultório e da barreira de proteção gengival fotopolimerizável

3.2 RELEVÂNCIA CLÍNICA

Este estudo mostrou que o clareamento dentário com o gel peróxido de Os resultados deste estudo indicaram que o gel peróxido de hidrogênio a 38% é um procedimento seguro, pois não induziu danos ao DNA no tecido gengival.

3.3 RESUMO

Objetivo: este ensaio clínico randomizado duplo cego avaliou o potencial genotóxico do clareamento em consultório e a influência da barreira gengival fotopolimerizável e seu tempo de polimerização.

Métodos: foram selecionados 28 pacientes, onde em delineamento de boca-dividida, na arcada superior a barreira gengival foi aplicada, previamente ao gel clareador peróxido de hidrogênio (PH), em dois tempos diferentes de polimerização (10 e 30 segundos) gerando, respectivamente, os subgrupos PH10s e PH30s e ainda, na arcada inferior foi aplicada apenas a barreira gengival, formando o subgrupo BG. Duas sessões de clareamento dentário foram realizadas com o intervalo de uma semana entre elas. Foram realizadas coletas de esfregaço da região gengival, a partir da técnica de citologia esfoliativa, no *baseline*, 14 e 37 dias após o início do tratamento. O protocolo de tratamento das lâminas foi aplicado imediatamente após a coleta do esfregaço e a genotoxicidade foi aferida a partir do teste de micronúcleos (MN).

Resultados: Analisando os grupos como amostras independentes, realizou-se o teste Kruskal-Wallis de igualdade de populações, mostrando que não houve diferença entre eles comparando os três pontos de seguimento, apresentando $P = 0.3548$.

Conclusão: O clareamento dentário em consultório e a barreira gengival fotopolimerizável não apresentaram potencial genotóxico.

3.4 INTRODUÇÃO

O clareamento dentário é um dos procedimentos estéticos mais populares para os pacientes em clínicas dentárias, uma vez que é um tratamento eficaz e não invasivo¹⁻²⁻³. Os dois métodos mais comumente utilizados são o clareamento de consultório e o clareamento caseiro prescrito e acompanhado pelo cirurgião-dentista⁴.

Comparado com o clareamento caseiro, no entanto, o clareamento em consultório tem vantagens em termos de controle clínico, os resultados de clareamento rápidos, redução do tempo de tratamento, assim como evitar a ingestão de material e o desconforto de usar moldeiras⁴. Entretanto, este método pode resultar em efeitos colaterais locais na mucosa oral e tecidos dentais durante o clareamento. A maioria dos efeitos locais resulta da elevada concentração do PH no produto utilizado e da técnica de aplicação durante os tratamentos repetidos⁵.

Estudos de segurança e toxicidade de produtos de clareamento indicam que o peróxido de hidrogênio contido nestes produtos também pode produzir efeitos genotóxicos a partir da formação de radicais livres capazes de provocar danos celulares, quebra e modificações de base do DNA^{2,6,7,8,9}. Além disso, a resina fotopolimerizável que é utilizada em géis de proteção gengival no clareamento de consultório também possuem um potencial efeito genotóxico relatado em estudos⁸.

A ação genotóxica de substâncias que entram em contato com o epitélio oral refletida em danos ao DNA pode ocasionar a formação de MN nas células epiteliais, o que significa que houve alteração no DNA¹⁰ e, conseqüentemente, há maior predisposição para o desenvolvimento de câncer bucal¹¹. A análise de MN em células bucais esfoliadas em humanos é uma técnica citogenética minimamente invasiva e relativamente simples capaz de monitorizar danos em DNA em seres humanos^{8,12,13}.

Embora tenha sido demonstrado que o PH pode induzir alterações patológicas em tecidos moles em modelos animais e na pesquisa celular, poucos estudos têm sido conduzidos em seres humanos¹¹. Portanto, o objetivo deste ensaio clínico controlado duplo-cego foi avaliar o potencial genotóxico do clareamento em consultório, assim como a influência da barreira gengival fotopolimerizável.

3.5 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Universidade do Amazonas (FUA-UFAM) para pesquisa envolvendo seres humanos, CAAE 47411515.8.0000.5020. Foram excluídos pacientes grávidas ou lactantes, tabagistas, ex-tabagista e usuários de aparelho ortodôntico fixo.

3.5.1 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi baseado na frequência de MN por 1000 células. Em um estudo prévio observou-se que a frequência normal de MN é de aproximadamente $1 \pm 1,1$ (Geus, 2014). Com esse embasamento, o cálculo amostral do estudo foi realizado por meio do site www.sealedenvelope.com. E, dessa forma, 26 pacientes foram necessários para que se tivesse uma possibilidade de 90% de detectar, com significância ao nível de 5%, um aumento da medida do resultado primário a partir de 1 no grupo controle para 2 no grupo experimental.

3.5.2 Grupos experimentais

Para este experimento foi avaliada a genotoxicidade de um gel clareador a base de PH a 38% e a influência da barreira gengival de resina fotopolimerizável em dois diferentes tempos de polimerização. Em delineamento de boca dividida, foram testados 3 grupos de estudo: gel clareador com aplicação prévia barreira gengival fotopolimerizada por 30 segundos, gel clareador com aplicação prévia da barreira gengival fotopolimerizada por 10 segundos e aplicação apenas da barreira gengival, sem o gel clareador. Foram inclusos neste estudo 28 pacientes.

3.5.3 Procedimento clareador

O clareamento foi realizado com o gel clareador Opalescence Boost® (ULTRADENT, Brazil), contendo 38% de PH, na arcada superior, por 40 min consecutivos (sem a substituição ou renovação do gel) com a aplicação prévia de barreira gengival com

resina fotopolimerizável (Opal Dam® - ULTRADENT, Brazil), conforme instruções do fabricante, e realizado no modelo de boca dividida. Assim, a partir da linha média, a arcada superior foi dividida em duas meia-arcadas. Em um lado a barreira gengival foi fotopolimerizada por 10 segundos, formando o grupo PH10s, e do outro lado por 30 segundos, formando o grupo PH30s, e ainda, na arcada inferior a barreira gengival foi disposta isoladamente de canino à canino, e fotopolimerizada por 30 segundos, formando o grupo BG.

Foram realizadas duas sessões de clareamento dentário com intervalo de uma semana entre elas.

3.5.4 Coleta de amostras para MN em células esfoliadas

Uma amostra de células esfoliadas da mucosa foi coletada imediatamente antes da primeira sessão de clareamento (D0), 14 (D14) e 37 (D37) dias após o início do tratamento.

O paciente foi orientado a realizar um bochecho com água potável por 1 minuto previamente à coleta do esfregaço, que foi realizado em tecido da margem gengival com uma escova cervical descartável® (Labor Import, Paraná, Brazil). A escova foi friccionada firmemente, sem muita pressão, uma vez em sentido único e em movimento rotatório, na extensão dos elementos que foram submetidos ao clareamento. Em seguida, o esfregaço foi distribuído em lâmina de vidro, novamente em sentido único e movimento rotatório, e seco com jato de ar de seringa tríplice por um minuto em uma distância de 30 cm, a fim de evitar a desidratação excessiva das células.

3.5.5 Protocolo de coloração

O protocolo de coloração foi aplicado imediatamente após a coleta. Os esfregaços foram fixados em 80% de metanol por 1 minuto. Em seguida, o corante Giemsa ® (Newprov, Paraná, Brazil) foi aplicado sobre as lâminas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, por um minuto. As lâminas foram lavadas em dois recipiente com água (recipiente 1 = 3 a 4 lavagens, recipiente 2 = 2 a 3 lavagens). Após esse processo, foram aplicadas de 2 a 3 gotas do adesivo Entellan ® (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) sobre esfregaço visivelmente seco para posicionamento da lamínula de vidro^{8,12,13}.

O protocolo de coleta e coloração foi realizado por uma terceira de pessoa, de forma que a mesma durante a montagem das lâminas fez o uso de legendas de identificação (A, B e C), que representavam o protocolo de tratamento realizado, com a finalidade de cegamento do examinador.

3.5.6 Avaliação das lâminas

Dois examinadores foram treinados e submetidos a uma calibração intra-examinador. Seus graus de concordância foram verificados através do índice Kappa. Esta calibração foi realizada por meio da análise de 10 fotos de esfregaços de mucosa bucal com a identificação de variáveis de leitura a serem observados no estudo. As mesmas foram codificadas e reapresentadas ao examinador após 7 dias e em ordem aleatória. Após a segunda leitura, foi determinado o coeficiente Kappa intra-examinador, os quais foram: 0,824 e 1,000. Só então, as leituras das lâminas foram iniciadas.

A contagem das células foi realizada sob um microscópio óptico (Coleman, modelo N701®) com 100x de magnificação, e quando os MN foram encontrados, a magnificação aumentou para 400x. Cada amostra foi avaliada em 1000 células por cada período (D0, D14, D37). Os critérios para inclusão na contagem total de células foram: 1) Citoplasma intacto e em posição relativamente plana; 2) Pequena ou nenhuma sobreposição de células; 3) Pouco ou nenhum detrito; 4) Núcleo normal e intacto, com perímetro liso e distinto.

E os parâmetros para identificação de MN foram: 1) Arredondados com perímetro liso sugestivo de membrana; 2) Ter menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas grande o suficiente para discernir a forma e a cor; 3) Intensidade de coloração similar a do núcleo; 4) Textura similar à do núcleo; 5) Estar no mesmo plano focal do núcleo; 6) Ausência de sobreposição com o núcleo; 7) Não ter ponte com o núcleo. (Figura 1) Morte ou degeneração celular (cariólise, cariorrexe, fragmentação nuclear) serão excluídos da avaliação.

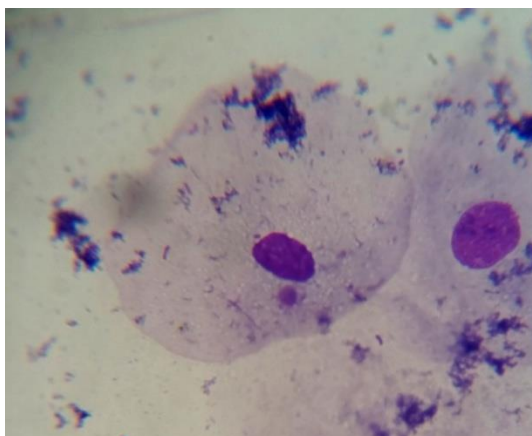


Figura 1 - Célula esfoliada apresentando MN

3.5.7 Análise estatística

A frequência de MN foi tabulada utilizando o programa Excel (Microsoft corporation, EUA). Foi realizado o teste Shapiro-Wilk para análise de normalidade dos dados e o teste de Kruskal-Wallis de igualdade-de-populações, para comparação dos protocolos e tempos avaliados.

Tabela 1: Características Demográficas dos Participantes

Idade (média +- desvio padrão)	24 +- 5.29
Sexo (masculino, %)	34,65%

3.6 RESULTADOS

Dos vinte e oito pacientes que foram recrutados para este experimento, houve perda de seguimento de 2 pacientes (Tabela 1), por motivos alheios à pesquisa.

Os resultados encontrados demonstraram ausência de potencial genotóxico nos três grupos testados.

A figura 02 mostra a análise descritiva da presença de MN em todos os grupos, mostrando que não houve diferença entre as taxas encontradas entre eles nos períodos estudados.

Analisando-os como amostras independentes, realizou-se o teste Kruskal-Wallis de igualdade de populações, mostrando que não houve diferença estatística entre eles

comparando os três pontos de seguimento (*baseline*, 14 dias e 37 dias) ($P = 0.3548$) (Tabela 2).

Tabela 2: Mediana e Variação Interquartil da frequência de MN

	Baseline			D14			D37			p-valor
	N	M	IQR	N	M	IQR	N	M	IQR	
PH10S	26	1	1	26	0.5	1	26	0.5	1	0.3548
PH30S	26	0.5	1	26	1	2	26	0.5	1	
BG	26	0.5	1	26	1	2	26	1	1	

Não houve diferença estatística entre os grupos ou seus tempos de análise ($p = 0.8721$). N: Número de indivíduos; M: Mediana; IQR: Variação interquartil

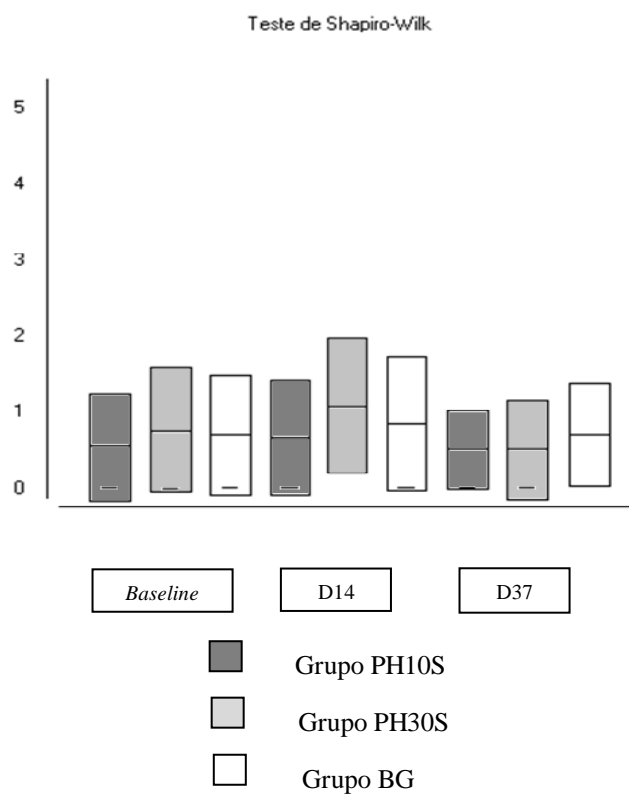


Figura 2 – Taxa da presença de MN em *baseline*, D14 e D37 nos três grupos. Houve anormalidade na distribuição dos dados em todos os tempos.

3.7 DISCUSSÃO

Os três grupos testados não demonstraram potencial genotóxico. Portanto, a hipótese nula de que não haveria potencial genotóxico provocado às células da mucosa oral através do clareamento de consultório, com possível influência da barreira gengival fotopolimerizável de acordo com seu tempo de polimerização, foi aceita.

Dentro do protocolo estabelecido, foram realizadas 3 coletas de células esfoliadas da mucosa oral. A primeira, realizada antes da primeira sessão de clareamento, foi utilizada como controle, uma vez que o paciente ainda não havia sido exposto ao agente clareador. A segunda coleta foi realizada 14 dias após o início do clareamento dentário. Segundo Holland et al (2008)¹³ e De Almeida et al (2014)¹ o epitélio oral mantém-se por renovação celular contínua, em que novas células, que foram produzidas na camada basal, por mitose migram para a superfície substituindo as que foram perdidas, em um intervalo de 7 a 10 dias. De acordo com Thomas et al (2009)¹⁴ esse intervalo varia entre 7 a 21 dias. Levando em consideração essa literatura, foi estabelecido um intervalo teoricamente possível de observar os efeitos genotóxicos da exposição submetida. Ainda, foi acrescentado um terceiro intervalo, 45 dias após o início do tratamento, com o objetivo de avaliar a perpetuação dos danos causados, uma vez que em seus resultados, De Almeida et al (2014)¹ encontraram uma diminuição no número de células com MN no intervalo de 24 dias após o fim de tratamento com clareamento caseiro, sugerindo que as lesões primárias no DNA foram reparadas.

Neste estudo foi avaliada a frequência de MN em um intervalo de 1000 células contadas. Levando em consideração que a frequência de MN na mucosa oral normal é entre 0,5 e 2,0 / 1000 células^{11,15,16,17}, apenas 1,17% das contagens realizadas excedeu esse valor, mesmo após a exposição submetida.

Vários estudos *in vitro*^{1,2,9,18,19,20,21,22,23,24,25} e *in vivo* em animais^{26,27} observaram diferentes tipos de danos ao DNA por várias concentrações de agentes clareadores. Outros estudos *in vivo* em animais^{28,29,30,31} não mostraram qualquer risco envolvido no procedimento clareador. Levando em consideração que em experimentos *in vitro* o agente age diretamente sobre as células, pode-se assim justificar a maior associação de genotoxicidade à esse tipo de estudo quando comparado com estudos *in vivo*. Ainda encontram-se escassos, na literatura, estudos *in vivo* realizados em seres humanos. Dentro dos existentes, em sua

maioria, foram testados protocolos e marcas comerciais de clareamento caseiro realizado com peróxido de carbamida em baixa concentração e os mesmos não apresentaram relevância estatística referente ao potencial genotóxico eminente^{1,11}.

O único estudo in vivo, publicado, realizado com peróxido de hidrogénio em alta concentração⁸, demonstrou aumento estatisticamente significativo nos valores dos marcadores de genotoxicidade. Nessa pesquisa, foram realizados dois tempos de avaliação (imediatamente após o clareamento (controle) e 72 horas após o clareamento). Porém, seus resultados mostraram que diferenças significativas no número de MN entre os participantes já estavam presentes nas amostras controle. Além disso, 72 horas não representa um intervalo seguro para manifestação de alteração celular expressa na camada superficial, como já discutido. Portanto, esse resultado provavelmente corresponde a exposição a vários fatores genotóxicos na vida diária dos participantes e reflete a sensibilidade pronunciada do teste de MN manifestada como um aumento nos marcadores de genotoxicidade.

A resina fotopolimerizável utilizada nos géis de proteção gengival contém monômeros de metacrilato com potencial efeito genotóxico⁸. Durante a polimerização, teoricamente, é possível uma conversão de 100% de monômero em polímero, mas até 25% a 50% das ligações duplas de monômeros de metacrilato permanecem efetivamente inativas no polímero³². Isso significa que uma certa quantidade de monômero permanece em contato com a gengiva durante toda a duração do clareamento⁸. Nesse sentido, o presente trabalho também objetivou a análise da influência da barreira gengival fotopolimerizável no potencial genotóxico do procedimento clareador de consultório, avaliando um intervalo representativo de polimerização (30 e 10 segundos) passíveis de ocorrer dentro da prática clínica. Adicionalmente, avaliou-se apenas a barreira gengival no grupo BG, sem associação com o gel clareador, para estudo da sua genotoxicidade isolada.

Como já relatado, todas as hipóteses de genotoxicidade deste estudo foram descartadas. Mesmo a comparação entre os 3 grupos analisados não demonstrou diferença estatística, apresentando $P = 0.3548$. Segundo a literatura, em condições clínicas, as baixas doses diárias de produto clareador usadas para produzir clareamento dentário não geram efeitos tóxicos agudos e subagudos gerais. A genotoxicidade e a carcinogenicidade só ocorrem em concentrações que não são atingidas durante os tratamentos dentários^{3,8}. Dentro

deste contexto, é importante salientar que nesta pesquisa a exposição foi ainda menor do que os protocolos clínicos convencionais, onde são realizadas 3 sessões de clareamento dentário.

Ainda há na literatura uma escassez de estudos disponíveis que avaliem a genotoxicidade de clareamento dentário em ambiente clínico por meio do teste de MN. Portanto, são reduzidas as comparações que este estudo pode oferecer, ressaltando a necessidade de mais estudos clínicos na exploração desse campo, levando em consideração que o clareamento dentário tem cada vez mais aumentado sua demanda e procura em consultório^{1,2,3}.

3.8 CONCLUSÃO

Apesar da alta concentração de PH contida na composição dos géis clareadores de consultório, o procedimento não apresentou potencial genotóxico através da avaliação de contagem de MNs dentro das condições avaliadas. Também não se encontrou associação com maior potencial genotóxico em relação ao tempo de polimerização da barreira gengival.

3.9 REFERÊNCIAS

1. Almeida LCAG, Soares DG, Gallinari MO, Costa CAS, Santos PH, Briso ALF (2014) Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols *Clinical Oral Investigation* s00784-014-1285-3.
2. Pligina KL, Rodina IA, Shevchenko TV, Bekchanova ES, Tikhonov VP, Sirota NP (2012) Dna-Damaging effects of dental bleaching agents *Bulletin of experimental biology and medicin*, **1(153)** 65-69.
3. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E (2010) Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review *Clinical Oral Investigation* (**14**) 1–10.
4. Vano M, Derchi G, Barone A, Genovesi A, Covani U (2014) Tooth bleaching with hydrogen peroxide and nano-hydroxyapatite: a 9-month follow-up randomized clinical trial *International Journal Dental Hygiene*.
5. Ghalili M, Khawaled K, Rozen D, Afsahi V (2014) Clinical study of the safety and effectiveness of a novel over-the-counter bleaching tray system clinical *Cosmetic And Investigational Dentistry* (**6**) 15–19.
6. Dahl JE, Pallesen U (2003) Tooth Bleaching — A critical review of the biological aspects *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **14(4)** 292-304.
7. Munro IC, Williams GM., Heymann HO, Kroes R. (2006) Tooth whitening products and the risk of oral cancer *Food And Chemical Toxicology* (**44**) 301–315.
8. Klaric E, Par M., Profeta I, Kopjar N, Rozgaj R., Kasuba V, Zeljezic D, Tarle. Z (2013) Genotoxic effect of two bleaching agents on oral mucosa *Cancer Genomics & Proteomics* (**10**) 209-216.
9. Lucier RN, Etienne O, Ferreira S, Garlick JA, Kugel G, Egles C (2013) Soft-tissue alterations following exposure to tooth-whitening agents *J Periodontol* (**84**) 513-519.
10. Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, Bolognesi C, Knasmueller S, Kirsch-Volders M., Bonass S (2011) The HUMN and HUMNxL

international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future *Mutagenesis*, **1(26)** 239–245.

11. De Geus JI, Rezende M, Margraf Ls, Bortoluzzi Mc, Fernandez E, Loguercio Ad, Reis A, Kossatz S (2015) Evaluation of genotoxicity and efficacy of at-home bleaching in smokers: a single-blind controlled clinical trial *Operative Dentistry* 40-2.

12. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development *Mutation Research* (271) 69-77.

13. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps *Mutation Research* (659) 93–108.

14. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M (2009) Buccal micronucleus cytome assay **4(6)** 825-837.

15. Angelieri F, De Cássia GMT, Carlin V, Oshima CT, Ribeiro DA (2010) Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue *Clinical Oral Investigation* **14(6)** 669-74.

16. Nersesyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S (2011) Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types *Mutagenesis* **26(2)** 295–301.

17. 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 Journal of Phatology and Microbiology* **55(4)** 433-438.

18. Oya Y, Yamamoto K, Tonomura A (1986) The biological activity of hydrogen peroxide I. Induction of chromosomotype aberrations susceptible to inhibition by scavengers of hydroxyl radicals in human embryonic fibroblasts *Mutation Research* **172(3)** 245-253.

19. Ziegler-Skylakakis K, Andrae U (1987) Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells *Mutation Research* **192(1)** 65-67.

20. Kleiman NJ, Wang R, Spector A (1990) Hydrogen peroxide-induced DNA damage in bovine lens epithelial cells *Mutation Research* (440) 35-45.

21. Fenech M, Crott J, Turner J, & Brown S (1999) Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesisblock micronucleus assay: Description of the method and results for hydrogen peroxide *Mutagenesis* **14(6)** 605-612.

22. Ribeiro DA, Marques MEA, Salvatori DMF (2005) Assessment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay *Journal of oral rehabilitation* **32(10)** 766-771.

23. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C (2005) Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues *British Dental Journal* **7(200)**.

24. Fernandez MR, Carvalho RV, Ogliari FA, Beira FA, Etges A, Bueno M (2010) Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: A comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth *International Endodontic Journal* **43(2)** 102-108.

25. Furukawa M, K-Kaneyama JR, Yamada M, Senda A, Manabe A, Miyazaki A (2015) Cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human gingival fibroblasts *in vitro* *Operative Dentistry* 40-2.

26. Weitzman SA, Weitberg AB, Stossel TP, Schwartz J, Shklar G (1986) Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters *Journal of Periodontology* **57(11)** 685-688.
27. Minoux M, Serfaty R (2008) Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects—A review *Quintessence International* **39(8)** 645-659.
28. Kurokawa Y, Takamura N, Matsushima Y, Imazawa T, Hayashi Y (1984) Studies on the promoting and complete carcinogenic activities of some oxidizing chemicals in skin *Carcinogenesis Cancer Letters* **24(3)** 299-304.
29. Takahashi M, Hasegawa R, Furukawa F, Toyoda K, Sato H, & Hayashi Y (1986) Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on gastric carcinogenesis in rats after initiation with N-methyl- N-nitro-N-nitrosoguanidine Japanese *Journal of Cancer Research* **77(2)** 118-124.
30. Marshall MV, Kuhn JO, Torrey CF, Fischman SL, Cancro LP (1996) Hamster cheek pouch bioassay of dentifrices containing hydrogen peroxide and baking soda *Journal of the American College of Toxicology* **15(1)** 45-61.
31. Collet AM, Palmieri M, Molinari B, Schwint AE, Itoiz ME (2001) Experimental study to test the potential tumor promotion effect of a tooth bleaching agent *Acta Odontologica Latinoamericana* **14(1-2)** 30-34.
32. Imazato S, McCabe JF, Tarumi H, Ehara A, Ebisu S (2001) Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR *Dental Materials* **17(2)** 178-183.

4. ARTIGO 2

O presente artigo será submetido ao periodico Clinical Oral Investigations (ISSN: 1436-3771), o qual apresentou classificação Qualis A2, em 2015 (ANEXO IV).

4.1 TÍTULO

Avaliação da genotoxicidade do clareamento em consultório com peróxido de carbamida 37% em dois protocolos de tratamento.

4.2 RESUMO

Objetivo: este ensaio clínico randomizado duplo cego avaliou o potencial genotóxico do clareamento em consultório com gel a base de peróxido de carbamida (PC) em alta concentração utilizando dois protocolos de tratamento.

Materiais e Métodos: foram selecionados 28 pacientes, onde em delineamento de boca-dividida, na arcada superior foi realizado o clareamento dentário com aplicação prévia da barreira gengival fotopolimerizável, formando o subgrupo PCCBG, e em paralelo, na arcada inferior sem a aplicação da barreira gengival, formando o subgrupo PCSBG. Duas sessões de clareamento dentário foram realizadas com o intervalo de uma semana entre elas. Foram realizadas coletas de esfregaço da região gengival, a partir da técnica de citologia esfoliativa, no *baseline*, 14 e 37 dias após o início do tratamento. O protocolo de tratamento das lâminas foi aplicado imediatamente após a coleta do esfregaço e a genotoxicidade foi aferida a partir do teste de micronúcleos (MN).

Resultados: Analisando os grupos como amostras independentes, realizou-se o teste Kruskal-Wallis de igualdade de populações, mostrando que não houve diferença entre eles comparando os três pontos de seguimento, apresentando $P = 0,8721$.

Conclusão: Ambos os protocolos não apresentaram pontecial genotóxico.

Relevância clínica: Os resultados deste estudo indicaram que o gel de PC em alta concentração não induziu danos ao DNA no tecido gengival durante os períodos avaliados.

Palavras-chaves: Ensaio Clínico, Clareamento Dentário, Teste de Micronúcleos, Genotoxicidade.

4.3 INTRODUÇÃO

A demanda pública pela odontologia estética, incluindo o clareamento dentário, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos [1]. Os sistemas de clareamento dentário contemporâneos são principalmente compostos por peróxido de hidrogênio (PH) ou um dos seus precursores, o peróxido de carbamida (PC) [2,3]. Quimicamente, o PC é composto de cerca de 3,5 partes de PH e 6,5 partes de ureia [3,4].

Os dois procedimentos mais comumente utilizados são o clareamento de consultório e o clareamento caseiro prescrito e acompanhado pelo cirurgião-dentista. O modo de clarear varia no consultório com uma maior concentração de peróxido por um curto período e no clareamento caseiro com uma concentração muito menor de peróxido, mas por um período mais longo [5].

Os peróxidos de alta concentração têm demonstrado potenciais efeitos adversos em estudos com animais e humanos, desde a sensibilidade dos dentes, a alteração da morfologia superficial do esmalte, a redução da resistência adesiva dos materiais de resina até a carcinogenicidade, [4] associada ao potencial genotóxico [6].

Os efeitos genotóxicos do peróxido de hidrogênio são o resultado da formação de radicais livres que podem danificar um número de estruturas intracelulares [7]. O DNA de células expostas a agentes químicos ou físicos pode ser danificado formando fragmentos cromossômicos, chamados de MN, que são observados como resultado de mitoses atípicas. Dependendo da extensão do dano celular, as conseqüências podem incluir comprometimento do ciclo celular, morte celular e até mesmo formação de uma neoplasia [8,9]. O teste de MN em células esfoliadas é uma técnica de avaliação de genotoxicidade promissora, minimamente invasiva, e simples para o estudo de carcinógenos epiteliais [7, 10].

Embora os efeitos de agentes clareadores sobre os tecidos duros já tenham sido profundamente investigados, a resposta dos tecidos moles a estes agentes ainda permanece desconhecida nos seres humanos [11]. Portanto, o objetivo deste ensaio clínico controlado duplo-cego foi avaliar o potencial genotóxico de um agente clareador de consultório e sua segurança clínica dentro de dois diferentes protocolos de tratamento.

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Universidade do Amazonas (FUA-UFAM) para pesquisa envolvendo seres humanos,

CAAE 47411515.8.0000.5020. Foram excluídos pacientes grávidas ou lactantes, tabagistas, ex-tabagista e usuários de aparelho ortodôntico fixo.

4.4.1 Cálculo do tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi baseado na frequência de MN (MN) por 1000 células. Em um estudo prévio observou-se que a frequência normal de MN é de aproximadamente $1 \pm 1,1$ [6]. Com esse embasamento, o cálculo amostral do estudo foi realizado por meio do site www.sealedenvelope.com. E, dessa forma, 26 pacientes foram necessários para que se tivesse uma possibilidade de 90% de detectar, com significância ao nível de 5%, um aumento da medida do resultado primário a partir de 1 no grupo controle para 2 no grupo experimental.

4.4.2 Grupos experimentais

Para este experimento foi utilizado um gel a base de PC em alta concentração. O fabricante deste gel oferece uma opção de protocolo inovadora, onde dispensa a necessidade da utilização da barreira gengival de resina fotopolimerizável previamente ao clareamento. Porém, em busca de segurança dentro da prática clínica, muitos profissionais ainda optam por utilizá-la. Dentro deste paradigma foram avaliados dois protocolos de tratamento: clareamento dentário em consultório com a aplicação prévia da barreira gengival de resina fotopolimerizável e sem a aplicação prévia da barreira gengival de resina fotopolimerizável.

Foram inclusos neste estudo 28 pacientes dentro no delineamento de boca-dividida.

4.4.3 Procedimento clareador

O clareamento foi realizado com o gel clareador Power Bleaching Office® (BM4, Brazil), contendo 37% de PC, na arcada superior por um período de 45 minutos consecutivos (sem a substituição ou renovação do gel), conforme as instruções do fabricante, com a aplicação prévia da barreira gengival de resina fotopolimerizável (Top Dam® - FGM, Joinville, Brazil), fotopolimerizada por 30s, formando o grupo PCCBG. Paralelo a isso, na arcada inferior foi realizado o mesmo protocolo, porém, sem a aplicação barreira gengival de resina fotopolimerizável (subgrupo PCSBG).

Foram realizadas duas sessões de clareamento dentário com intervalo de 1 semana entre elas.

4.4.4 Coleta de amostras para MN em células esfoliadas

Uma amostra de células esfoliadas da mucosa foi coletada imediatamente antes da primeira sessão de clareamento (*baseline*), 7 dias após a segunda sessão de clareamento (D14) e 37 dias após o início do tratamento (D37).

O paciente foi orientado a realizar um bochecho com água potável por 1 minuto previamente à coleta do esfregaço, que foi realizado em tecido gengival com uma escova cervical descartável® (Labor Import, Paraná, Brazil). A escova foi friccionada firmemente, sem muita pressão, uma vez em sentido único e em movimento rotatório, na extensão dos elementos que foram submetidos ao clareamento. Em seguida, o esfregaço foi distribuído em lâmina de vidro, novamente em sentido único e movimento rotatório, e seco com jato de ar de seringa tríplice por um minuto em uma distância de 30 cm, a fim de evitar a desidratação excessiva das células.

4.4.5 Protocolo de coloração

O protocolo de coloração foi aplicado imediatamente após a coleta. Os esfregaços foram fixados em 80% de metanol por 1 minuto. Em seguida, o corante Giemsa (Newprov, Paraná, Brazil) foi aplicado sobre as lâminas com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, por um minuto. As lâminas foram lavadas em dois recipiente com água (recipiente 1 = 3 a 4 lavagens, recipiente 2 = 2 a 3 lavagens). Após esse processo, foram aplicadas de 2 a 3 gotas do adesivo Entellan® (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) sobre esfregaço visivelmente seco para posicionamento da lamínula de vidro [7, 10].

O protocolo de coleta e coloração foi realizado por uma terceira de pessoa, de forma que a mesma durante a montagem das lâminas fez o uso de legendas de identificação (A e B), que representavam o protocolo de tratamento realizado, com a finalidade de cegamento do examinador

4.4.6 Avaliação das lâminas

Dois examinadores foram treinados e submetidos a uma calibração intra-examinador. Seus graus de concordância foram verificados através do índice Kappa. Esta

calibração foi realizada por meio da análise de 10 fotos de esfregaços de mucosa bucal com a identificação de variáveis de leitura a serem observados no estudo. As mesmas foram codificadas e rerepresentadas ao examinador após 7 dias e em ordem aleatória. Após a segunda leitura, foi determinado o coeficiente Kappa intra-examinador, os quais foram: 0,824 e 1,000. Só então, as leituras das lâminas foram iniciadas.

A contagem das células foi realizada sob um microscópio óptico (Coleman, moledo N701®) com 100x de magnificação, e quando os MN foram encontrados, a magnificação aumentou para 400x. Cada amostra foi avaliada em 1000 células por cada período (baseline, D14, D37).

Os critérios para inclusão na contagem total de células foram: 1) Citoplasma intacto e em posição relativamente plana; 2) Pequena ou nenhuma sobreposição de células; 3) Pouco ou nenhum detrito; 4) Núcleo normal e intacto, com perímetro liso e distinto. E os parâmetros para identificação de MN foram: 1) Arredondados com perímetro liso sugestivo de membrana; 2) Ter menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas grande o suficiente para discernir a forma e a cor; 3) Intensidade de coloração similar a do núcleo; 4) Textura similar à do núcleo; 5) Estar no mesmo plano focal do núcleo; 6) Ausência de sobreposição com o núcleo; 7) Não ter ponte com o núcleo. (Figura 1) Morte ou degeneração celular (cariólise, cariorrexe, fragmentação nuclear) serão excluídos da avaliação.

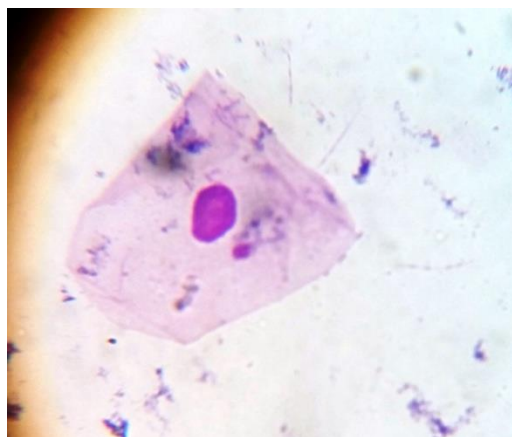


Figura 2 - Célula esfoliada apresentando MN

4.4.7 Análise estatística

A frequência de MN foi tabulada utilizando o programa Excel (Microsoft corporation, EUA). Foi realizado o teste Shapiro-Wilk para análise de normalidade dos

dados e o teste de Kruskal-Wallis de igualdade-de-populações, para comparar os protocolos e tempos testados.

Tabela 1: Características Demográficas dos Participantes

Idade (média +- desvio padrão)	25.5 +- 6.59
Sexo (masculino, %)	46.15%

4.5 RESULTADOS

Dos vinte e oito pacientes recrutados para este experimento, houve perda de seguimento de 2 pacientes (Tabela 1), por motivos alheios à pesquisa. Os resultados encontrados demonstraram ausência de potencial genotóxico nos grupos testados.

A figura 02 mostra a análise descritiva da presença de MN em ambos os grupos, mostrando que não houve diferença entre as taxas encontradas entre eles nos períodos analisados.

Analisando os dois grupos como amostras independentes, realizou-se o teste Kruskal-Wallis de igualdade de populações, mostrando que não houve diferença estatística

Tabela 2: Mediana e Variação Interquartil da Frequência de MN

	Baseline			D14			D37			p-valor
	N	M	IQR	N	M	IQR	N	M	IQR	
PCCBG	26	1	1	26	1	2	26	1	1	0.8721
PCSBG	26	1	2	26	1	1	26	1	1	

Não houve diferença estatística entre os grupos ou seus tempos de análise ($p = 0.8721$). N: Número de indivíduos; M: Mediana; IQR: Intervalo interquartil

entre eles comparando os três pontos de seguimento (*baseline*, 14 dias e 37 dias) ($P = 0,8721$) (Tabela 2).

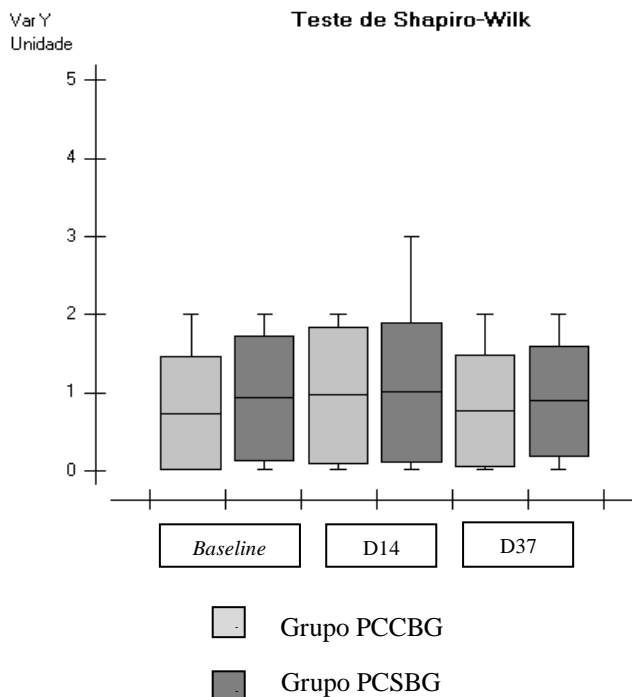


Figura 2 – Taxa da presença de MN no *baseline*, D14 e D37 com aplicação do gel a base de PC 37% com e sem barreira gengival. Houve anormalidade na distribuição dos dados em todos os tempos.

4.6 DISCUSSÃO

Durante o clareamento dentário, o PC se decompõe em PH e uréia, que são então dissociadas em oxigênio, água, amônia, dióxido de carbono e espécies reativas de oxigênio que são consideradas agentes potencialmente carcinogênicos capazes de causar danos às proteínas e alterações no núcleo celular [3, 8, 12].

O *ensaio* de MN com bloqueio da *citocinese*, com a capacidade de detectar alterações estruturais e numéricas cromossômicas nos linfócitos periféricos humanos, é o método mais bem validado para monitorar a exposição recente de indivíduos a agentes genotóxicos químicos e físicos [13]. Porém, o uso de células supletivas, com exceção dos linfócitos, tais como as células esfoliadas de tecidos epiteliais, é de particular interesse porque podem ser recolhidas com métodos não invasivos [13-15].

O teste de MN em células epiteliais orais humanas é uma técnica citogenética minimamente invasiva e relativamente simples que pode detectar danos ao genoma em

células primariamente expostas de organismos vivos. Nos últimos anos, a formação de MN em células epiteliais orais está sendo cada vez mais utilizada como biomarcador de exposição a vários agentes genotóxicos e uma correlação significativa com o risco de câncer foi demonstrada [7, 14, 16-18].

Nesta pesquisa foram realizadas um total de 3 coletas de esfregaço através da citologia esfoliativa. A primeira realizada no *baseline*, foi utilizada como controle, uma vez que a exposição ainda não havia sido realizada. A segunda, foi realizada 14 dias após o início do tratamento, com o objetivo de se obter um intervalo seguro para manifestação de alteração celular expressa na camada superficial., levando em consideração que novas células, que são produzidas na camada basal, por mitose migram para a superfície substituindo as que foram perdidas, em um intervalo de 7 a 10 dias, segundo Holland et al (2008) [14] e De Almeida et al (2014) [8] e entre 7 a 21 dias de acordo com Thomas et al (2009) [19]. E a terceira, objetivando avaliar a perpetuação dos danos causados, uma vez que em seus resultados, De Almeida et al (2014) [8] encontraram uma diminuição no número de células com MN no intervalo de 24 dias após o fim de tratamento com clareamento caseiro, sugerindo que as lesões primárias no DNA foram reparadas, foi realizada 45 dias após o início do tratamento.

O único estudo *in vivo* em seres humanos avaliando genotoxicidade de um agente clareador de alta concentração, já publicado, conduzido por Klaric e colaboradores (2013) [7], apresentou potencial genotóxico estatisticamente significativo e seus pesquisadores chegaram a conclusão de que a barreira gengival fotopolimerizável pode ter contribuído para esse resultado, uma vez que contém monómeros de metacrilato que possuem potencial efeito genotóxico. Portanto, para este estudo foram utilizados dois protocolos de tratamento: o protocolo tradicional, realizado com aplicação prévia da barreira gengival de resina fotopolimerizável, e um protocolo inovador, oferecido pelo fabricante do gel clareador Power Bleaching Office (BM4, Brazil), o qual dispensa a obrigatoriedade da barreira gengival previamente ao tratamento.

Os dois grupos testados neste estudo foram submetidos ao teste de MN em células epiteliais orais humanas e não demonstraram potencial genotóxico, apresentando $P = 0,8721$. Portanto, a hipótese nula de que não haveria potencial genotóxico provocado às células da mucosa oral através do clareamento de consultório, foi aceita para ambos os protocolos

Segundo um estudo multicêntrico de Bonassi et al (2011) [20] com 30 laboratórios em todo o mundo, que analisou 5000 indivíduos para a formação de MN e outras anomalias nucleares, a frequência espontânea de micronúcleos em células esfoliadas bucais humanas está entre 0,3% e 1,7%. Outros achados da literatura afirmam que a frequência de MN na mucosa oral normal é entre 0,5 e 2,0 / 1000 células [6, 21-23]. Nossos níveis de MN no *baseline* e até nas amostras expostas, apresentam-se dentro desses valores basais, com exceção de 0,64% das contagens que apresentaram 3,0 / 1000 células.

Nossos resultados concordam com a conclusão de Goldberg et al (2010) [9], que em condições clínicas, as concentrações diárias baixas de produto clareador usado para produzir clareamento dentário não geram efeitos tóxicos agudos e subagudos gerais. A genotoxicidade e a carcinogenicidade só ocorrem em concentrações que nunca são atingidas durante os tratamentos dentários. Além disso, o clareamento de consultório, particularmente, apresenta as vantagens de ser um tratamento assistido pelo cirurgião-dentista e com controle na aplicação, apresentando maior precisão de que o gel não ficará disposto diretamente sobre o tecido mole. Isso ocorreu mesmo no grupo PCSBG, onde pela consistência e firmeza do gel, era totalmente possível o seu controle sobre os tecidos duros. Em raras ocasiões, por descuido do operador, o gel atingiu contato íntimo com a região gengival, sendo removido imediatamente.

Além disso, os clareamentos em consultório apresentam protocolos variando entre 2 a 6 sessões de aplicação de gel com intervalo máximo de 50 minutos, dependendo da marca comercial, o que reduz a quantidade e o tempo de exposição do agente durante o tratamento.

Levando em consideração que o requisito mais importante de um material a ser utilizado em aplicações médicas é a sua biocompatibilidade [24], neste estudo constatou-se segurança na prática clínica do clareamento em consultório. Ainda são escassos na literatura estudos *in vivo* em seres humanos, o que limita as comparações deste estudo. Sendo assim, novos estudos devem ser conduzidos com outros agente clareadores e outros protocolos.

4.7 CONCLUSÃO

Ambos os protocolos não apresentaram pontencial genotóxico. É possível afirmar que o clareamento com o gel Power Bleaching Office (BM4, Brazil) contendo 37% sem a

aplicação prévia da barreira gengival possui uso clínico seguro quando empregados conforme condições avaliadas no estudo. São necessários mais estudos clínicos abrangendo essa área de estudo.

4.8 REFERÊNCIAS

1. Kihn PW (2007) Vital Tooth Whitening. *Dental Clin N Am* 51(319):31.
2. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C (2005) Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *British Dental Journal* 7(200).
3. Li Y (2011) Safety Controversies in Tooth Bleaching. *Dent Clin N Am*, (55):.255–263.
4. Thakur R, Shigli AL, Sharma DS, Thakur G (2015) Effect of Catalase and Sodium Fluoride on Human Enamel bleached with 35% Carbamide Peroxide. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 8(1):12-17.
5. Vano M, Derchi G, Barone A, Genovesi A, Covani U (2014) Tooth bleaching with hydrogen peroxide and nano-hydroxyapatite: a 9-month follow-up randomized clinical trial. *Int J Dent Hygiene*.
6. De Geus JI, Rezende M, Margraf Ls, Bortoluzzi Mc, Fernandez E, Loguercio Ad, Reis A, Kossatz S (2015) Evaluation of genotoxicity and efficacy of at-home bleaching in smokers: a single-blind controlled clinical trial. *Operative Dentistry* 40-2.
7. Klaric E, Par M., Profeta I, Kopjar N, Rozgaj R., Kasuba V, Zeljezic D, Tarle. Z (2013) Genotoxic effect of two bleaching agents on oral mucosa. *Cancer Genomics & Proteomics* (10):209-216.
8. Almeida LCAG, Soares DG, Gallinari MO, Costa CAS, Santos PH, Briso ALF (2014) Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols. *Clin Oral Invest* s00784-014-1285-3.
9. Goldberg M, Grootveld M, Lynch E (2010) Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. *Clin Oral Invest* (14):1–10.
10. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW (1992) Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research* (271): 69-77.
11. Minoux M, Serfaty R (2008) Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects —A review. *Quintessence International* 39(8):645-659.
12. Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF (2006) Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. *Braz Oral Res* 20(1):47-51, 2006.
13. Bolognesia C., Bonassib S., Knasmuellerc S., Fenech M., Bruzzonee M., Landoe C., Ceppi M (2015) Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutation Research* (766):20–31.
14. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M (2008) The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research* (659):93–108.
15. Nersesyanyan A., Kundi M., Fenech M., Bolognesi C., Misik M., Wultsch G., Hartmann M., Knasmueller S (2014) Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk. *Mutat. Res. Rev* (762):37–51.
16. Fenech M, Chang Wp, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S And Zeiger E (2003) HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 534(1-2):65-75.

17. Ceppi M, Biasotti B, Fenech M And Bonassi S (2010) Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutat Res*, 705(1):11-19.
18. Majer BJ, Laky B, Knasmuller S, Kassie F (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* (489):147–172.
19. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M (2009) Buccal micronucleus cytome assay 4(6):825-837.
20. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S (2011) The Human Micro Nucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res* 728(3):88-97.
21. Angelieri F, De Cássia GMT, Carlin V, Oshima CT, Ribeiro DA (2010) Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue. *Clin Oral Investig* 14(6):669-74.
22. Nersesyan A, Muradyan R, Kundi M, Knasmueller S (2011) Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis* 26(2):295–301.
23. 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 Phatol Microbiol* 55(4):433-438.
24. Tadin A, Galic N, Mladinic M, Marovic D, Kovacic I, Zeljezic D (2014) Genotoxicity in gingival cells of patients undergoing tooth restoration with two different dental composite materials. *Clin Oral Invest* (18):87–964.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados, pode-se concluir que:

I – Ambos os agentes, PH e peróxido de carbamida em alta concentração, apresentaram potencial genotóxico após duas sessões de clareamento de consultório.

II – A utilização da barreira gengival de resina fotopolimerizável em diferentes tempos de polimerização, assim como sua aplicação isoladamente, não apresentou genotoxicidade e não contribuiu para aumento nas taxas de contagem de MN.

6 . REFERÊNCIAS

ALMEIDA L. C. A. G., SOARES D. G., GALLINARI M. O., COSTA C. A. S., SANTOS P. H., BRISO A. L. F.; **Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols.** Clin Oral Invest, s00784-014-1285-3, 2014.

ANGELIERI F, DE CÁSSIA GONÇALVES MOLEIRINHO T, CARLIN V, OSHIMA CT, RIBEIRO DA. **Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and non-smokers submitted to panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue.** Clin Oral Investig. v. 14, n. 6, p. 669-74, 2010

ARALDI RP., MELO TC., MENDES TB., SA JUNIOR PL., NOZIMA BHN., ITO ET., CARVALHO RF., SOUZA EB., STOCCO RC.; **Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 72, p.74–82, 2015.

BHATIA A., KUMAR Y.; **Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications.** APMIS, v. 121, p. 569–581, 2012.

BLOCHING M., HOFMANN A., LAUTENSCHLAE C.H., BERGHAUS A., GRUMMT T.; **Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay.** Oral Oncology, v.36, p.550-555, 2000.

BOLOGNESIA C., BONASSIB S., KNASMUELLERC S., FENECH M., BRUZZONEE M., LANDOE C., CEPPI M. **Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis.** Mutation Research, v. 766, p. 20–31, 2015.

BONASSI S, COSKUN E, CEPPI M, LANDO C, BOLOGNESI C, BURGAZ S. **The Human Micro Nucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol.** Mutat Res, n. 728, v. 3, p. 88-97, 2011

BOUILLAGUET S., SHAW L., GONZALEZ L., WATAHA J.C., KREJCI I.; **Long-term cytotoxicity of resin-based dental restorative materials.** Journal of Oral Rehabilitation, v.29, p.7-13, 2002.

CEPPI M, BIASOTTI B, FENECH M AND BONASSI S. **Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues.** Mutat Res, n. 705, v. 1, p. 11-19, 2010.

COLLET AM, PALMIERI M, MOLINARI B, SCHWINT AE, & ITOIZ ME. **Experimental study to test the potential tumor promotion effect of a tooth bleaching agent.** Acta Odontologica Latinoamericana, n. 14, v. 1-2, p. 30-34, 2001.

DE GEUS J.L., REZENDE M., MARGRAF L.S., BORTOLUZZI M.C., FERNANDEZ E., LOGUERCIO A.D., REIS A., KOSSATZ S.; **Evaluation of Genotoxicity and Efficacy of**

At-home Bleaching in Smokers: A Single-blind Controlled Clinical Trial. Operative Dentistry, p.40-2, 2015.

DAHL J.E., PALLESEN U.; **Tooth Bleaching— A Critical Review Of The Biological Aspects.** Crit Rev Oral Biol Med, n.14, v.4, p.292-304, 2003.

FENECH M, CROTT J, TURNER J, & BROWN S. **Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesisblock micronucleus assay: Description of the method and results for hydrogen peroxide.** Mutagenesis, n. 14, v. 6, p. 605-612, 1999.

FENECH M, CHANG WP, KIRSCH-VOLDERS M, HOLLAND N, BONASSI S AND ZEIGER E. **HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures.** Mutat Res, n. 534, v. 1-2, p. 65-75, 2003.

FENECH M, HOLLAND N, ZEIGER E, CHANG WP, BURGAS S, THOMAS P, BOLOGNESI C, KNASMUELLER S, KIRSCH-VOLDERS M., BONASS S. **The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future.** Mutagenesis, n. 1, v. 26, p 239–245, 2011.

FERNANDEZ MR, CARVALHO RV, OGLIARI FA, BEIRA FA, ETGES A, & BUENO M. **Cytotoxicity and genotoxicity of sodium percarbonate: A comparison with bleaching agents commonly used in discoloured pulpless teeth International.** Endodontic Journal, n. 43, v. 2, p. 102-108, 2010.

FURUKAWA M., K-KANEYAMA JR., YAMADA M., SENDA A., MANABE A., MIYAZAKI A.; **Cytotoxic Effects of Hydrogen Peroxide on Human Gingival Fibroblasts *In Vitro*.** Operative Dentistry, p.40-2, 2015.

GHALILI M., KHAWALED K., ROZEN D., AFSABI V.; **Clinical study of the safety and effectiveness of a novel over-the-counter bleaching tray system.** Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry, v.6, p.15–19, 2014.

GOLDBERG M., GROOTVELD M., LYNCH E.; **Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review.** Clin Oral Invest, v.14, p.1–10, 2010.

IMAZATO S, MCCABE JF, TARUMI H, EHARA A & EBISU S. **Degree of conversion of composites measured by DTA and FTIR.** Dental Materials, n. 17, v. 2, p. 178-183, 2001.

KIHN PW. **Vital Tooth Whitening.** Dental Clin N Am, n. 51, v. 319, p. 31.

HOLLAND N., BOLOGNESI C., KIRSCH-VOLDERS M., BONASSI S., ZEIGER E., KNASMUELLER S., FENECH M.; **The micronucleus assay in human buccal cells as a**

tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. Mutation Research, v.659, p. 93–108, 2008.

KLARIC E., PAR M., PROFETA I., KOPJAR N., ROZGAJ R., KASUBA V., ZELJEZIC D., TARLE. Z.; **Genotoxic Effect of Two Bleaching Agents on Oral Mucosa.** Cancer Genomics & Proteomics, v.10, p.209-216, 2013.

KLEIMAN NJ., WANG R., SPECTOR A.; **Hydrogen peroxide-induced DNA damage in bovine lens epithelial cells.** Mutat Res, v.440, p.35-45, 1990.

KUROKAWA Y, TAKAMURA N, MATSUSHIMA Y, IMAZAWA T, & HAYASHI Y. **Studies on the promoting and complete carcinogenic activities of some oxidizing chemicals in skin.** Carcinogenesis. Cancer Letters, n. 24, v 3, p. 299-304, 1984.

LI Y. **Biological properties of peroxide-containing tooth whiteners.** Food Chem Toxicol, n. 34, v.9, p. 887-904, 1996.

LI Y.; **Safety Controversies in Tooth Bleaching.** Dent Clin N Am, v.55, p.255–263, 2011.

LUCIER R. N., ETIENNE O., FERREIRA S., GARLICK J. A., KUGEL G., EGLES C.; **Soft-Tissue Alterations Following Exposure to Tooth-Whitening Agents.** J Periodontol, v.84, p.513-519, 2013.

MAJER B.J., LAKY B., KNASMULLER 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, v.489, p.147–172, 2001.

MARSHALL MV, KUHN JO, TORREY CF, FISCHMAN SL,& CANCRO LP. **Hamster cheek pouch bioassay of dentifrices containing hydrogen peroxide and baking soda.** Journal of the American College of Toxicology, n. 15, v. 1, p, 45-61, 1996.

MINOUX M, & SERFATY R. **Vital tooth bleaching: Biologic adverse effects—A review.** Quintessence International, n. 39, v. 8, p. 645-659, 2008.

MUNRO I.C., WILLIAMS G.M., HEYMANN H.O., KROES R.; **Tooth whitening products and the risk of oral cancer.** Food and Chemical Toxicology, v.44, p.301–315, 2006.

NADERI NJ., FARHADI S., SARSHAR S. **Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years.** Indian J Phatol Microbiol,v. 55, n. 4, p. 433-438, 2012.

NAIK S., TREDWIN C. J., SCULLY C.; **Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis.** Oral Oncology, v.42, p.668– 674, 2006.

NERSESYAN A., KUNDI M., ATEFIE K., SCHULTE-HERMANN R., KNASMULLER S. **Effect of Staining Procedures on the Results of Micronucleus Assays with Exfoliated Oral Mucosa Cells.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, n. 15 v. 10, 2006.

NERSESYAN A., MURADYAN R. , KUNDI M., KNASMUELLER S. **Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types.** Mutagenesis, v. 26, n. 2 p. 295–301, 2011.

NERSESYAN A., KUNDI M., FENECH M., BOLOGNESI C., MISIK M., WULTSCH G., HARTMANN M., KNASMUELLER S. **Micronucleus assay with urine derived cells (UDC): a review of its application in human studies investigating genotoxin exposure and bladder cancer risk.** Mutat. Res. Rev., v. 762, p. 37–51 2014.

OYA Y, YAMAMOTO K, & TONOMURA A. **The biological activity of hydrogen peroxide I. Induction of chromosomotype aberrations susceptible to inhibition by scavengers of hydroxyl radicals in human embryonic fibroblasts.** Mutation Research, n. 172, v. 3, p. 245-253, 1986.

PLIGINA K. L., RODINA I. A., SHEVCHENKO T. V., BEKCHANOVA E. S., TIKHONOV V. P., SIROTA N. P.; **DNA-Damaging Effects of Dental Bleaching Agents.** Bulletin of Experimental Biology and Medicin, n.1, v.153, p. 65-69, 2012.

RIBEIRO DA, MARQUES MEA, & SALVATORI DMF. **Assessment of genetic damage induced by dental bleaching agents on mouse lymphoma cells by single cell gel (comet) assay.** Journal of Oral Rehabilitation, n. 32, v. 10, p. 766-771, 2005.

RIBEIRO DA, MARQUES MEA, SALVADORI DMF. **Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro.** Braz Oral Res, n. 20, v.1, p. 47-51, 2006.

ROTH JM., RESTANI RG., GONÇALVES TTS., SPHOR SIS., NESS AB., MARTINO-ROTH MG., GARCIA GL. **Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test.** Genetics and Molecular Research, n. 7, v. 2, p. 433-443, 2008.

SHASHIKALA R., INDIRA AP., MANJUNATH GS., ARATHIRAO K., AKSHATHA BK. **Role of micronucleus in oral exfoliative cytology.** JPharmBioalliedSci, n. 7, v. 2, p.S409–S413, 2015.

TADIN A., GALIC N., MLADINIC M., MAROVIC D., KOVACIC I., ZELJEZIC D.; **Genotoxicity in gingival cells of patients undergoing tooth restoration with two different dental composite materials.** Clin Oral Invest, v.18, p.87–96, 2014.

TAKAHASHI M, HASEGAWA R, FURUKAWA F, TOYODA K, SATO H, & HAYASHI Y. **Effects of ethanol, potassium metabisulfite, formaldehyde and hydrogen peroxide on**

gastric carcinogenesis in rats after initiation with N-methyl- N-nitro-N-nitrosoguanidine Japanese. Journal of Cancer Research, n. 77, v.2, p. 118-124, 1986.

THAKUR R., SHIGLI AL., SHARMA DS., THAKUR G. Effect of Catalase and Sodium Fluoride on Human Enamel bleached with 35% Carbamide Peroxide. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, n.8, v.1, p.12-17, 2015.

THOMAS P, HOLLAND N, BOLOGNESI C, KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S, ZEIGER E, KNASMUELLER S & FENECH M.. **Buccal micronucleus cytome assay.** Nature Protocols, n. 4, v.6, p. 825-837, 2009.

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.

TREDWIN C. J., NAIK S., LEWIS N. J., SCULLY C.; **Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues.** British Dental Journal, n.7 v.200, 2005.

VANO M., DERCHI G., BARONE A., GENOVESI A., COVANI U.; **Tooth bleaching with hydrogen peroxide and nano-hydroxyapatite: a 9-month follow-up randomized clinical trial.** Int J Dent Hygiene, 2014.

WEITZMAN SA, WEITBERG AB, STOSSEL TP, SCHWARTZ J, & SHKLAR G. **Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters.** Journal of Periodontology, n. 57, v. 11, p. 685-688, 1986.

ZIEGLER-SKYLAKAKIS K, & ANDRAE U. **Mutagenicity of hydrogen peroxide in V79 Chinese hamster cells.** Mutation Research, n. 192, v. 1, p. 65-67, 1987.

APÊNDICE I

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

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Convidamos o (a) Sr (a) para participar da Pesquisa “EFETIVIDADE DO CLAREAMENTO COM PC A 37% COM E SEM ATIVAÇÃO SÔNICA E EFEITO GENOTÓXICO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO”. A pesquisa será dirigida sob a responsabilidade do pesquisador Leandro de Moura Martins e pretende avaliar se o uso de um aparelho com ativação com luz influenciará na eficácia do clareamento dentário de consultório, bem como, avaliar a possível toxicidade que os agentes clareadores podem exercer sobre as células do tecido gengival.

Sua participação como paciente submetido ao clareamento dentário de consultório é voluntária e funcionará da seguinte maneira: dois produtos serão estudados, portanto, existirão dois grupos de pacientes, e você não poderá escolher ou saber em qual grupo será alocado, pois a distribuição será aleatória e de grande importância para este estudo. Serão realizadas duas sessões de clareamento, com o intervalo de uma semana, nas clínicas odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), e uma terceira consulta será realizada para avaliação. A toxicidade será avaliada pela técnica de citologia esfoliativa, que é um procedimento de raspagem superficial da gengiva com auxílio de uma espátula, mas sem causar feridas ou sangramentos, e sempre será realizada antes do procedimento clareador, bem como na sessão de avaliação. Todos esses procedimentos aos quais será submetido são seguros, consagrados na prática clínica e serão realizados por profissionais capacitados.

Dentre os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa estão: sensibilidade dental e irritação gengival. Caso esses ocorram, você tem garantia de que o clareamento poderá ser imediatamente suspenso e que tratamentos específicos para eliminar e/ou reduzir o desconforto serão imediatamente aplicados, por meio do uso de anti-inflamatórios. Os seus dentes também poderão apresentar-se inicialmente manchados como resultado de clareamento não uniforme, mas que este aspecto vai se modificar em semanas, mostrando aspecto uniforme ao final do tratamento. O benefício desta pesquisa será a melhora estética no sorriso.

Se depois de consentir em sua 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 sua identidade 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. Waldemar Pedrosa (antiga Av. Ayrão), 1539 - Centro, pelo telefone (92) 3305-4901, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM, na Rua Teresina, 495, Adrianópolis, Manaus-AM, telefone (92) 3305-1181.

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.

_____,
Manaus, _____/_____/____

(NOME DO PACIENTE)

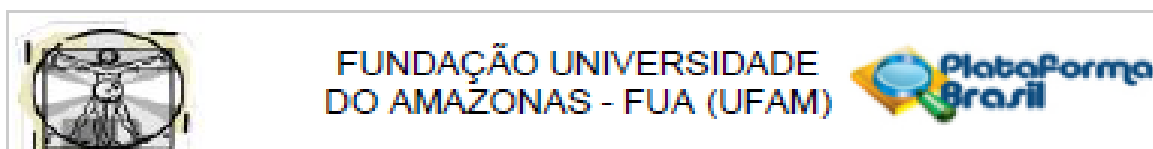
Prof. Leandro de Moura Martins

APÊNDICE II

PRODUTO	COMPOSIÇÃO	PROCEDIMENTO CLÍNICO
<p>Power Bleaching Office 37% (BM4, Palhoça, SC, Brazil)</p>	<p>PC a 37%, oxalato de potássio, fluoreto de sódio, espessante, neutralizante, conservante, umectante e água purificada.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inserir o afastador labial; 2. Aplicar uma gota do gel no centro da face vestibular dos dentes e distribuir o gel com a ponta aplicadora, pincel, ou com aplicador descartável; 3. Aplicar o protetor gengival fotopolimerizável 4. Deixar o produto em repouso por 45 minutos consecutivos; 5. Remover o gel e lavar os dentes
<p>Opalescence Boost 38% (ULTRADENT, Brazil)</p>	<p>PH a 38%, espessante, corante, neutralizante, gluconato de cálcio, glicol e água.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inserir o afastador labial; 2. Aplicar o protetor gengival fotopolimerizável; 3. Misturar as duas fases do gel com as seringas conectadas, empurrando os êmbolos 4 vezes para cada lado (8 vezes no total); 4. Empurrar todo o conteúdo misturado para uma das seringas; 5. Com o auxílio de uma ponteira, espalhar o gel sobre a vestibular dos dentes, formando uma

		<p>camada entre 0,5 e 1 mm de espessura;</p> <p>6.Deixar o gel atuando por 40 min e agitar o produto a cada 5 ou 10 min para a liberação de bolhas;</p> <p>7.Aspirar o excesso de gel, lavar os dentes e remover a barreira gengival.</p>
--	--	---

ANEXO I



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFETIVIDADE DO CLAREAMENTO COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA A 37% COM E SEM ATIVAÇÃO SÔNICA E EFEITO GENOTÓXICO: UM ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Pesquisador: Leandro de Moura Martins

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 47411515.8.0000.5020

Instituição Proponente: Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.228.431

Apresentação do Projeto:

Resumo:

Este projeto tem como objetivo avaliar a efetividade do clareamento com peróxido de carbamida a 37% utilizando dois protocolos de aplicação, com e sem ativação sônica. Serão selecionado para este estudo, randomizado duplo-cego, 60 pacientes voluntários com coloração C2 ou mais escuro, nos quais serão realizadas duas sessões de clareamento com um intervalo de uma semana utilizando um gel de peróxido de hidrogênio a 35%

(controle) e peróxido de carbamida 37% com e sem ativação sônica (experimental). Cada paciente receberá as duas formas de aplicação do gel clareador, no modelo de boca-dividida. A avaliação da mudança de cor será feita ao início, antes da segunda sessão, 7 dias após a segunda sessão, 30 dias após o final do tratamento clareador e para estudo de longevidade, após 3, 6, 12, 24 e 36 meses, usando um método subjetivo com a escala de cores Vita Classical e Vita Bleaching orientada por ordem de valor e um método objetivo com o espectrofotômetro EasyShade, a efetividade do clareamento será avaliada pela análise de variância a dois critérios e teste de Tukey. Os pacientes serão orientados ainda a registrar a percepção de sensibilidade dentária durante a primeira e segunda sessão de clareamento, utilizando a escala análoga visual (escala VAS), o risco absoluto de sensibilidade dentária (registrada pelo menos uma vez pelos pacientes) será

Endereço: Rua Teresina, 4050

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

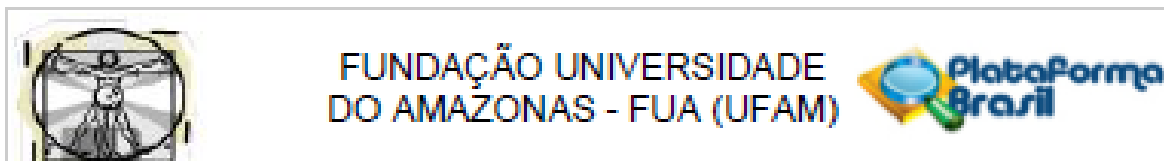
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3305-5130

Fax: (02)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.228.431

comparado pelo teste exato de Fisher e a intensidade da sensibilidade será avaliada pela análise de variância a dois critérios e teste de Tukey. A genotoxicidade dos géis de proteção gengival será avaliada por meio de avaliação de frequência de micronúcleos, através da técnica de citologia esfoliativa. As mudanças na qualidade de vida relacionada à saúde bucal (QVRSB) com o tratamento clareador e a sensibilidade dos Instrumentos OHIP-14 e OIDP em detectar estas mudanças, serão avaliadas pela diferença entre as médias dos escores QVRSB pré e pós-tratamento. A comparação dos escores QVRSB pré-tratamento, após 4 semanas; e pré-tratamento e após 8 semanas, será feita por meio do Teste-T pareado. A comparação da média dos escores QVRSB nos três tempos será feita pela ANOVA 2 fatores, considerando-se o fator tempo e o fator tratamento. O nível de significância adotado em todos os testes será de 5%.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

comparação com peróxido de hidrogênio a 35%, bem como o potencial genotóxico dos agentes e na qualidade de vida relacionada à saúde bucal (QVRSB) desses pacientes.

Objetivo Secundário:

Avaliar clinicamente a efetividade de pacientes adultos submetidos ao clareamento com peróxido de carbamida a 37% com e sem ativação sônica; Avaliar o risco absoluto de sensibilidade de pacientes adultos submetidos ao clareamento com peróxido de carbamida a 37% com e sem ativação sônica; Avaliar a intensidade da sensibilidade de pacientes adultos submetidos ao clareamento com peróxido de carbamida a 37% com e sem ativação sônica; Avaliar o potencial genotóxico do gel clareador peróxido de carbamida a 37% com e sem utilização de barreira gengival; Avaliar o potencial genotóxico do gel clareador peróxido de hidrogênio a 35%, com utilização de barreira gengival em diferentes tempos de polimerização; Avaliar o potencial genotóxico da barreira gengival isoladamente; Analisar as diferenças em cada domínio dos Instrumentos usados para avaliar a qualidade de vida relacionada à saúde bucal pós-clareamento entre os dois grupos; Explorar a associação entre a qualidade de vida relacionada à saúde bucal pós-clareamento e o tratamento proposto, levando-se em conta variáveis explicativas, como idade, sexo, situação conjugal, escolaridade, renda familiar, auto-percepção quanto ao estado de saúde geral e variação da alteração de cor dentária (E); Comparar a sensibilidade e a responsividade de dois Instrumentos de avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde bucal (OHIP 14 e OIDP) no clareamento dental (pré e pós-tratamento).

Endereço: Rua Tereza, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

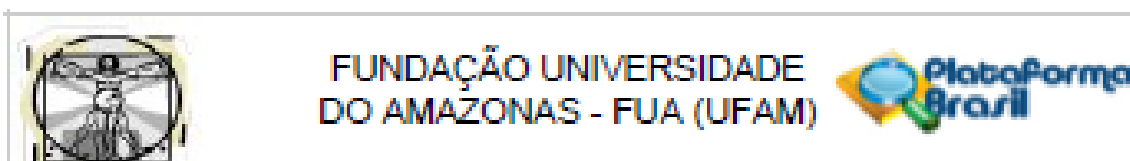
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.238.431

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os procedimentos a serem realizados são seguros e consagrados na prática clínica. Apesar disso, podem ocorrer alguns tipos de desconfortos temporários relatados pelos participantes como sensibilidade dentária e/ou irritação gengival. Caso o paciente relate qualquer tipo de desconforto, serão propostos tratamentos para eliminar e/ou reduzir o incômodo, ou até mesmo a suspensão do tratamento clareador. Além disso, poderá ocorrer inicialmente manchamento dos elementos dentários devido a um clareamento não uniforme, sendo este aspecto modificado ao longo das semanas e apresentando aspecto uniforme ao final do tratamento. Quanto aos questionários de qualidade de vida pode haver constrangimento por parte dos participantes que não serão obrigados a responder nenhuma das questões, caso não se sintam confortáveis. Além disso, 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. Considerando que esta pesquisa será realizada com o consentimento livre e esclarecido dos pacientes (TCLE), sob a supervisão de profissionais capacitados e busca avaliar técnicas já empregadas no mercado, o projeto não oferecerá maiores riscos físicos ou intelectuais aos pacientes.

Benefícios:

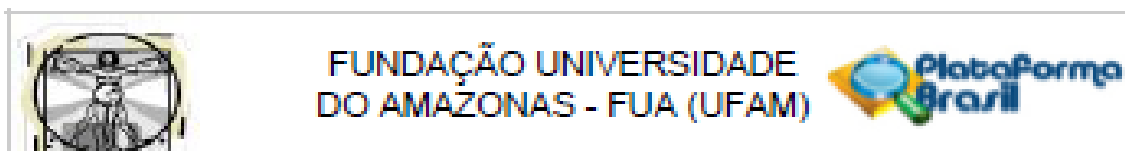
Para os participantes, haverá alteração estética da cor dos dentes e melhora na qualidade de vida com relação a auto estima dos participantes. Para os futuros pacientes, trará respostas ao Cirurgião-Dentista sobre o sucesso ou não dos procedimentos clínicos executados, Impulsionando o estudo de alternativas que viabilizem melhoras no atendimento, minimizando os efeitos adversos, e tratamento dos usuários da clínica que busquem este procedimento estético, mas, sobretudo, que melhorem a qualidade de vida dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

1. Metodologia Proposta:

Dois semanas antes dos procedimentos de clareamento, os voluntários selecionados da cidade de Manaus (Amazonas, Brasil) assinarão um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Em seguida, receberão uma triagem odontológica e profilaxia dental com pedra-pomes e água em taça de borracha. Um total de 56 participantes, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão, serão selecionados. Este cálculo amostral assumiu um nível de significância de 5% e poder de 90%. Os participantes serão submetidos a duas formas de

Endereço: Rua Teixeira, 4050
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.067-070
 UF: AM Município: MANAUS
 Telefone: (92)3305-5130 Fax: (92)3305-5130 E-mail: cep@ufam.edu.br



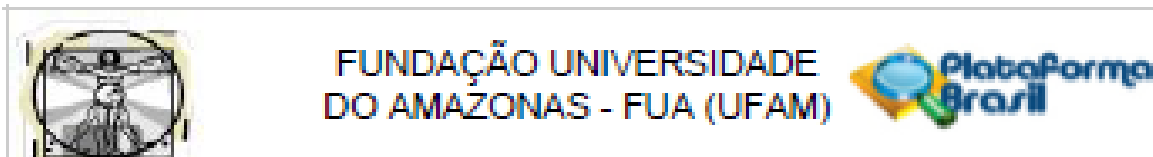
Continuação do Parecer: 1.228-401

aplicação do gel clareador (boca-dividida) em uma mesma sessão clínica. Um terceiro operador, que não está envolvido diretamente no protocolo de pesquisa, conduzirá o processo de randomização e registrará a alocação dos participantes de acordo com o gel, em cartões colocados em seqüência numerada, dentro de envelopes opacos e selados. Nem o paciente nem os avaliadores saberão qual o gel será aplicado e em qual hemiarco a ativação sônica foi realizada, antes dessa fase. O tecido gengival será isolado usando uma barreira gengival fotopolimerizada. Cada paciente receberá as duas formas de aplicação do gel clareador, no modelo de boca-dividida. No grupo PH35 com e sem ativação sônica por hemiarco, a aplicação do gel de peróxido de hidrogênio a 35% será feita em no arco superior por um período de 45 minutos, em cada sessão de clareamento. No grupo PC37 com e sem ativação sônica por hemiarco, a aplicação do gel de peróxido de carbamida a 37% será feita no arco superior, durante 45 minutos ininterruptos. O tecido gengival dos

dentes a serem clareados será isolado usando dois tipos de barreira de proteção gengival fotopolimerizável. O procedimento descrito acima será realizado em duas consultas com um intervalo de uma semana. Todos os participantes serão orientados a escovar os dentes regularmente com dentífrico fluoretado. A arcada inferior também será clareada, porém pelo método de clareamento caseiro e os dados desta arcada não serão coletados. Os pacientes serão orientados a registrar a percepção de sensibilidade dentária durante a primeira e segunda sessões de clareamento, utilizando a escala análoga visual (escala VAS). Esta escala utiliza uma régua horizontal de 0 a 10, onde 0 significa nenhuma dor, e 10, muita dor. Os pacientes deverão registrar se terão alguma experiência de dor em três momentos: 1- durante o tratamento até 1 hora após o clareamento; 2-entre 1 hora e 24 horas após o clareamento; e 3- entre 24 e 48 horas após o clareamento. No retorno de 7 e 30 dias, os pacientes deverão relatar se haverá sensibilidade. Como serão realizadas duas sessões de clareamento, a pontuação da escala será considerada para cada sessão para a análise estatística. Para avaliação do desfecho de QVRSB serão utilizados dois instrumentos: Oral Health Impact Questionnaire -14 (OHIP- 14) e o Oral Impact in Daily Performances (OIDP). Os pacientes submetidos ao tratamento clareador responderão aos questionários de avaliação de QVRSB em três momentos: no início do estudo (baseline); após uma semana do término do tratamento clareador; e 30 dias após o término do

tratamento clareador. A citologia estolativa será realizada 3 vezes: antes do procedimento de clareamento (T0), 14 dias após (T1) e ao final de 30 dias (T2). Uma espátula metálica será friccionada firmemente, com pouca pressão para não causar lesões ao tecido três vezes em um

Endereço:	Rua Teresina, 4060	CEP:	69.067-070
Bairro:	Achardópolis		
UF:	AM	Município:	MANAUS
Telefone:	(92)3305-5130	Fax:	(92)3305-5130
		E-mail:	cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.338.401

único sentido. Imediatamente após, o estregaço será distribuído sobre uma lâmina de vidro, e o mesmo será preparado para a contagem de micronúcleos formados. Morte ou degeneração celular (caríólise, caríomeiose, fragmentação nuclear) serão excluídos da avaliação.

Tamanho da Amostra no Brasil: 56

Critério de Inclusão:

Os pacientes a serem incluídos no estudo deverão apresentar idade a partir de 18 anos, dentes superiores livres de cárie e os anteriores superiores livres de restaurações na face vestibular, além de incisivos centrais ou caninos apresentando coloração G2 ou mais escura, avaliados em comparação com uma escala visual de cor orientada pelo valor dos dentes (Vita Classical, Vita-Zahnfabrik- Alemanha).

Critério de Exclusão:

Os indivíduos a serem excluídos da pesquisa, por sua vez, serão: grávidas ou lactantes, tabagistas, usuários de aparelho ortodôntico fixo, indivíduos com manchas intrínsecas graves nos dentes (manchas pelo uso de tetraciclina, fluorose e dentes despoipados), usuários de drogas com ação antiinflamatória e antioxidante e participantes com histórico prévio de sensibilidade dentária ou qualquer patologia associada (bruxismo, recessão gengival, lesão não cariosa com exposição de dentina), uma vez que estes não seriam pacientes elegíveis, de imediato, para um tratamento estético, tal como o clareamento dentário.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: ADEQUADA

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

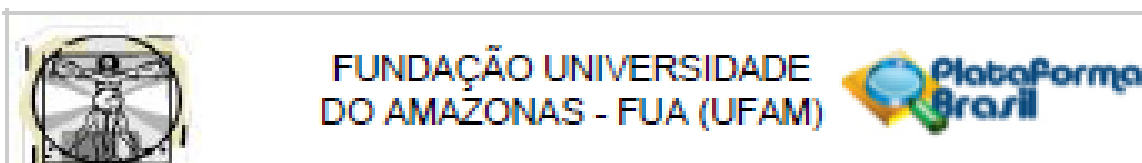
Pelo exposto, somos de parecer favorável que o projeto seja APROVADO, pois o pesquisador cumpriu todas as determinações da Res. 466/12.

É o parecer.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Tarasina, 4060	CEP: 69.067-070
Bairro: Adrianópolis	
UF: AM	Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-6130	Fax: (92)3305-6130
	E-mail: cep@ufam.edu.br



Continuação do Parecer: 1.208.401

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Questionários de qualidade de vida.docx	20/07/2015 15:58:32		Aceito
Outros	Ficha de Anamnese.pdf	20/07/2015 15:58:32		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	D-4.docx	20/07/2015 16:09:13		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NOVO TCLE.docx	20/07/2015 16:30:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto atualizado.docx	04/08/2015 17:58:50		Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoatualizada.pdf	14/09/2015 15:57:30	Leandro de Moura Martins	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_544961.pdf	14/09/2015 15:58:47		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

MANAUS, 15 de Setembro de 2015

Assinado por:

Ellana Maria Perreira da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4050

Bairro: Adianópolis

CEP: 69.067-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (021)3308-5130

Fax: (021)3308-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br

ANEXO II



FICHA DE ANAMNESE

IDENTIFICAÇÃO	
Nome:.....	
End. Residencial:..... n°.....	
Bairro:..... CEP:.....	
Cidade:..... Estado:.....	
Telefone(s) para contato:().....	
Telefone(s) para contato:().....	
Email:.....	
FILIAÇÃO:	
Nome do pai:.....	
Nome da mãe:.....	
Responsável legal:.....	
DADOS PESSOAIS:	
1. Sexo 1. Masculino 2. Feminino	<input type="checkbox"/>
2. Quantos anos você tem?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> anos
3. Qual a data do seu nascimento?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> / <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
4. Qual a sua situação conjugal? 1. Solteiro 2. Casado(a) 3. Viúvo(a) 4. Separado(a) 5. Vive com o companheiro(a)	<input type="checkbox"/>
5. Qual foi a última série/ano que você completou na escola ou faculdade? (se nunca estudou colocar 0 e 0)	<input type="checkbox"/> Série / anos completos de faculdade <input type="checkbox"/> 1. Fundamental 2. Médio 3. Superior
6. Qual a renda familiar TOTAL dos moradores do seu domicílio? 1. até R\$ 788,00 (até 1 salário-mínimo) 2. de R\$ 789,00 a R\$ 1.576,00 (mais que 1 salário-mínimo até 2 salários-mínimos) 3. de R\$ 1.577,00 a R\$ 3.940,00 (mais que 2 salários-mínimos até 5 salários-mínimos) 4. mais que R\$ 3.941,00 (mais que 5 salários-mínimos)	<input type="checkbox"/>
AUTOPERCEÇÃO ESTÉTICA:	
Como você se sente em relação à satisfação com a cor dos seus dentes? 1. Muito insatisfeito 2. Insatisfeito 3. Ligeiramente insatisfeito 4. Neutro 5. Ligeiramente satisfeito 6. Satisfeito 7. Muito satisfeito	<input type="checkbox"/>

Continuação da ficha de anamnese

Questionário de Saúde

As gengivas sangram? Sim () Não ()

Já fez tratamento da gengiva alguma vez? Sim () Não ()

Sofre de alguma doença: Sim () Não () - Qual(is) _____

Está em tratamento médico atualmente? () Sim () Não

Tem alergia? () Não () Sim - Qual(is) _____

Usa algum medicamento? () Não () Sim - Qual(is) _____

Sofre de alguma das seguintes doenças?

Febre Reumática: Sim () Não () ;

Problemas cardíacos: Sim () Não ()

Problemas renais: Sim () Não () ;

Problemas gástricos: Sim () Não ()

Problemas respiratórios: Sim () Não () ;

Problemas alérgicos: Sim () Não ()

Problemas articulares ou reumatismo: Sim () Não () ;

Diabetes: Sim () Não ()

Hipertensão arterial: Sim () Não () ;

Etilista: () Sim () Não

AValiação da Cor

Data: ___/___/___

Cor do incisivo central _____

Cor do canino _____

Inclusão	Exclusão
Idade	Restaurações anteriores
Cor (parâmetro objetivo)	Grávida
Cor (parâmetro subjetivo - autopercepção)	Lactante
6 dentes anteriores livres de cárie	Manchas internas (fluorose, tetraciclina, endodontia)
Sensibilidade provocada pelo jato de ar	Medicação antiinflamatória
	Medicação antioxidante
	LCNC, trincas ou exposição dentinária
	Aparelho ortodôntico
	Fumante/ Ex-fumante (carga tabagista)

ANEXO III

INSTRUCTIONS TO AUTHORS (OPERATIVE DENTISTRY)

New Instructions as of 20 September 2008

Operative Dentistry requires electronic submission of all manuscripts. All submissions must be sent to Operative Dentistry using the [Allen Track upload site](#). Your manuscript will only be considered officially submitted after it has been approved through our initial quality control check, and any problems have been fixed. You will have 6 days from when you start the process to submit and approve the manuscript. After the 6 day limit, if you have not finished the submission, your submission will be removed from the server. You are still able to submit the manuscript, but you must start from the beginning. Be prepared to submit the following manuscript files in your upload:

5. A Laboratory or Clinical Research Manuscript file must include:

a title

a running (short) title

a clinical relevance statement

a concise summary (abstract)

introduction, methods & materials, results, discussion and conclusion

references (see Below)

The manuscript **MUST NOT** include any:

identifying information such as:

Authors

Acknowledgements

Correspondence information

Figures

Graphs

Tables

6. An acknowledgement, disclaimer and/or recognition of support (if applicable) must in a separate file and uploaded as supplemental material.

7. All figures, illustrations, graphs and tables must also be provided as individual files. These should be high resolution images, which are used by the editor in the actual typesetting of your manuscript.

Please refer to the instructions below for acceptable formats.

8. All other manuscript types use this template, with the appropriate changes as listed below. Complete the online form which includes complete author information and select the files you would like to send to Operative Dentistry. Manuscripts that do not meet our formatting and data requirements listed below will be sent back to the corresponding author for correction.

GENERAL INFORMATION

- All materials submitted for publication must be submitted exclusively to Operative Dentistry.
- The editor reserves the right to make literary corrections.
- Currently, color will be provided at no cost to the author if the editor deems it essential to the manuscript.

However, we reserve the right to convert to gray scale if color does not contribute significantly to the quality and/or information content of the paper.

- The author(s) retain(s) the right to formally withdraw the paper from consideration and/or publication if they disagree with editorial decisions.

- International authors whose native language is not English must have their work reviewed by a native English speaker prior to submission.
- Spelling must conform to the American Heritage Dictionary of the English Language, and SI units for scientific measurement are preferred.
- While we do not currently have limitations on the length of manuscripts, we expect papers to be concise;

Authors are also encouraged to be selective in their use of figures and tables, using only those that contribute significantly to the understanding of the research.

- Acknowledgement of receipt is sent automatically. If you do not receive such an acknowledgement, please contact us at editor@jopdent.org rather than resending your paper.
- **IMPORTANT:** Please add our e-mail address to your address book on your server to prevent transmission problems from spam and other filters. Also make sure that your server will accept larger file sizes. This is particularly important since we send page-proofs for review and correction as .pdf files.

REQUIREMENTS

• FOR ALL MANUSCRIPTS

1 **CORRESPONDING AUTHOR** must provide a WORKING / VALID e-mail address which

will be used for all communication with the journal. **NOTE: Corresponding authors MUST update their profile if their e-mail or postal address changes. If we cannot contact authors within seven days, their manuscript will be removed from our publication queue.**

2 **AUTHOR INFORMATION** must include:

- full name of all authors
- complete mailing address **for each author**
- degrees (e.g. DDS, DMD, PhD)
- affiliation (e.g. Department of Dental Materials, School of Dentistry, University of Michigan)

3 **MENTION OF COMMERCIAL PRODUCTS/EQUIPMENT** must include:

- full name of product
- full name of manufacturer
- city, state and/or country of manufacturer

4 **MANUSCRIPTS AND TABLES** must be provided as Word files. Please limit size of tables to no more than one US letter sized page. (8.5" x 11")

5 **ILLUSTRATIONS, GRAPHS AND FIGURES** must be provided as TIFF or JPEG files with the following parameters ▪ line art (and tables that are submitted as a graphic) must be sized at approximately 5" x 7" and have a resolution of 1200 dpi.

- gray scale/black & white figures must have a minimum size of 3.5" x 5", and a maximum size of 5" x 7" and a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi.
- color figures must have a minimum size of 2.5" x 3.5", and a maximum size of 3.5" x 5" and a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi.
- color photographs must be sized at approximately 3.5" x 5" and have a resolution of 300 dpi.

• OTHER MANUSCRIPT TYPES

1 **CLINICAL TECHNIQUE/CASE STUDY MANUSCRIPTS** must include:

- a running (short) title
- purpose
- description of technique

- list of materials used
- potential problems
- summary of advantages and disadvantages
- references (see below)

2 LITERATURE AND BOOK REVIEW MANUSCRIPTS must include:

- a running (short) title
- a clinical relevance statement based on the conclusions of the review
- conclusions based on the literature review...without this, the review is just an exercise
- references (see below)

• **FOR REFERENCES**

REFERENCES must be numbered (superscripted numbers) consecutively as they appear in the text and,

where applicable, they should appear after punctuation.

The reference list should be arranged in numeric sequence at the end of the manuscript and should include:

1. Author(s) last name(s) and initial (ALL AUTHORS must be listed) followed by the date of publication in parentheses.
2. Full article title.
3. Full journal name in italics (no abbreviations), volume and issue numbers and first and last page numbers complete (i.e. 163-168 NOT attenuated 163-68).
4. Abstracts should be avoided when possible but, if used, must include the above plus the abstract number and page number.
5. Book chapters must include chapter title, book title in italics, editors' names (if appropriate), name of publisher and publishing address.
6. Websites may be used as references, but must include the date (day, month and year) accessed for the information.
7. Papers in the course of publication should only be entered in the references if they have been accepted for publication by a journal and then given in the standard manner with "In press" following the journal name.
8. **DO NOT** include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.

EXAMPLES OF REFERENCE STYLE

- Journal article: two authors Evans DB & Neme AM (1999) Shear bond strength of composite resin and amalgam adhesive systems to dentin *American Journal of Dentistry* **12(1)** 19-25.
- Journal article: multiple authors Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH & Robinson SJ (1997) Current concepts on adhesion to dentin *Critical Review of Oral and Biological Medicine* **8(3)** 306-335.
- Journal article: special issue/supplement Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P & Vanherle G (2001) Adhesives and cements to promote preservation dentistry *Operative Dentistry* (**Supplement 6**) 119-144.
- Abstract: Yoshida Y, Van Meerbeek B, Okazaki M, Shintani H & Suzuki K (2003) Comparative study on adhesive performance of functional monomers *Journal of Dental Research* **82(Special Issue B)** Abstract #0051 p B-19.
- Corporate publication: ISO-Standards (1997) ISO 4287 Geometrical Product Specifications Surface texture: Profile method – Terms, definitions and surface texture parameters *Geneve: International Organization for Standardization* **1st edition** 1-25.

- Book: single author Mount GJ (1990) *An Atlas of Glass-ionomer Cements* Martin Duntz Ltd, London.
- Book: two authors Nakabayashi N & Pashley DH (1998) *Hybridization of Dental Hard Tissues* Quintessence Publishing, Tokyo.
- Book: chapter Hilton TJ (1996) Direct posterior composite restorations In: Schwartz RS, Summitt JB, Robbins JW (eds) *Fundamentals of Operative Dentistry* Quintessence, Chicago 207-228.
- Website: single author Carlson L (2003) Web site evolution; Retrieved online July 23, 2003 from:
<http://www.d.umn.edu/~lcarlson/cms/evolution.html>
- Website: corporate publication National Association of Social Workers (2000) NASW Practice research survey 2000. NASW Practice Research Network, 1. 3. Retrieved online September 8, 2003 from: <http://www.socialworkers.org/naswprn/default>

ANEXO IV

INSTRUCTIONS TO 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.

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.

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 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* 965:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton 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

Cartwright 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 bibtex 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.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

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

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

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.

Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, **before** the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are **not** accepted **after** acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors **at revision stage** may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the role of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is **maintained on the platform**, watermarked "retracted" and explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed.