



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA INTEGRADA

CLEUDES HERCILA DO NASCIMENTO LIMA

**AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE DO GEL DE
CLAREAMENTO DENTAL EM LINFÓCITOS HUMANOS.**

VIRTUS IMPAVIDA

RECIFE-PE

2017

CLEUDES HERCILA DO NASCIMENTO LIMA

**AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE DO GEL DE CLAREAMENTO DENTAL
EM LINFÓCITOS HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior

Co-orientador: Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

Linha de pesquisa: Avaliação clínica e laboratorial em Odontologia.

RECIFE – PE

2017

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

L732a Lima, Cleudes Hercila do Nascimento.
Avaliação de mutagenicidade do gel de clareamento dental em linfócitos humanos / Cleudes Hercila do Nascimento Lima. – 2017.
58f. il.; 30 cm.

Orientador: Arnaldo de França Caldas Júnior.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Odontologia.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Peróxido de hidrogênio. 2. Clareamento dental. 3. Mutagenicidade. 4. Toxicidade. I. Caldas Júnior, Arnaldo de França (orientador). II. Título.

617.6 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 215)

CLEUDES HERCILA DO NASCIMENTO LIMA

**“AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE DO GEL DE
CLAREAMENTO DENTAL EM LINFÓCITOS HUMANOS.”**

Aprovado em 22 de fevereiro de 2017

ORIENTADOR: Prof. Dr. ARNALDO DE FRANÇA CALDAS JÚNIOR

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ THADEU PINHEIRO

Banca examinadora:

3º

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

2º

Profª. Drª. MARCIA MARIA VENDICIANO BARBOSA DE VASCONCELOS
(Examinador Externo) Universidade Federal de Pernambuco

1º

Prof. Dr. ALEXANDRE BATISTA LOPES DO NASCIMENTO
(Examinador Externo) Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta dissertação, que representa uma parte de minha vida, aos meus pais, Sonny Mateus e Rita, que sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela sua presença constante em minha vida.

Aos meus pais, Sonny Mateus e Rita, que além do amor infinito que me deram sempre me ajudaram e me apoiaram nas minhas escolhas.

Ao meu irmão, que mesmo ausente é um exemplo de irmão mais velho.

Ao meu noivo, Diogo Lins, pela ajuda, compreensão e reclamações de incentivo para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Arnaldo Caldas, por confiar em minha pesquisa e ao Prof. José Thadeu Pinheiro pela co-orientação, ensinamentos e disponibilidade em me ajudar sempre que precisei.

À Prof.^a Neide Santos, do Departamento de Genética, por me acolher, acreditar no meu potencial e guiar minha pesquisa por caminhos até então desconhecidos para mim.

À mestranda Juliana Vieira, por toda ajuda, paciência e compreensão durante a fase laboratorial da pesquisa, me ensinando sobre cultura celular e análise microscópica de metáfases.

Ao graduando João, pela disponibilidade em me ajudar, tornando-se fundamental durante a fase final da pesquisa.

A todos que fazem parte do Laboratório de Genética e Citogenética Animal da UFPE, pelo auxílio que me deram durante meus dias no laboratório.

Ao Prof. Alexandre Nascimento, por disponibilizar o consultório do Núcleo de Pesquisa Clínica e Biomateriais da UFPE para a realização da parte clínica da pesquisa.

À Maria de Fátima, minha sogra, por estar disponível a me ajudar sempre que precisei, demonstrando e aplicando todo seu conhecimento e experiência na enfermagem.

Aos meus colegas de Pós-Graduação pelo companheirismo e troca de conhecimentos ao longo do curso.

Aos professores da Pós-Graduação por todos os conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da Pós-Graduação, Ozi, Tamires e D. Tânia pela atenção sempre presente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelos recursos financeiros proporcionados.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

Uns são homens;

Alguns são professores;

Poucos são mestres.

Aos primeiros, escuta-se;

Aos segundos, respeita-se;

Aos últimos, segue-se.

Se hoje enxergo longe, é porque fui colocado em ombros de gigantes!

Desconhecido

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito mutagênico do gel de clareamento Peróxido de Hidrogênio a 35% sobre culturas de linfócitos de sangue periférico humano. O estudo realizado foi do tipo clínico laboratorial, com uma amostra por conveniência, onde quatro voluntários que preenchiam os critérios de inclusão foram selecionados para participar da pesquisa. Foram coletados 5 ml de sangue antes do início do tratamento (grupo controle) e, posteriormente, realizadas três sessões de clareamento dental no consultório onde após 24 h de cada sessão foi realizada a coleta sanguínea para a realização da cultura de linfócitos (grupo experimento). As preparações cromossômicas foram obtidas das culturas de linfócitos, as lâminas foram confeccionadas e as células analisadas em metáfase. Para cada voluntário foram analisadas 100 metáfases por experimento, para a detecção de alterações cromossômicas pré-existentes aos procedimentos realizados e após cada procedimento, totalizando 1600 metáfases. Os dados foram analisados inferencialmente através dos testes de Friedman e Qui-quadrado de Pearson. Observou-se que houve variação nas alterações cromossômicas presentes antes do procedimento de clareamento dental (2,8%) e após cada sessão de clareamento com variação de 5,3% a 5,5%. Entretanto não se pode afirmar que houve um efeito cumulativo, visto que após a segunda sessão houve queda na variação de alterações cromossômicas (4,5%). Pôde-se concluir que o Peróxido de Hidrogênio 35% utilizado no procedimento de clareamento dental no consultório, não apresenta riscos significativos de mutagenicidade as células linfocitárias.

Palavras-chave: Peróxido de hidrogênio. Clareamento dental. Mutagenicidade. Toxicidade.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the mutagenic effect of 35% Hydrogen Peroxide bleaching gel on cultures of human peripheral blood lymphocytes. The study was performed for the clinical laboratory type, with a sample for convenience, where four volunteers who met the inclusion criteria were selected to participate in the study. Five ml of blood were collected before the beginning of the treatment and three non-dental dental whitening sessions were performed where after 24 h of each session a blood collection was performed for a lymphocyte culture assay (experiment group). As chromosome preparations were obtained from lymphocyte cultures, as slides were made and as cells analyzed in metaphase. For each volunteer, 100 metaphors per experiment were analyzed for pre-existing chromosomal changes for procedures and after each procedure, totaling 1600 metaphases. Data were analyzed inferentially through the Friedman and Chi-square test of Pearson. It was observed that there was variation in the chromosomal alterations before the dental bleaching procedure (2.8%) and after each bleaching session with variation from 5.3% to 5.5%. However, it was verified that there was a cumulative effect, and it was verified that a new fall registered a variation of chromosomal alterations (4.5%). It was concluded that 35% Hydrogen Peroxide did not use any procedure of dental whitening without a doctor's office, it does not present significant risks of mutagenicity as lymphocyte cells.

Key words: Hydrogen peroxide. Tooth whitening. Mutagenicity. Toxicity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	METODOLOGIA.....	13
3	OBJETIVOS.....	17
4	CONCLUSÃO.....	18
	REFERÊNCIAS.....	19
	APÊNDICE A – ARTIGO (BRAZILIAN DENTAL JOURNAL).....	22
	APENDICE B – ORIENTAÇÕES PÓS-CLAREAMENTO DENTAL.....	38
	APENDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO.....	39
	ANEXO A – FICHA CLÍNICA.....	41
	ANEXO B – TÉCNICA DE CLAREAMENTO DENTAL FGM.....	47
	ANEXO C – NORMAS DA REVISTA.....	49
	ANEXO D – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA...	55

1 INTRODUÇÃO

Cada vez mais os padrões impostos pela sociedade e o forte apelo comercial e publicitário tem exigido das pessoas a busca por sorrisos perfeitos e aumentado a procura pela Odontologia estética. Tratamentos de clareamento dental, restauração de dentes anteriores, coroas, facetas, lentes de contato dental e tratamento ortodôntico são frequentemente exigidos por pacientes que desejam melhorar sua aparência (1,2).

Entre os fatores significativos que afetam a aparência dentária geral são cor, forma e posição do dente; qualidade da restauração; e a disposição geral da dentição, especialmente dos dentes anteriores (2,3).

O Clareamento dental representa o procedimento dentário de primeira escolha e mais comum quando se deseja melhorar a aparência estética do sorriso, por ser um procedimento popular estético de técnica simples, eficácia clínica, natureza não-invasiva e não exigir nenhum desgaste da estrutura dental (4-7).

O clareamento dental tem sido usado há mais de cem anos e desde então tem se empregado diversas técnicas e materiais para clarear os dentes. Entre as técnicas principais de clareamento, temos: o clareamento no consultório e as técnicas de clareamento domiciliar supervisionada que, geralmente, envolvem a utilização de solução de Peroxido de Hidrogênio, Peróxido de Carbamida ou Perborato de Sódio (4,8-10).

O Peróxido de Hidrogênio é o ingrediente ativo dos materiais de clareamento contemporâneos, que podem ser aplicados diretamente ou podem ser produzidos por uma reação química a partir de Peróxido de Carbamida ou Perborato de Sódio (1,7,11-13). No consultório geralmente se utiliza o peróxido de hidrogênio na concentração de 25 – 35% por curtos períodos de tempo (3).

A dissociação de Peróxido de Hidrogênio em água, oxigênio reativo e algumas espécies de radicais livres promove um efeito de clareamento nos tecidos duros dentários porque estas moléculas reativas atacam as moléculas cromóforas de cor escura de cadeia longa, rompe as duplas ligações dos compostos orgânicos e inorgânicos dentro dos túbulos dentinários e as dividem em moléculas menores, menos coloridas e mais difusíveis (10, 11,14).

No entanto, estudos demonstraram que, devido ao seu baixo peso molecular, o Peróxido de Hidrogênio, mesmo em baixas concentrações, pode se difundir através dos túbulos dentinários e atingir a câmara pulpar podendo promover danos nas células da polpa (4,6,14).

Em geral, o mecanismo de ação do Peróxido de Hidrogênio não é muito conhecido e pode formar inúmeras espécies de óxidos reativos dependendo das condições de reação, incluindo temperatura, Ph e luz (3).

Por isso, os danos celulares causados por peróxidos têm sido extensivamente investigados, uma vez que a alta frequência com que se realiza o clareamento dentário na prática clínica atual e a incorporação dos agentes clareadores químicos na composição dos antissépticos e dentifrícios mostram que se faz necessário conhecer minuciosamente como agem e quais as consequências dessa ação na mucosa bucal (1,14).

O estudo de Consolaro, Francischone e Consolaro (1), realizado com o gel de clareamento dental aplicado na mucosa de Hamsters apresenta o material como um agente promotor da carcinogênese, um co-carcinógeno. Bem como, no estudo de Coldebella et al. (14) com Peróxido de Hidrogênio, os produtos de degradação do gel foram capazes de se difundir através do esmalte e da dentina provocando efeitos tóxicos para as células odontoblásticas do tecido pulpar.

O interesse no clareamento dental entre os pesquisadores básicos e clínicos, a compreensão ainda mais mecanicista e otimização dos fatores que controlam o processo de clareamento dos dentes continuará a se expandir. Isso resultará em mais melhorias para os produtos de clareamento de dentes e procedimentos, e dar benefícios significativos para o campo Odontologia Estética (3).

Assim, torna-se importante, neste momento, avaliar os efeitos dos agentes clareadores nas células de linfócitos para que novas pesquisas possam determinar um plano de tratamento de sucesso clínico, sem, contudo causar danos significativos aos dentes submetidos a este procedimento operatório.

2 METODOLOGIA

Tipo de estudo

A pesquisa realizada foi um estudo clínico laboratorial e, por se tratar de atividades com humanos, foi submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 55555716.2.0000.5208/ Parecer 1.571.588).

Local do estudo

Clínicas odontológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE.

Participantes

Nesse estudo foi realizada uma amostra por conveniência, onde foram selecionados quatro pacientes atendidos nas clínicas odontológicas da Universidade Federal de Pernambuco, que preencheram os critérios de inclusão na pesquisa e que aceitaram participar.

Os pacientes selecionados foram orientados quanto ao tipo de pesquisa e qual a sua finalidade, onde todos receberam e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Critérios de Inclusão:

O paciente deveria ter mais de 18 anos, dentes anteriores hígidos, sem evidência clínica de alterações pulpares e ser paciente sem experiência anterior de clareamento dental ou quaisquer tratamento com agentes clareadores.

Critérios de Exclusão:

Foram excluídas as pacientes gestantes, pessoas com manchas nos dentes, que estivessem tomando qualquer tipo de medicamento, com hábitos de bruxismo ou qualquer outra patologia que pudesse causar sensibilidade e fumantes com doença periodontal.

Procedimentos (intervenção)

Os pacientes que aceitaram participar da pesquisa passaram por uma anamnese detalhada para preenchimento do prontuário clínico, conforme exigência do Conselho Federal de Odontologia (Anexo A).

Posteriormente, foram coletadas amostras de sangue (aproximadamente 5 ml) através de punção venosa (sistema de coleta à vácuo), com material estéril e descartável, por profissionais qualificados e mantidas em tubos heparinizados. Foi realizada a coleta antes do procedimento (grupo controle) e 24 h após cada sessão do procedimento de clareamento dental (grupo tratado), pois, segundo Albertini et al. (15) o tempo ideal para a detecção da droga no sangue periférico é de 24 - 48 h após a exposição. A coleta realizada foi transportada para análise no laboratório de Citogenética da Universidade Federal de Pernambuco para a realização da cultura de linfócitos e análise do material coletado.

A primeira coleta foi para a verificação da presença de alguma alteração cromossômica pré-existente ao procedimento e as coletas posteriores para a verificação de alterações cromossômicas após o contato com o gel de clareamento.

Os pacientes passaram por três sessões de clareamento dental com duração de 1h cada sessão, onde cada sessão foi realizada uma vez por semana.

Técnica do Clareamento Dental

Os pacientes selecionados passaram pelo procedimento de clareamento dental, utilizando-se a técnica de clareamento de consultório. Foi utilizado o um clareador à base de peróxido de hidrogênio a 35% (Whiteness HP Maxx; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante (Anexo B).

No início de cada sessão de clareamento dental foi realizado o registro da cor do dente utilizando-se uma escala de cor (Tetric; Ivoclar Vivadent Ltda, Barueri, SP, Brasil) e logo após, foi realizada a profilaxia com escova de *Robinson*, pedra pomes (Biodinâmica, Ibioporã, PR, Brasil) e água para remoção do biofilme aderido ao dente. Para afastamento da mucosa labial e língua foi utilizado o abridor de boca (Arcflex; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e logo após, aplicação do agente dessensibilizante (Dessensibilize KF 2%; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) por 10 minutos. Após lavagem

e remoção do agente dessensibilizante, foi aplicada a barreira gengival (Top Dam; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) para isolamento dos dentes a serem clareados e a cada segmento de três dentes a barreira gengival foi polimerizada por 20 segundos (Fotopolimerizador; Gnatus Equipamentos Médico-Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Após todo isolamento, o agente clareador a base de Peróxido de Hidrogênio 35% (Whiteness HP Maxx; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) foi manipulado na proporção de 3:1 (PH:Espessante). O gel foi aplicado sobre a superfície dos dentes a serem clareados onde durante a fase de reação houve a mudança de sua cor, de vermelho carmim a verde claro. Na primeira sessão foram realizadas três aplicações do gel, com duração de 15 minutos cada, totalizando 45 minutos. Na segunda sessão de clareamento o gel foi aplicado duas vezes com tempo de aplicação de 20 e 25 minutos, respectivamente, totalizando 45 minutos. Na terceira sessão foi aplicado o gel de clareamento uma única vez e permanecendo em contato com a superfície dentária por 45 minutos. Ao término de cada aplicação, o gel foi removido com sugador cirúrgico e os dentes lavados com água para a completa remoção do gel de clareamento. Novamente foi aplicado o agente dessensibilizante (Dessensibilize KF 2%; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) por 5 minutos para a redução da possível sensibilidade dental, e posteriormente realizado o polimento do esmalte com pasta de polimento (Diamond Excel; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e discos de feltro (Diamond Flex; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil).

A técnica do utilizada foi padronizada para todos os voluntários e o clareamento foi realizado nos dentes de canino a canino, no arco superior e inferior.

Teste de metáfase em linfócitos de sangue periférico humano

Para realização das culturas foram adicionados 0,5 ml de sangue total, 4 ml do meio RPMI 1690 (GIBCO®), 1 ml de soro fetal bovino (CULTILAB®) e 0,2 ml de fitohemaglutinina (1 mg/ml) (GIBCO®) em tubos estéreis, os quais foram mantidos em estufa a 37 °C durante 48 horas. Após 46 horas foi adicionado 0,1 ml de colchicina 0,0016% (SIGMA). A retirada de cultura foi realizada ao completar 48 horas de cultivo e o material centrifugado por 6 minutos a 1800rpm, o sobrenadante desprezado e adicionado 8 ml de KCL previamente aquecido a 37 °C, para a realização do choque hipotônico. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida foram novamente

centrifugados, sempre pelo mesmo tempo e velocidade anteriormente descritos e o material devidamente fixado com metanol/ácido acético na proporção 3:1.

Para a preparação das lâminas, foram realizadas trocas de fixador até que o conteúdo dentro de cada tubo se tornou transparente. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado, e as preparações citológicas para análises cromossômicas foram realizadas e as lâminas foram coradas com Giemsa a 5% por 10 minutos.

Análise microscópica

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100x) por quatro avaliadores com experiência nesse tipo de avaliação, em teste cego. Para reduzir a variação entre os analisadores, cada um avaliou o mesmo número de células de lâminas de um mesmo voluntário.

Análise citogenética

Para cada paciente foram analisadas 100 metáfases por tipo amostral (controle, 1ª exposição, 2ª exposição e 3ª exposição), totalizando 400 metáfases por paciente. As metáfases foram avaliadas quanto: a) presença de Alterações Cromossômicas (Acs); b) tipos de ACs: *gap* cromatídico (G.CRT), *gap* isocromatídico (G.CRM), quebra cromatídica (Q.CRT), quebra isocromatídica (Q.CRM), fragmento acêntrico simples (FAS), fragmento acêntrico duplo (FAD), cromossomo em anel (C. ANEL) e outras (dicêntrico, dicêntrico trirradial, troca externa simétrica, monocêntrico trirradial e figuras complexas); c) número de ACs. Apenas metáfases contendo 46 ± 1 centrômeros foram avaliadas segundo os seguintes critérios: a) bom alinhamento das cromátides; b) cromossomos não sobrepostos; c) boa fixação e coloração. O mesmo procedimento de leitura foi empregado para o controle de cada experimento.

Análise estatística

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas percentuais para a presença ou ausência de alterações cromossômicas e das estatísticas: média, desvio padrão e mediana para o número de alterações (gaps, quebras ou outras alterações). Foram ainda, analisados inferencialmente através dos testes de Friedman e Qui-quadrado de Pearson.

A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa estatístico utilizado para obtenção

dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 23.

Aspectos éticos

A pesquisa foi iniciada após a análise e a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE. O referido projeto foi criado de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos, atendendo a resolução número 466/12, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde – Brasília – DF.

Os indivíduos maiores de 18 anos ou emancipados expressarão sua autorização para participar da pesquisa através da leitura compreensão e assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para Maiores de 18 anos ou emancipados (APÊNDICE A) que será ofertado na forma de convite sendo o documento elaborado com base nos dados fornecidos pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco – CEP CCS, de acordo com as diretrizes e normas regulamentadas de pesquisa envolvendo seres humanos, atendendo a resolução número 466/12, do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde – Brasília – DF.

3 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar se os agentes de clareamento dental são mutagênicos in vivo à culturas de linfócitos obtidos a partir do sangue de adultos atendidos nas clínicas odontológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Objetivos Específicos

- Analisar a indução de danos nas células linfocitárias no período pós-tratamento quando os dentes são submetidos aos géis clareadores.
- Avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores em células de linfócitos após diferentes períodos de aplicação do produto na superfície dentária.
- Comparar os resultados do grupo controle e do grupo experimental.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se assim que a dose e o tempo utilizado no clareamento dental de consultório através do Peróxido de Hidrogênio 35% não apresenta potencial mutagênico considerável para causar danos aos linfócitos humanos.

REFERÊNCIAS

1. Consolaro A, Francischone LA, Consolaro RB. Tooth whitening products in toothpastes and mouthwashes may act as co-carcinogens in the oral mucosa: how to advise orthodontic patients and how to avoid undesirable effects. *Dental Press J. Orthod* 2011; 16: 28-35.
2. Tin-Oo MM, Saddki N, Hassan N. Factors influencing patient satisfaction with dental appearance and treatments they desire to improve aesthetics. *BMC Oral Health* 2011; 11: 6.
3. Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent* 2006; 34: 412-419.
4. Know SR, Wertz PW. Review of the Mechanism of Tooth Whitening. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2015; 27: 240-257.
5. Albuquerque RC, Gomez RS, Dutra RA, Vasconcellos WA, Gomez RS, Gomez MV. Effects of a 10% carbamide peroxide bleaching agente of rat oral epithelium proliferation. *Braz Dent J* 2002; 13: 162-165.
6. Soares DG, Ribeiro APD, Sacono NT, Loguercio AD, Hebling J, Costa CAS. Mineral loss and morphological changes in dental enamel induced by a 16% carbamide peroxide bleaching gel. *Braz Dent J* 2013; 24: 517-521.
7. Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. *Braz Oral Res* 2006; 20: 47-51.
8. Li Y. biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology* 1996; 34: 887-904.
9. Mahony C, Felter SP, McMillan DA. An exposure-based risk assessment approach to confirm the safety of hydrogen peroxide for use in home tooth bleaching. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2006; 44: 75-82.

10. Santos RL, Pithon MM, Martins FO, Romanos MTV. Cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gel on L929 cells. *Rev. Odonto Ciên* 2010; 25; 271-275.
11. Canoglu E, Gulsahi K, Sahin C, Altundasar E, Cehreli ZC. Effect of bleaching agentes on sealing properties of diferente intraorifice barriers and root filling materials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17; e710-5.
12. Naik S, Tredwin CJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): review of safety in relation to possible carcinogenesis. *Oral Oncology* 2006; 42; 668-674.
13. Carey CM. Tooth whitening: what me now know. *J Evid Based Dent Pract* 2014; 70-76.
14. Coldebella CR, Ribeiro APD, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CAS. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J* 2009; 20; 267-274.
15. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effect of carcinogens in humans. *Mutat Res* 2000; 463; 111-172.
16. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hugerford DA. Chromossome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res* 1960; 20; 613-616.
17. Zarzar PA, Rosenblatt A, Takahashi CS, Takeuchi PL, Costa Junior LA. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: na in vivo study. *J Dent* 2003; 31; 479-485.
18. Leite ACGL, Rosenblatt A, Calixto MS, Silva CM, Santos N. Genotoxic effect of formocresol pulp therapy of deciduous teeth. *Mutation Research* 2012; 747; 93-97.
19. Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R. Tooth whitening products and the risk of oral câncer. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44; 301-315.

20. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Costa CAS, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to diferente in0office bleaching techniques: preliminar findings. *Braz Dent J* 2015; 26; 242-248.

APÊNDICE A – ARTIGO (BRAZILIAN DENTAL JOURNAL)**AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE DOS LINFÓCITOS ATRAVÉS DE AGENTE
DE CLAREAMENTO DENTAL**

Evaluation of Mutagenicity of Lymphocytes Through Dental Clarification Agent

Cleudes Hercila do Nascimento Lima¹; Juliana Vieira de Barros²; João Carlos Faria Santana da Silva²; Neide Santos²; José Thadeu Pinheiro³; Arnaldo de França Caldas Júnior⁴.

¹Mestranda em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

²Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana, Departamento de Genética, Centro de Biociências, UFPE.

³Professor Titular do curso de graduação em Odontologia da UFPE.

⁴Professor Adjunto do curso de graduação em Odontologia da UFPE e membro do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPE.

Endereço para correspondência:

Cleudes Hercila do Nascimento Lima

Rua Dona Etelvina Batista, 111 – Jardim São Paulo, Recife-PE

CEP: 50910-490. Email: cleudeshercila@hotmail.com

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito mutagênico do gel de clareamento Peróxido de Hidrogênio a 35% sobre culturas de linfócitos de sangue periférico humano. O estudo realizado foi do tipo clínico laboratorial, com uma amostra por conveniência, onde quatro voluntários que preenchiam os critérios de inclusão foram selecionados para participar da pesquisa. Foram coletados 5 ml de sangue antes do início do tratamento (grupo controle) e, posteriormente, realizadas três sessões de clareamento dental no consultório onde após 24 h de cada sessão foi realizada a coleta sanguínea para a realização da cultura de linfócitos (grupo experimento). As preparações cromossômicas foram obtidas das culturas de linfócitos, as lâminas foram confeccionadas e as células analisadas em metáfase. Para cada voluntário foram analisadas 100 metáfases por experimento, para a detecção de alterações cromossômicas pré-existentes aos procedimentos realizados e após cada procedimento, totalizando 1600 metáfases. Os dados foram analisados inferencialmente através dos testes de Friedman e Qui-quadrado de Pearson. Observou-se que houve variação nas alterações cromossômicas presentes antes do procedimento de clareamento dental (2,8%) e após cada sessão de clareamento com variação de 5,3% a 5,5%. Entretanto não se pode afirmar que houve um efeito cumulativo, visto que após a segunda sessão houve queda na variação de alterações cromossômicas (4,5%). Pôde-se concluir que o Peróxido de Hidrogênio 35% utilizado no procedimento de clareamento dental no consultório, não apresenta riscos significativos de mutagenicidade as células linfocitárias.

Palavras-chave: peróxido de hidrogênio, clareamento dental, mutagenicidade, toxicidade.

INTRODUÇÃO

Cada vez mais os padrões impostos pela sociedade e o forte apelo comercial e publicitário tem exigido das pessoas a busca por sorrisos perfeitos e aumentado a procura pela Odontologia estética. Tratamentos de clareamento dental, restauração de dentes anteriores, coroas, facetas, lentes de contato dental e tratamento ortodôntico são frequentemente exigidos por pacientes que desejam melhorar sua aparência (1,2).

Entre os fatores significativos que afetam a aparência dentária geral são cor, forma e posição do dente; qualidade da restauração; e a disposição geral da dentição, especialmente dos dentes anteriores (2,3).

O Clareamento dental representa o procedimento dentário de primeira escolha e mais comum quando se deseja melhorar a aparência estética do sorriso, por ser um procedimento popular estético de técnica simples, eficácia clínica, natureza não-invasiva e não exigir nenhum desgaste da estrutura dental (4-7).

O clareamento dental tem sido usado há mais de cem anos e desde então tem se empregado diversas técnicas e materiais para clarear os dentes. Entre as técnicas principais de clareamento, temos: o clareamento no consultório e as técnicas de clareamento domiciliar supervisionada que, geralmente, envolvem a utilização de solução de Peroxido de Hidrogênio, Peróxido de Carbamida ou Perborato de Sódio (4,8-10).

O Peróxido de Hidrogênio é o ingrediente ativo dos materiais de clareamento contemporâneos, que podem ser aplicados diretamente ou podem ser produzidos por uma reação química a partir de Peróxido de Carbamida ou Perborato de Sódio (1,7,11-13). No consultório geralmente se utiliza o peróxido de hidrogênio na concentração de 25 – 35% por curtos períodos de tempo (3).

A dissociação de Peróxido de Hidrogênio em água, oxigênio reativo e algumas espécies de radicais livres promove um efeito de clareamento nos tecidos duros dentários porque estas moléculas reativas atacam as moléculas cromóforas de cor escura de cadeia longa, rompe as duplas ligações dos compostos orgânicos e inorgânicos dentro dos túbulos dentinários e as dividem em moléculas menores, menos coloridas e mais difusíveis (10, 11,14).

No entanto, estudos demonstraram que, devido ao seu baixo peso molecular, o Peróxido de Hidrogênio, mesmo em baixas concentrações, pode se difundir através dos túbulos dentinários e atingir a câmara pulpar podendo promover danos nas células da polpa (4,6,14).

Em geral, o mecanismo de ação do Peróxido de Hidrogênio não é muito conhecido e pode formar inúmeras espécies de óxidos reativos dependendo das condições de reação, incluindo temperatura, Ph e luz (3).

Por isso, os danos celulares causados por peróxidos têm sido extensivamente investigados, uma vez que a alta frequência com que se realiza o clareamento dentário na prática clínica atual e a incorporação dos agentes clareadores químicos na composição dos antissépticos e dentifrícios mostram que se faz necessário conhecer minuciosamente como agem e quais as consequências dessa ação na mucosa bucal (1,14).

O estudo de Consolaro, Francischone e Consolaro (1), realizado com o gel de clareamento dental aplicado na mucosa de Hamsters apresenta o material como um agente promotor da carcinogênese, um co-carcinógeno. Bem como, no estudo de Coldebella et al. (14) com Peróxido de Hidrogênio, os produtos de degradação do gel foram capazes de se difundir através do esmalte e da dentina provocando efeitos tóxicos para as células odontoblásticas do tecido pulpar.

O interesse no clareamento dental entre os pesquisadores básicos e clínicos, a compreensão ainda mais mecanicista e otimização dos fatores que controlam o processo de clareamento dos dentes continuará a se expandir. Isso resultará em mais melhorias para os produtos de clareamento de dentes e procedimentos, e dar benefícios significativos para o campo Odontologia Estética (3).

Assim, torna-se importante, neste momento, avaliar os efeitos dos agentes clareadores nas células de linfócitos para que novas pesquisas possam determinar um plano de tratamento de sucesso clínico, sem, contudo causar danos significativos aos dentes submetidos a este procedimento operatório.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco CEP/UFPE (CAAE 55555716.2.0000.5208/ Parecer 1.571.588) e os voluntários foram recrutados nas Clínicas Odontológicas da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil, onde foi obtido o Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

O procedimento do clareamento dental foi realizado pela própria pesquisadora, utilizando as recomendações preconizadas pelo fabricante, através da técnica de clareamento de consultório. Para a realização do clareamento dental utilizamos o Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) a 35% (Whiteness HP Maxx; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) onde foram realizadas três sessões de clareamento com duração de 1 h cada, em intervalos de sete dias entre as sessões.

No início de cada sessão de clareamento dental foi realizado o registro da cor do dente utilizando-se uma escala de cor (Tetric; Ivoclar Vivadent Ltda, Barueri, SP, Brasil) e logo após, foi realizada a profilaxia com escova de *Robinson*, pedra pomes (Biodinâmica, Ibitiporã, PR, Brasil) e água para remoção do biofilme aderido ao dente. Para afastamento da mucosa labial e língua foi utilizado o abridor de boca (Arcflex; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e logo após, aplicação do agente dessensibilizante (Dessensibilize KF 2%; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) por 10 minutos. Após lavagem e remoção do agente dessensibilizante, foi aplicada a barreira gengival (Top Dam; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) para isolamento dos dentes a serem clareados e a cada segmento de três dentes a barreira gengival foi polimerizada por 20 segundos (Fotopolimerizador; Gnatus Equipamentos Médico-Odontológicos Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Após todo isolamento, o agente clareador a base de Peróxido de Hidrogênio 35% (Whiteness HP Maxx; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) foi manipulado na proporção de 3:1 (PH:Espessante). O gel foi aplicado sobre a superfície dos dentes a serem clareados onde durante a fase de reação houve a mudança de sua cor, de vermelho carmim a verde claro. Na primeira sessão foram realizadas três aplicações do gel, com duração de 15 minutos cada, totalizando 45 minutos. Na segunda sessão de clareamento o gel foi aplicado duas vezes com tempo de aplicação de 20 e 25 minutos, respectivamente, totalizando 45 minutos. Na terceira sessão foi aplicado o gel de clareamento uma única vez e permanecendo em contato com a superfície dentária por 45

minutos. Ao término de cada aplicação, o gel foi removido com sugador cirúrgico e os dentes lavados com água para a completa remoção do gel de clareamento. Novamente foi aplicado o agente dessensibilizante (Dessensibilize KF 2%; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) por 5 minutos para a redução da possível sensibilidade dental, e posteriormente realizado o polimento do esmalte com pasta de polimento (Diamond Excel; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) e discos de feltro (Diamond Flex; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil).

A técnica utilizada foi padronizada para todos os voluntários e o clareamento foi realizado nos dentes de canino a canino, no arco superior e inferior.

O sangue foi obtido através de coleta venosa (5 ml) por enfermeira treinada na fossa antecubital dos adultos antes (grupo controle) e 24 h após as sessões de clareamento dental (grupo experimento), pois, segundo Albertini et al. (15) o tempo ideal para a detecção da droga no sangue periférico é de 24-48 h após a exposição. O sangue foi coletado em tubos de heparina e imediatamente após a coleta, a amostra foi transportada ao Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, para realização da cultura de linfócitos e preparo das lâminas para análise.

A análise citogenética foi realizada por quatro avaliadores com experiência nesse tipo de avaliação. Para reduzir a variação entre os avaliadores, cada um analisou o mesmo número de células de lâminas de um mesmo voluntário (certificando-se que as células não fossem contabilizadas duas vezes).

A pesquisa teve uma amostra por conveniência e os quatro pacientes que fizeram parte da amostra foram selecionados através de exames de rotina na instituição mencionada.

Os critérios de inclusão foram: ter mais de 18 anos, dentes anteriores hígidos, sem evidência clínica de alterações pulpares e ser paciente sem experiência anterior de clareamento dental ou quaisquer tratamento com agentes clareadores. Os critérios de exclusão: pessoas gestantes, com manchas nos dentes, que estivessem tomando qualquer tipo de medicamento, com hábitos de bruxismo ou qualquer outra patologia que pudesse causar sensibilidade e fumantes com doença periodontal.

A primeira coleta sanguínea foi realizada para observar se havia incidência de aberrações cromossômicas espontâneas (ACs) (grupo controle) e as três coletas posteriores após as sessões de clareamento dental foram para detectar possíveis alterações causadas pelo

clareamento dental (grupo tratado). A cultura de linfócitos foi realizada de acordo com o método de Moorhead et al.(16), modificado pelo Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil, a partir do estudo de Zarzar et al. (17).

O meio de cultura consiste na adição de 0,5 ml de sangue total, 4 ml do meio RPMI 1690 (GIBCO®), 1 ml de soro fetal bovino (CULTILAB®) e 0,2 ml de fitohemaglutinina (1 mg/ml) (GIBCO®) em tubos estéreis, os quais foram mantidos em estufa a 37 °C durante 48 horas. Após 46 horas foi adicionado 0,1 ml de colchicina 0,0016% (SIGMA). A retirada de cultura foi realizada ao completar 48 horas de cultivo e o material foi centrifugado por 6 minutos a 1800 rpm, o sobrenadante desprezado e adicionado 8 ml de KCL previamente aquecido a 37 °C, para a realização do choque hipotônico. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 15 minutos. Em seguida foram novamente centrifugados, sempre pelo mesmo tempo e velocidade anteriormente descritos e o material devidamente fixado com metanol/ácido acético na proporção 3:1.

Para a preparação das lâminas, foram realizadas trocas de fixador até que o conteúdo dentro de cada tubo se tornou transparente. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado, e as preparações citológicas para análises cromossômicas foram realizadas e as lâminas coradas com Giemsa a 5% por 10 minutos.

A análise citogenética foi realizada através do método de Albertini et al.(17), a partir do estudo de Leite et al. (18), utilizando um microscópio de imersão com lente de (100x). Para cada paciente foram analisadas 100 metáfases por tipo amostral (controle, 1ª exposição, 2ª exposição e 3ª exposição), totalizando 400 metáfases por experimento. As metáfases foram avaliadas quanto: a) presença de Alterações Cromossômicas (Acs); b) tipos de ACs: gap cromatídico (G.CRT), gap isocromatídico (G.CRM), quebra cromatídica (Q.CRT), quebra isocromatídica (Q.CRM), fragmento acêntrico simples (FAS), fragmento acêntrico duplo (FAD), cromossomo em anel (C. ANEL) e outras (dicêntrico, dicêntrico trirradial, troca externa simétrica, monocêntrico trirradial e figuras complexas); c) número de ACs. Apenas metáfases contendo 46 ± 1 centrômeros foram avaliadas segundo os seguintes critérios: a) bom alinhamento das cromátides; b) cromossomos não sobrepostos; c) boa fixação e coloração. O mesmo procedimento de leitura foi empregado para o controle de cada experimento.

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas percentuais para a presença ou ausência de alterações cromossômicas e das estatísticas:

média, desvio padrão e mediana para o número de alterações (gaps, quebras ou outras alterações) e foram analisados inferencialmente através dos testes de Friedman e Qui-quadrado de Pearson.

A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa estatístico utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 23.

RESULTADOS

Nesse trabalho foram analisadas 400 metáfases por paciente, sendo 100 metáfases referentes ao grupo controle e 300 ao grupo experimento, totalizando 1600 metáfases analisadas ao final da pesquisa.

Os resultados do presente estudo, de acordo com as condições em que foi realizado, revela que não houve diferenças estatísticas entre as taxas de mutações genéticas, *in vivo*, em seres humanos, entre o grupo controle e o grupo experimental relativas ao número de alterações por metáfase, na tabela 1, para o número de gaps cromatídicos ($P = 0,379$), quebras cromatídicas ($P = 0,381$), gaps cromossômicos ($P = 0,625$), quebras cromossômicas ($P = 0,092$) ou para outras alterações cromossômicas ($P = 0,766$). Assim, os dados mostraram que o Peróxido de Hidrogênio 35% utilizado para o clareamento dental não apresentou aumento estatisticamente significativo nas alterações cromossômicas na amostra estudada.

Para nenhuma das cinco variáveis se comprova diferença significativa entre as avaliações. A variabilidade expr essa através do desvio padrão se mostrou elevada desde que a referida medida teve valores superiores às médias correspondentes na maioria das variáveis.

Na Tabela 2 se apresenta a frequência de metáfases com alteração segundo a avaliação. Desta tabela se ressalta que, com exceção da terceira avaliação, houve um aumento no percentual de metáfases com alteração. A taxa na primeira avaliação foi de 2,8% e variou de 4,5% a 5,5% nas outras três avaliações, entretanto sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre as avaliações.

DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi investigar se o clareamento dental com gel de peróxido de hidrogênio a 35% causaria mutagenicidade nas células de linfócitos cultivadas de sangue humano. A realização de testes em culturas de células podem ajudar a avaliar os efeitos resultantes de uma concentração de agente específico através dos danos causados quer a estruturas dentárias quer a vias bioquímicas dentro das células (10).

Estudos para a avaliação de propriedades biológicas de clareadores contendo peróxido devem incluir ensaios de exposições agudas e crônicas, bem como potenciais efeitos sistêmicos e locais. Além disso, a escolha da dosagem, concentração, bem como o modo e a frequência de aplicação precisam ser considerado cuidadosamente para cada produto (8)

Zarzar et al. (17) em um estudo do tipo caso-controle investigou se o formocresol, na sua formulação original, é mutagênico *in vivo* em culturas de linfócitos obtidas a partir do sangue periférico de crianças. Eles viram que não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e o tratado. Entretanto, embora não existissem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratados, o formocresol foi mutagênico para um paciente, levando a dúvida sobre a conveniência do seu uso para pulpotomias em crianças. Os resultados revelaram que, do ponto de vista estatístico, o formocresol não é mutagênico. No entanto, são necessárias mais investigações, para observar se um aumento na quantidade do fármaco aumentaria a quantidade de aberrações cromossômicas e também para verificar a susceptibilidade individual a alterações cromossômicas com o uso de formocresol.

Leite et al. (18) também investigou o formocresol, usado para terapia de dentes decíduos, para um possível efeito genotóxico. A genotoxicidade foi testada em culturas de linfócitos do sangue periférico de crianças. Os achados mostram que houve diferença estatisticamente significante entre os grupos controle e tratado e em vista desses resultados, recomenda-se cautela no uso de formocresol na odontologia pediátrica.

No estudo de Naik, Tredwin e Scully (12), eles relatam que os radicais provenientes de oxigênio reativo, uma das substâncias finais do produto de degradação do Peróxido de Hidrogênio, podem causar quebras, genotoxicidade e citotoxicidade do DNA, entretanto, podem ser influenciados por mecanismos de proteção como a concentração da catalase,

enzima neutralizadora da ação do Peróxido de Hidrogênio e a atividade de reparação natural do DNA durante seu processo de replicação.

Munro et al. (19) pesquisou os produtos de clareamento de dentes contendo Peróxido de Hidrogênio ou Peróxido de Carbamida em relação ao risco potencial de câncer oral. Ele relata que o risco genotóxico da exposição ao peróxido de hidrogênio da mucosa oral encontrada a partir do uso de produtos para o branqueamento dos dentes é provavelmente muito pequeno. As exposições ao peróxido de Hidrogênio recebidas pela cavidade oral, incluindo áreas comumente associadas com câncer oral, são excessivamente baixas e não representam plausivelmente um risco para a promoção de células iniciadas ou para a indução de efeitos co-carcinogênicos em conjunto com fumo de cigarro ou álcool.

Em contra partida, Consolaro, Francischone e Consolaro (1), ao estudar o efeito carcinogênico dos agentes clareadores em hamsters, em um modelo experimental universalmente aceito e reconhecido como eficiente — no qual se utiliza como controle positivo o carcinógeno DMBA, ou 9,10-dimetil1,2-benzoantraceno, na mucosa bucal durante 22 semanas — verificou que, quando aplicados isoladamente, os agentes clareadores não revelavam-se carcinogênicos, ou seja, foram incapazes de, individualmente, iniciar um câncer bucal. Entretanto, no mesmo experimento aplicou-se o peróxido de hidrogênio na mucosa bucal de outros hamsters, em dias alternados com o DMBA, pelo mesmo período de tempo. Notou-se que houve um aumento considerável no número de animais com câncer bucal e no tamanho das lesões, bem maior do que no grupo de hamsters em que aplicou-se apenas o DMBA. Esse resultado indicou que o peróxido de hidrogênio não inicia, mas estimula a proliferação da célula iniciada, promove o surgimento morfológico da neoplasia maligna. Quando um agente químico tem essa propriedade é denominado como promotor. O peróxido de hidrogênio se caracteriza por ser um promotor, mas também é usado o termo co-carcinógeno. Um promotor, na boca, tem grande chance de atuar e colaborar na formação de uma neoplasia maligna.

Quando o Peróxido de Carbamida foi associado a células fibroblásticas, Santos et al. (10) testou a hipótese que quanto maior a concentração do peróxido de carbamida, maior a citotoxicidade provocada. Ele avaliou 3 concentrações de peróxidos de carbamida (10%, 16% e 22%) usados na técnica de clareamento caseiro, divididos em 3 grupos: grupo C10 (White Gold Home 10%, Dentsply), grupo C16 (White Gold Home 16%, Dentsply) e grupo C22 (Nite White 22%, ACP Discus Dental) quanto ao efeito citotóxico nos tecidos gengivais. O

ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando cultura de células (linhagem L929, fibroblastos de camundongos). Após a análise dos resultados pôde-se comprovar que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos C10, C16 e C22 com o grupo CC (controle de células). A quantidade de lise celular aumentou diretamente proporcional ao tempo de exposição dos materiais com as culturas de células, onde o peróxido de carbamida 22% foi mais citotóxico que os peróxidos de carbamida nas concentrações de 16 e 10% independentemente do tempo avaliado.

Ribeiro, Marques e Salvadori (7) estudaram o potencial genotóxico associado à exposição aos agentes clareadores dentais foi avaliado pelo teste de células individualizadas em gel (teste do cometa) in vitro. Células de ovário de hamster chinês (CHO) in vitro foram expostas a seis agentes clareadores dentais comercialmente disponíveis (Clarigel Gold – Dentsply; Whitespeed – Discus Dental; Nite White – Discus Dental; Magic Bleaching – Vigodent; Whiteness HP – FGM e Lase Peroxide – DMC). Os resultados mostraram que todos os agentes clareadores testados contribuíram para os danos no DNA, como demonstrado pela média do momento da cauda, sendo o efeito mais forte observado na mais alta dose de peróxido de hidrogênio (Whiteness HP e Lase Peroxide, na concentração de 35%). Onde os resultados sugeriram que os agentes clareadores dentais podem ser um fator que aumenta o nível de danos no DNA. Uma concentração de peróxido de hidrogênio mais elevada produziu atividades nocivas mais severas no genoma como detectado pelo teste do cometa.

Albuquerque et al. (5) avaliou a influência da aplicação tópica de Peróxido de Carbamida na proliferação de antígeno nuclear celular (PCNA) na mucosa bucal de ratos. Doze ratos machos Wistar foram submetidos à aplicação tópica de peróxido de carbamida a 10% em um dos lados da língua dorsal, uma vez por semana, durante três semanas consecutivas. Apenas água destilada foi aplicada no lado de controle. Os animais foram mortos nos dias 0, 10 e 20 após a última aplicação. A língua foi fixada em formalina tamponada durante 24 h e incorporada em parafina. Os blocos de tecido (3 um) foram submetidos ao sistema amplificado biotina-estreptavidina para identificação de PCNA. Calculou-se a percentagem de células basais epiteliais positivas em cada lado da mucosa da língua. Os resultados demonstraram que a aplicação tópica de peróxido de carbamida a 10% aumenta a expressão imunohistoquímica de PCNA na camada basal do epitélio da mucosa oral de ratos no dia 0 após o tratamento. Concluindo que o uso de peróxido de carbamida em cursos curtos induz a proliferação transitória de células epiteliais da mucosa oral de ratos.

Coldebella et al. (14) estudou os efeitos trans-esmalte e trans-dentinário de um gel de branqueamento com Peróxido de Hidrogênio a 35% em células tipo odontoblastos. Discos de esmalte / dentina obtidos de incisivos bovinos foram montados em câmaras de polpa artificiais (APCs). Foram formados três grupos: G1 - 35% H₂O₂; G2- 35% H₂O₂ + aplicação de luz halógena; G3- controle. Os tratamentos foram repetidos 5 vezes e as APCs foram incubadas durante 12 h. Em seguida, o extrato foi recolhido e aplicado durante 24 h nas células. O metabolismo celular, a dosagem total de proteínas e a morfologia celular foram avaliados. O metabolismo celular diminuiu em 62,09% e 61,83% em G1 e G2, respectivamente. A depressão do metabolismo celular foi estatisticamente significativa quando G1 e G2 foram comparados com G3. A dosagem total de proteínas diminuiu em 93.13% e 91.80% em G1 e G2, respectivamente. As células de G1 e G2 apresentaram alterações morfológicas significativas após o contato com os extratos. Independentemente da aplicação de luz halógena, os extratos causaram efeitos citopáticos significativamente mais intensos em comparação com o grupo de controle. Após 5 aplicações consecutivas de um agente de clareamento a 35% de Peróxido de Hidrogênio, quer catalisado quer não por luz de halógena, os produtos de degradação de gel foram capazes de difundir através do esmalte e da dentina provocando efeitos tóxicos para as células.

Ao contrário da grande popularidade do clareamento dental, as informações na literatura sobre os potenciais efeitos biológicos ainda são limitadas, com resultados controversos e inconclusivos (5,8,19,20).

Nesse estudo, a baixa taxa de mutagênese pode ser justificada pela utilização do agente dessensibilizante (Dessensibilize KF 2%; FGM Produtos Odontológicos Ltda, Joinville, SC, Brasil) antes da realização do procedimento. Foi utilizado um gel dessensibilizante de baixa viscosidade à base de nitrato de potássio, de ação neural, e fluoreto de sódio com ação oclusiva dos túbulos dentinários, diminuindo a quantidade de Peróxido de Hidrogênio que poderia entrar em contato com o tecido pulpar. Além de não ser possível mensurar a quantidade de Peróxido de Hidrogênio possa ter entrado em contato com a gengiva ou fluido gengival.

Apesar de não apresentar resultados estatisticamente significativos, devemos ficar atentos para o aumento da mutagenicidade apresentado entre o grupo controle e o experimento. Os Cirurgiões Dentistas devem sempre priorizar a segurança para o paciente.

Todos os materiais ou agentes químicos desenvolvidos para aplicação em áreas odontológicas ou médicas devem ser submetidos a testes prévios de citotoxicidade e biocompatibilidade para avaliar suas propriedades biológicas e fatores de risco antes de serem introduzidos no mercado (10).

Danos ao DNA e reparo eles são induzidos por uma variedade de mutagênicos e carcinógenos físicos e químicos e aparecem de alguma forma para refletir o processo mutagênico (12).

Futuras pesquisas devem ser realizadas para desenvolver técnicas de clareamento de dentes que ofereçam bons resultados clínicos sem promover uma intensa difusão de produtos tóxicos a concentrações suficientemente altas para causar danos irreversíveis às células da polpa (13, 14).

Conclui-se assim que a dose e o tempo utilizado no clareamento dental de consultório através do Peróxido de Hidrogênio 35% não apresenta potencial mutagênico considerável para causar danos aos linfócitos humanos.

AGRADECIMENTOS

O estudo foi financiado pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), apoiado pelo NPCB - UFPE (Núcleo de Pesquisa Clínica e Biomateriais da Universidade Federal de Pernambuco) e pelo LGCAH – UFPE (Laboratório de Genética e Citogenética Animal e Humana da Universidade Federal de Pernambuco)

REFERÊNCIAS

21. Consolaro A, Francischone LA, Consolaro RB. Tooth whitening products in toothpastes and mouthwashes may act as co-carcinogens in the oral mucosa: how to advise orthodontic patients and how to avoid undesirable effects. *Dental Press J. Orthod* 2011; 16: 28-35.
22. Tin-Oo MM, Saddki N, Hassan N. Factors influencing patient satisfaction with dental appearance and treatments they desire to improve aesthetics. *BMC Oral Health* 2011; 11: 6.
23. Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *J Dent* 2006; 34: 412-419.
24. Know SR, Wertz PW. Review of the Mechanism of Tooth Whitening. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2015; 27: 240-257.
25. Albuquerque RC, Gomez RS, Dutra RA, Vasconcellos WA, Gomez RS, Gomez MV. Effects of a 10% carbamide peroxide bleaching agente of rat oral epithelium proliferation. *Braz Dent J* 2002; 13: 162-165.
26. Soares DG, Ribeiro APD, Sacono NT, Loguercio AD, Hebling J, Costa CAS. Mineral loss and morphological changes in dental enamel induced by a 16% carbamide peroxide bleaching gel. *Braz Dent J* 2013; 24: 517-521.
27. Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF. Study of DNA damage induced by dental bleaching agents in vitro. *Braz Oral Res* 2006; 20: 47-51.
28. Li Y. biological properties of peroxide-containing tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology* 1996; 34: 887-904.
29. Mahony C, Felter SP, McMillan DA. An exposure-based risk assessment approach to confirm the safety of hydrogen peroxide for use in home tooth bleaching. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2006; 44: 75-82.

30. Santos RL, Pithon MM, Martins FO, Romanos MTV. Cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gel on L929 cells. *Rev. Odonto Ciên* 2010; 25; 271-275.
31. Canoglu E, Gulsahi K, Sahin C, Altundasar E, Cehreli ZC. Effect of bleaching agentes on sealing properties of diferente intraorifice barriers and root filling materials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17; e710-5.
32. Naik S, Tredwin CJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): review of safety in relation to possible carcinogenesis. *Oral Oncology* 2006; 42; 668-674.
33. Carey CM. Tooth whitening: what me now know. *J Evid Based Dent Pract* 2014; 70-76.
34. Coldebella CR, Ribeiro APD, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CAS. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J* 2009; 20; 267-274.
35. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effect of carcinogens in humans. *Mutat Res* 2000; 463; 111-172.
36. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hugerford DA. Chromossome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res* 1960; 20; 613-616.
37. Zarzar PA, Rosenblatt A, Takahashi CS, Takeuchi PL, Costa Junior LA. Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: na in vivo study. *J Dent* 2003; 31; 479-485.
38. Leite ACGL, Rosenblatt A, Calixto MS, Silva CM, Santos N. Genotoxic effect of formocresol pulp therapy of deciduous teeth. *Mutation Research* 2012; 747; 93-97.
39. Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R. Tooth whitening products and the risk of oral câncer. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44; 301-315.

40. Roderjan DA, Stanislawczuk R, Hebling J, Costa CAS, Reis A, Loguercio AD. Response of human pulps to diferente in-office bleaching techniques: preliminar findings. Braz Dent J 2015; 26; 242-248.

TABELAS

Tabela 1 – Estatísticas relativas ao número de alterações por metáfase (400) segundo a avaliação

Alterações	Avaliação				Valor p
	Primeira Média ± DP Mediana	Segunda Média ± DP Mediana	Terceira Média ± DP Mediana	Quarta Média ± DP Mediana	
Nº gaps cromatídicas	0,010 ± 0,100 0,100	0,023 ± 0,165 0,025	0,028 ± 0,164 0,025	0,020 ± 0,140 0,020	p ⁽¹⁾ = 0,379
Nº gaps cromossômicos	0,000 ± 0,000 0,000	0,005 ± 0,071 0,005	0,002 ± 0,050 0,00	0,00 ± 0,000 0,00	p ⁽¹⁾ = 0,625
Nº quebras cromatídicas	0,010 ± 0,100 0,010	0,020 ± 0,140 0,010	0,013 ± 0,132 0,010	0,023 ± 0,148 0,025	p ⁽¹⁾ = 0,381
Nº quebras cromossômicas	0,007 ± 0,086 0,00	0,002 ± 0,050 0,00	0,00 ± 0,00 0,00	0,013 ± 0,111 0,015	p ⁽¹⁾ = 0,092
Nº outras alterações cromossômicas	0,00 ± 0,00 0,00	0,005 ± 0,071 0,000	0,005 ± 0,071 0,005	0,002 ± 0,050 0,00	p ⁽¹⁾ = 0,766

(1) Através do teste de Friedman.

Tabela 2 – Avaliação do número de metáfases com alteração segundo a avaliação

Com alteração	Avaliação								Valor p
	Primeira		Segunda		Terceira		Quarta		
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Sim	11	2,8	21	5,3	18	4,5	22	5,5	p ⁽¹⁾ = 0,230
Não	389	97,2	379	94,7	382	95,5	378	94,5	
TOTAL	400	100,0	400	100,0	400	100,0	400	100,0	

(1) Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

APÊNDICE B – ORIENTAÇÕES PÓS CLAREAMENTO DENTAL

INSTRUÇÕES PÓS-TRATAMENTO DE CLAREAMENTO DENTAL

- Não fumar na primeira hora após o clareamento;
- Evitar a ingestão de frutas ácidas ou bebidas gasosas na primeira hora;
- Às 48 horas após o clareamento são as mais críticas, portanto é recomendado evitar a ingestão de substâncias que contenham corantes. (Ex. café, chocolate, refrigerante a base de cola, molho vermelho, beterraba, vinho tinto, etc.);
- Evitar, durante as primeiras horas, a ingestão de alimentos com altas variações de temperatura (alimento muito quente ou muito frio);
- Escovar os dentes de forma regular, empregando escova macia associada a pastas pouco abrasivas;
- Bochechos com substâncias a base de fluoretos na forma incolor e neutro em concentrações abaixo de 2% de fluoreto de sódio, poderão ser utilizados nas 48 horas após o clareamento;
- Um grau leve de sensibilidade poderá estar presente nas 04 horas subsequentes ao tratamento de clareamento. Nos casos de sensibilidade moderada ou alta poderá fazer uso de analgésico ou até mesmo de anti-inflamatório.

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS
OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU
EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa
“**MUTAGENICIDADE DOS LINFÓCITOS ATRAVÉS DE AGENTES DE CLAREAMENTO DENTAL**”,
que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) **Cleudes Hercila do Nascimento Lima**,
Endereço: Rua Dona Etelvina Batista, 111, Jardim São Paulo - Recife (PE) - CEP: 50910-490 Fone:
(81) 99291-1061 / e-mail: cludeshercila@gmail.com e está sob a orientação de: Dr. Arnaldo de
França Caldas Júnior. Telefones para contato: (2126-8344), e-mail: caldasjr@aldeia.com.br.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam
compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao
final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo
pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via
lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso você não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o
consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Neste estudo pretendemos investigar se os agentes de clareamento dental causam alguma alteração nas células sanguíneas obtidas a partir do sangue de adultos. O motivo que nos leva a estudar esse assunto é tentar esclarecer os danos do clareamento dental que ainda não foram apresentados. Para este estudo será realizado o preenchimento de um prontuário clínico como forma de detalhamento da história médica/odontológica do voluntário e posteriormente serão promovidas sessões de clareamento dental e coleta sanguínea.
- A participação do voluntário na pesquisa terá duração de 3 (três) semanas, com tempo aproximado de 1 (uma) hora por semana. Serão promovidas 3 (três) sessões de clareamento dental clínico, onde serão coletados 5 ml de sangue, através de coleta venosa, antes da primeira sessão e 24 h após cada sessão de clareamento. Sua participação terá início a partir do momento que aceitar participar da pesquisa e logo após a última coleta sanguínea, você será liberado, encerrando assim sua participação na pesquisa.
- Os riscos ao voluntário estão ligados a um possível desconforto causado pela sensibilidade dentária após o procedimento, risco de queimadura da mucosa durante o procedimento, risco de hematomas ou coleta de sangue da artéria durante a coleta sanguínea e algum constrangimento que você possa ter por não atender as expectativas de clareamento dental, sendo essas possibilidades reduzidas e amenizadas pela utilização da técnica correta de clareamento e participação de profissionais capacitados para a punção sanguínea.

- O benefício para o voluntário desta pesquisa é a ação clareadora resultante do clareamento dental promovido, elevando a sua autoestima e satisfação estética com o seu sorriso, além de esclarecer possíveis danos do clareamento dental que ainda não foram apresentados.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (prontuário) ficarão armazenados em pastas de arquivo e em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora Cleudes Hercila do Nascimento Lima, no endereço acima informado, pelo período de (mínimo 5 anos).

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em caso de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br)**.

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **“MUTAGENICIDADE DOS LINFÓCITOS ATRAVÉS DE AGENTES DE CLAREAMENTO DENTAL”**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do Participante _____

Impressão digital
(opcional)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXO A - FICHA CLÍNICA MODELO CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA

FICHA CLÍNICA

(Identificação do Profissional)

NOME DO PROFISSIONAL CIRURGIÃO-DENTISTA - CLÍNICO GERAL CRO-(UF)
N° _____ Endereço completo

(Identificação do Paciente e do Responsável pelo Tratamento)

Prontuário n° _____.

Nome

_____ RG.
n°. _____ Órgão Expedidor _____ CPF n°. _____ / _____ Data de
Nascimento ____ / ____ / ____ Sexo _____ Naturalidade
_____ Nacionalidade _____ Estado Civil
_____ Profissão _____ Endereço
Residencial _____

_____ Endereço
Profissional _____

Indicado por _____
Convênio _____ N° de Inscrição _____ CD.
anterior _____ Atendido em ____ / ____ / ____

RESPONSÁVEL PELO TRATAMENTO

Nome _____ RG.
n°. _____ Órgão Expedidor _____ CPF n°. _____ / _____ Estado
Civil: _____ Cônjuge _____ RG. n°. _____
_____ Órgão Expedidor _____ CPF n°. _____ / _____

FICHA DE ANAMNESE

Queixa Principal e Evolução da Doença Atual _____

Questionário de Saúde

Sofre de alguma doença: () Sim () Não - Qual(is) _____
Está em tratamento médico atualmente? () Sim () Não. Gravidez: Sim () Não ()
Está fazendo uso de alguma Medicação? () Sim () Não - Qual(is) _____

Nome do Médico Assistente/telefone: _____

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

Já foi operado? () Sim () Não -Qual(is) _____

Teve problemas com a cicatrização? Sim () Não ()

Teve problemas com a anestesia? Sim () Não ()

Teve problemas de Hemorragia? Sim () Não ()

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 (); Hábitos: _____

Antecedentes Familiares: _____

_____ Outras
observações importantes: _____

Declaro que as informações acima prestadas são totalmente verdadeiras.

Local, Data

Assinatura do Paciente ou seu Responsável Legal

EXAME FÍSICO

GERAL: _____

EXTRA-ORAL: _____

INTRA-ORAL: _____

EXAME DENTAL – DESCRIÇÃO DENTE – A – DENTE

18 _____
17 _____
16 _____

- 15(55) _____
- 14(54) _____
- 13(53) _____
- 12(52) _____
- 11(51) _____
- 21(61) _____
- 22(62) _____
- 23(63) _____
- 24(64) _____
- 25(65) _____
- 26 _____
- 27 _____
- 28 _____
- 38 _____
- 37 _____
- 36 _____
- 35(75) _____
- 34(74) _____
- 33(73) _____
- 32(72) _____
- 31(71) _____
- 41(81) _____
- 42(82) _____
- 43(83) _____
- 44(84) _____
- 45(85) _____
- 46 _____
- 47 _____
- 48 _____

ODONTOGRAMA

Registro de Anormalidades e Patologias

ANEXO B - TÉCNICA DO CLAREAMENTO DENTAL - FGM

Técnica de clareamento recomendada pela FGM:

1º passo: Profilaxia, para a eliminação de manchas superficiais que não podem ser removidas na escovação. Pode-se utilizar o jato de bicarbonato, taça de borracha ou escova de *Robinson* com pasta profilática.

2º passo: Inserção do afastador labial ARC FLEX (FGM) e aplicação do agente dessensibilizante DESSENSIBILIZE KF 2% (FGM) por 10 minutos.

A seguir, lavar e secar dentes e gengiva.

3º passo: Aplicação da barreira gengival TOP DAM (FGM).

A barreira deverá cobrir toda a margem gengival e cerca de 1 mm da cervical dos dentes.

Após aplicar em um segmento (3 ou 4 dentes), fotopolimerize a barreira gengival por 10 segundos e siga para os outros dentes.

Certifique-se de cobrir toda a margem gengival com a barreira, Caso haja lacunas, acrescente material.

4º passo: Manipulação do agente clareador Whiteness HP MAXX

O produto apresenta-se em frascos separados que devem ser misturados gota a gota no recipiente que acompanha o kit.

Um frasco contém o espessante e o outro contém o peróxido de hidrogênio.

Agite o frasco do espessante vigorosamente e dispense as gotas no recipiente misturador, logo após adicione o peróxido de hidrogênio. A proporção deverá ser de 3:1 (PH : espesante)

Misture durante 40 segundos até obter um gel viscoso. Neste momento o gel está pronto para uso.

Com a espátula, aplique o gel na face vestibular dos dentes a serem clareados, devendo permanecer por 15 minutos. Ele mudará da cor vermelho carmin a verde claro.

Após 15 minutos, remova o gel com o sugador e realize mais 2 aplicações de 15 minutos cada na mesma sessão.

Ao final da sessão remova o TOP DAM.

5 passo: Para concluir, fazer o polimento do esmalte com DIAMOND FLEX E DIAMOND EXCEL.

O kit também possui um terceiro frasco chamado Neutralize (enzima catalase), que deve ser aplicado na mucosa em caso de contato com o gel clareador, neutralizando-o.

ANEXO C - NORMAS DA REVISTA



ISSN 0103-6440 *print version*
ISSN 1806-4760 *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Submission of manuscript](#)

Scope and policy

The **Brazilian Dental Journal** publishes Full-Length Papers, Short Communications and Case Reports, dealing with dentistry or related disciplines. Only original papers will be considered for publication. In submitting a manuscript, the authors should state in the cover letter that the material has not been published previously and is not under consideration by another journal in either electronic or printed versions.

ELECTRONIC ADDRESS FOR SUBMISSION

<http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>

MANUSCRIPTS MUST BE SUBMITTED IN ENGLISH. Authors whose primary language is not English must have their manuscript reviewed by someone proficient in English. **Manuscripts accepted for publication will be submitted to the Technical Review for revision of English grammar and scientific writing and to fit the text into the Journal's standards. The cost of the Technical Review will be charged to the authors. Submission of a manuscript to BDJ implies the acceptance of these terms.** The decision of acceptance for publication relies on the Editors and is based on the recommendation of the Editorial Board and/or *ad hoc* reviewers. Authors of manuscripts not recommended for publication will receive an email explaining the decision. The concepts emitted in the papers published in the BDJ are the sole responsibility of the authors, not necessarily reflecting the Editorial Board's opinion.

Articles accepted for publication become property of the journal.

The Journal adopts plagiarism identification system (AntiPlagiarist - ACNP Software)

Form and preparation of manuscripts

THE FOLLOWING GUIDELINES MUST BE FOLLOWED CAREFULLY.

General

- • The authors must submit the manuscript in Word and in PDF, comprising the title page, text, tables, figure captions and figures (photographs, micrographs, radiographs, schematic drawings, graphs, computer-generated images, etc).
- • The manuscript must be typed in Times New Roman 12 font, with 1.5 spacing, 2.5-cm margins at each side. **DO NOT USE** bold letters, watermarks or other resources to make the text visually attractive.
- Pages should be numbered consecutively, starting with the summary.
- Full-length manuscripts are assembled in the following sections:
 - 1) Title Page
 - 2) Summary and Key Words
 - 3) Introduction; Material and Methods; Results; Discussion
 - 4) Summary in Portuguese (an item necessary for Latin American Indexing Services that will be provided for non-Brazilian authors by the Journal)
 - 5) Acknowledgements (if any)
 - 6) References
 - 7) Tables
 - 8) Figure captions
 - 9) Figures
- All titles of sections (Introduction, Material and Methods, etc) must be capitalized in regular font type (not bold).
- Results and Discussion **MUST NOT** be joined in a single section.
- Short Communications and Case Reports should be divided into appropriate sections.
- Products, equipments and materials: the trade name must be followed by the manufacturer's name, city, state and country, within parentheses upon first mention. For further mentions, only the manufacturer's name is required.
- All abbreviations must be explained at first mention.

Title page

- The first page must contain the title of the manuscript, a short title (maximum of 40 characters, to be used as a running head), author(s) name(s) (no more than 6)

and their Department(s), School(s) and/or University (s). **DO NOT INCLUDE** the author's titles (DDS, MSc, PhD, etc.) or position (Professor, Graduate student, etc.).

- Provide the name and **complete** address of the corresponding author (inform email, telephone and fax numbers).
- The title page must be uploaded at the website as a separate file (not included in the body of the manuscript).

Manuscript

- The first page of the manuscript must contain: title of the manuscript, short title with no more than 40 characters, and NO authors' names or identification.

Summary

- The second page should contain a summary of no more than 250 words, stating the aims, methods, results, and any conclusions drawn from the study. Do not use topics and paragraphs and do not cite references in the Summary.
- A list of key words (no more than 5) should be included below the summary in lowercase letters, separated by commas.

Introduction

- Summarize the purpose of the study, giving only pertinent references. Do not review existing literature extensively. State clearly the working hypothesis.

Material and Methods

- Material and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. **Indicate the statistical methods used, if applicable.**

Results

- Present the results in a logical sequence in the text, tables and figures, emphasizing the important information.
- Do not repeat in the text data contained in the tables and illustrations. The important observations should be emphasized.
- Do not repeat the same data in tables and figures.
- Describe the statistical data in this section.

Discussion

- Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section.
- Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite pertinent studies.
- Present your conclusions at the end of the Discussion, indicating how your study is pertinent and/or its clinical implications. Presentation of the conclusions in topics should be avoided.

Summary in Portuguese (for Brazilian authors only)

- The Summary in Portuguese should be **IDENTICAL** to the English version (Summary). **DO NOT INCLUDE** title and key words in Portuguese.

Acknowledgements

- Financial support by government agencies should be acknowledged. If appropriate, technical assistance or assistance from colleagues may be acknowledged.

References

- References must follow the Journal's style. Authors should refer to a current issue of the BDJ for guidance on reference citation and presentation of the reference list.
- References must be numbered consecutively in the text in order of citation, within parentheses, without space between numbers: (1), (3,5,8), (10-15). **DO NOT USE** superscript numbers.
- For papers with two authors, cite both authors in the text, as follows: Ex: "According to Santos **and** Silva (1)...". If there are more than 3 authors, cite only the first author and add "et al.". Ex: "Pécora et al. (2) reported that..."
- All authors of each paper should be included in the Reference List unless there are 7 or more. In this case, the first 6 authors should be given, followed by "et al.".
- The reference list must be typed at the end of the manuscript in numerical sequence. **No more than 25 references may be cited.**
- Citation of abstracts and books, as well as articles published in non-indexed journals should be avoided, unless absolutely necessary. **Do not cite references in Portuguese.**

- Abbreviations of journal titles should conform to those used in Dental Index. The style and punctuation of references must follow the format illustrated below:

Journal articles

1. Lea SC, Landini G, Walmsley AD. A novel method for the evaluation of powered toothbrush oscillation characteristics. *Am J Dent* 2004;17:307-309.

Book

2. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. *A Textbook of Oral Pathology*. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1983.

Chapter in a Book

3. Walton RE, Rotstein I. Bleaching discolored teeth: internal and external. In: *Principles and Practice of Endodontics*. Walton RE (Editor). 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p 385-400.

Tables

- Each table with its title must be typed after the text. Tables should be numbered with Arabic numerals. **DO NOT USE** vertical lines, bold letters and capital letters (except the initials).
- The corresponding title should appear at the top of each table.
- Tables must contain all necessary information and be understandable without allusions to the text.

Figures

- **BDJ WILL NOT ACCEPT FIGURES EMBEDDED IN FILES ORIGINATED IN TEXT-EDITING SOFTWARE (WORD OR SIMILAR) OR FIGURES ORIGINATED IN POWER POINT.**
- The digital files of the images should be generated in Photoshop, Corel or any other image-editing software and saved in the CD-ROM. Image files should have TIFF extension and 300 dpi minimum resolution. Only BLACK & WHITE figures are accepted. Save the figures in the CD-ROM.
- Lettering and identifying marks must be clear and sharp, and the critical areas of x-rays and photomicrographs must be demarcated and/or isolated.
- Separate parts of composite figures must be labeled with capital letters (A, B, C, etc). Single figures and composite figures must have minimum width of 8 cm and 16 cm, respectively.
- Figure captions should be numbered with Arabic numerals and typed on a separate page, after the lists of references or after the tables (if

any)

Submission of manuscripts

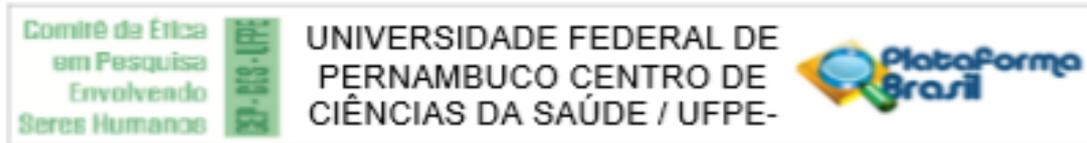
CHECKLIST FOR AUTHORS PRIOR TO SUBMISSION

1. Submission letter;
2. Title page.
3. Manuscript file (text, tables, figure captions).
4. In the manuscript, observe:
 - identification of authors only on the title page.
 - text typed in Times New Roman 12 font, with 1.5 spacing, 2.5-cm margins at each side.
 - tables, figure captions and figures at the end of the manuscript.
5. Digital files of figures, black & white, saved in TIFF format with minimum resolution of 300 dpi.

There are no fees for submission and evaluation of articles.

The Technical Review Fee ranges from R\$450,00 to R\$ 550,00 Reais Brasileiros (for Brazilian authors) or U\$200 to 300 American dollars (for foreign authors) and will be charged to the corresponding author, even if only minor corrections to the manuscript are needed.

ANEXO D - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP



Continuação do Parecer: 1.571.588

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram bem descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante uma vez que a cada dia a busca pela beleza tem exigido cada vez mais das pessoas a perfeição estética. E neste momento o clareamento dental é um procedimento de grande interesse por parte dos dentistas e também dos pacientes por ser um procedimento popular de técnica simples, eficácia clínica comprovada e natureza não-invasiva. Porém possíveis alterações causadas pelo uso de agentes de clareamento indiscriminadamente pode potencialmente causar danos aos tecidos dentais. Pouco se conhece sobre os agentes clareadores e seus mecanismos de ação sobre os tecidos dentais, assim, torna-se importante o presente estudo que se propõe a avaliar se há efeitos dos agentes clareadores nas células de linfócitos sanguíneos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto devidamente assinada e carimbada; cartas de anuência do Departamento de Prótese e Cirurgia Buco Maxilo Facial e do Departamento de Genética do CCB; TCLE para maiores de 18 anos e emancipados adequado; Projetos em ambos os formatos adequados; Curriculum Lattes de todos os pesquisadores anexados; termo de confidencialidade devidamente assinado datado.

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

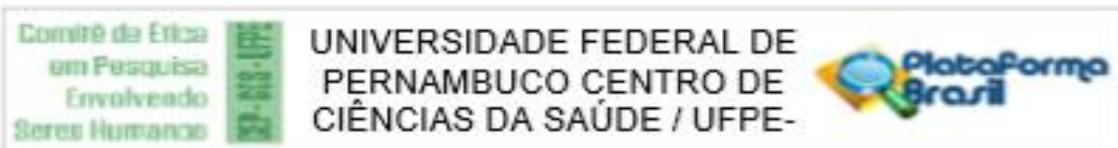
Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepecs@ufpe.br



PARECER COM SUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MUTAGENICIDADE DOS LINFÓCITOS ATRAVÉS DE AGENTES DE CLAREAMENTO DENTAL.

Pesquisador: Cleudes Hercília do Nascimento Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55555716.2.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.571.588

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto apresentado pela aluna Cleudes Hercília do Nascimento Lima, a coordenação de Pós-graduação em Odontologia, no programa de Mestrado em Odontologia com área de concentração em Clínica Integrada. Sob a orientação do Prof. Dr. Arnaldo de França Caldas Júnior e co-orientação do Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro e da Prof.ª Dr.ª. Márcia Maria Vendiciano Barbosa Vasconcelos.

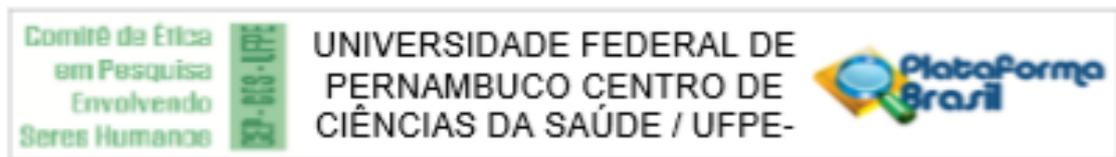
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral: Investigar se os agentes de clareamento dental são mutagênicos in vivo à culturas de linfócitos obtidos a partir do sangue de adultos atendidos nas clínicas odontológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Objetivos específicos:

- 1- Analisar a indução de danos nas células linfocitárias no período pós-tratamento quando os dentes são submetidos aos géis clareadores.
- 2- Avaliar a citotoxicidade trans-amelodentinária de géis clareadores em células de linfócitos após diferentes períodos de aplicação do produto na superfície dentária.
- 3- Comparar os resultados do grupo controle e do grupo experimental.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.571.588

identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_634647.pdf	28/04/2016 00:43:51		Aceito
Outros	Termo_confidencialidade.JPG	28/04/2016 00:43:07	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Cleudes.docx	27/04/2016 12:49:39	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.docx	27/04/2016 12:49:22	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
Outros	Anuencia_odontologia.JPG	27/04/2016 12:44:57	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
Outros	Anuencia_genetica.JPG	27/04/2016 12:43:35	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Neide.pdf	25/04/2016 12:17:45	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	25/04/2016 12:13:28	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Marcia.pdf	25/04/2016 11:54:37	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Jose_Thadeu.pdf	25/04/2016 11:54:21	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Cleudes.pdf	25/04/2016 11:53:58	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** oepcos@ufpe.br

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---	---

Continuação do Parecer: 1.571.588

Outros	Curriculo_Lattes_Arnaldo.pdf	25/04/2016 11:53:30	Cleudes Hercila do Nascimento Lima	Aceito
--------	------------------------------	------------------------	---------------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 02 de Junho de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: ospocs@ufpe.br