

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

ANNA PAULA SILVA COELHO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM
PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO
CONTROLADO

Manaus - AM

2024

ANNA PAULA SILVA COELHO

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM
PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO
CONTROLADO

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Vianna Pereira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciana Mendonça da Silva Martins

Manaus - AM

2024

Ficha Catalográfica

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

C672a Coêlho, Anna Paula Silva
Avaliação do potencial genotóxico do clareamento dental em
pacientes com diferentes faixas etárias: estudo clínico controlado /
Anna Paula Silva Coêlho . 2024
72 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Juliana Vianna Pereira
Coorientadora: Luciana Mendonça da Silva Martins
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Genotoxicidade. 2. Citotoxicidade. 3. Micronúcleos. 4.
Clareamento Dental. I. Pereira, Juliana Vianna. II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

ANNA PAULA SILVA COELHO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM
PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO
CONTROLADO**

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

Manaus, 28 de fevereiro de 2024.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Juliana Vianna Pereira, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof.^a Dr.^a. Nikeila Chacon de Oliveira Conde, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof.^a Dr.^a. Adriana Corrêa de Queiroz Pimentel, Membro
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e amigos que foram meu apoio nos momentos difíceis desta etapa tão importante da minha vida. Agradeço por todo o suporte oferecido, pelo carinho e por terem vivido comigo essa conquista.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas**, setor administrativo e corpo docente pelo empenho, comprometimento e dedicação.

À **Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM** pela bolsa de estudos.

A **Deus e Nossa Senhora** pela oportunidade de realizar essa graduação e pela proteção e graça que me foi concedida.

À **minha família** pelo incentivo e apoio durante toda a caminhada e por estarem firmes ao meu lado em cada passo e escolha.

A todos os **Professores da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO-UFAM)**, minha eterna admiração e agradecimento por todos os ensinamentos compartilhados.

À minha orientadora, **Professora Dr^a Juliana Vianna Pereira**, por todo seu apoio, sua paciência, compreensão nos momentos de dificuldade, dedicação e comprometimento em todos os projetos desde a graduação. Muito obrigada por ser uma grande inspiração e pelos ensinamentos que me fizeram evoluir não apenas academicamente.

À **Professora Dr^a Nikeila Chacon de Oliveira Conde** por me ensinar a ser persistente, pelo apoio e por acreditar em mim. Obrigada por ser esta pessoa incrível e que tanto admiro.

A todos meus amigos: **Açucena Dall'Alba, Tássia Mendes, Louisimara Alencar, Ingrid Cunha, Romyne Bastos e Débora Rosa**. Nossa trajetória foi mais leve por estarmos juntos e que possamos levar essa amizade além do mestrado.

“Nada é suficientemente bom. Então vamos fazer o que é certo, dedicar o melhor dos nossos esforços para atingir o inatingível, desenvolver ao máximo os dons que Deus nos concedeu e nunca parar de aprender.”

Ludwig Van Beethoven.

RESUMO

O clareamento dental vem sendo amplamente utilizado como uma opção conservadora para tratamentos estéticos. No entanto, preocupações sobre a segurança do método em relação a uma possível carcinogenicidade ainda são levantadas. Este ensaio clínico controlado avaliou o potencial genotóxico do clareamento dental de consultório em pacientes com diferentes faixas etárias. Trinta e dois voluntários, de ambos os sexos, foram divididos em dois grupos: grupo 1 - pacientes com idade entre 14 - 19 anos e grupo 2 - 30 - 39 anos. Os pacientes foram submetidos a duas sessões de clareamento, com intervalo de 7 dias, com gel de Peróxido de Hidrogênio a 35%, durante 40 minutos. O teste de micronúcleos e as alterações nucleares foram realizados a partir da contagem de 2000 células em três tempos: antes do procedimento clareador (T0), imediatamente após o fim do tratamento (T14) e 30 dias após o final do tratamento (T30). Os dados, entre os dois grupos, em cada intervalo de tempo, foram avaliados com o teste de Mann-Whitney e entre cada grupo, nos diferentes intervalos de tempo, com o teste de Friedman. A contagem de micronúcleos não indicou potencial genotóxico nos grupos estudados: grupo 1: T0: $0,97 \pm 0,43$; T14: $1,47 \pm 0,62$; T30: $1,34 \pm 0,68$; grupo 2: T0: $0,81 \pm 0,57$; T14: $1,22 \pm 0,55$; T30: $1,06 \pm 0,75$ ($p > 0,05$), independente dos tempos analisados ($p > 0,05$). Houve diferença significativa para a presença de células binucleadas no grupo 1 ($p = 0,00$), permanecendo aumentadas mesmo após 30 dias do término do clareamento dental em ambos os grupos (grupo 1: $p = 0,01$ e grupo 2: $p = 0,04$). Conclui-se que o clareamento dental de consultório não apresenta potencial genotóxico para o marcador micronúcleo. As células binucleadas foram mais frequentes em pacientes de ambos os grupos, permanecendo elevadas 30 dias após o clareamento.

Palavras-chave: Genotoxicidade, Citotoxicidade, Micronúcleos, Clareamento Dental.

ABSTRACT

Teeth whitening has been widely used as a conservative option for aesthetic treatments. However, concerns about the safety of the method in relation to possible carcinogenicity are still raised. This controlled clinical trial evaluated the genotoxic potential of in-office teeth whitening in patients with different age groups. Thirty-two volunteers, of both sexes, were divided into two groups: group 1 - patients aged between 14 - 19 years and group 2 - 30 - 39 years. The patients underwent two whitening sessions, 7 days apart, with 35% Hydrogen Peroxide gel, for 40 minutes. The micronucleus test and nuclear changes were performed by counting 2000 cells at three times: before the bleaching procedure (T0), immediately after the end of treatment (T14) and 30 days after the end of treatment (T30). Data between the two groups, at each time interval, were evaluated with the Mann-Whitney test and between each group, at different time intervals, with the Friedman test. The micronuclei count did not indicate genotoxic potential in the groups studied: group 1: T0: 0.97 ± 0.43 ; T14: 1.47 ± 0.62 ; T30: 1.34 ± 0.68 ; group 2: T0: 0.81 ± 0.57 ; T14: 1.22 ± 0.55 ; T30: 1.06 ± 0.75 ($p > 0.05$), regardless of the times analyzed ($p > 0.05$). There was a significant difference in the presence of binucleated cells in group 1 ($p = 0.00$), remaining increased even 30 days after the end of tooth whitening in both groups (group 1: $p = 0.01$ and group 2: $p = 0.04$). In conclusion, in-office tooth whitening does not present genotoxic potential for the micronucleus marker. Binucleated cells were more frequent in patients in both groups, remaining elevated 30 days after bleaching.

Keywords: Genotoxicity, Cytotoxicity, Micronuclei, Tooth Whitening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Coleta do esfregaço na gengiva	45
Figura 2: A – Fixação com metanol, B – Coloração de Giemsa, C, D – Lavagem das lâminas, E – Aplicação do adesivo Entellan, F – Lâminas prontas para a leitura	46
Figura 3: Célula diferenciada com presença de micronúcleo evidenciada pelo corante Giemsa	48
Figura 4: Fluxograma de distribuição da amostra	51

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Protocolo de coloração das lâminas	45
Quadro 2 - Descrição das alterações celulares avaliadas na pesquisa	48
Tabela 1: Características dos grupos experimentais	51
Tabela 2: Média e desvio padrão da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares por 2000 células de acordo com as diferentes faixas etárias e intervalos de tempo avaliados	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1M2; M1.5. - Escala de cor *Vita bleachedguide 3d-master shade guide*

A1; A2 - Escala de cores *Vita Classical*

ANOVA - Análise de variância unilateral

BE - *Broken eggs*

BN - Células binucleadas

CAAE - Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CC - Células com cromatina condensada

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

CL - Cariólise

cm - Centímetros

CONEP/MS - Conselho Nacional de Saúde em Pesquisa

CONSORT - *Consolidated Standards of Reporting Trials*

CR - Cariorrexe

D - Tempo no clareamento domiciliar

DAPI - 4', 6'-diamidino-2-fenilindol

DNA - Ácido desoxirribonucleico

g - Grama

g/L - Grama por Litro

h - Hora

HP - Peróxido de hidrogênio

HUMNXL - *HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells*

I² - estatística I² de Higgins e Thompson

IC - Intervalo de confiança

kg - Quilograma

mg - Miligrama

mg/mL - Miligrama por mililitro

min - Minutos

min/dia - Minutos por dia

mL/L - Mililitro por Litro

MN - Micronúcleos

mol/L - Mol por Litro

n- Número amostral

NAs - Alterações nucleares

NB - Botões nucleares

OMS – Organização Mundial da Saúde

p - Probabilidade de significância

PC - Peróxido de carbamida

PIC - Picnose

PRISMA - Conjunto mínimo de itens baseados em evidências para relatar estudos em revisões sistemáticas e meta-análises

T - Tempo

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFAM - Universidade Federal do Amazonas

VAS - Escala Visual Analógica

μmol/ L- Micromol por Litro

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Por cento

/ - barra

< - Menor

= - Igual

> - Maior

± - Mais ou menos

≤ - Menor ou igual

® - Marca Registrada

3D - Três dimensões

x - Número de vezes do aumento no microscópio

X² - Qui-quadrado

α - Nível de significância teste de *Mann-Whitney e Tukey*

° - Grau

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Potencial genotóxico em estudos sobre clareamento dental	16
2.2 Estudo das Alterações Nucleares	25
2.3 Evolução do método para mensuração da instabilidade cromossômica ...	34
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivos específicos	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Aspectos éticos	41
4.2 Desenho do estudo	42
4.3 Critérios de elegibilidade	42
4.4 Desfecho primário	43
4.5 Desfecho secundário	43
4.6 Cálculo do tamanho da amostra	43
4.7 Métodos de alocação dos grupos experimentais	43
4.8 Coleta e fixação do esfregaço	44
4.9 Avaliação das lâminas/ contagem dos micronúcleos e outras alterações nucleares	46
4.10 Análise estatística	50
RESULTADOS	50
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	62
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do participante...	62
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do responsável...	65
APÊNDICE C - Termo de Assentimento do menor	68
ANEXOS	70
ANEXO 1 - Parecer Consubstanciado do CEP	70

1 INTRODUÇÃO

A coloração dos dentes foi apontada como o principal motivo de insatisfação com a aparência dental (REZENDE et al., 2016). Neste sentido, há uma valorização de procedimentos estéticos cada vez menos invasivos, como as técnicas de clareamento dental, levando ao aumento da demanda por procedimentos clareadores em consultórios odontológicos (JOINER; LUO, 2017; REZENDE et al., 2016).

A alteração da coloração dentária pode ser resultado de fatores intrínsecos ou extrínsecos, e o clareamento dental pode proporcionar uma solução conservadora e não restauradora. No entanto, há uma preocupação relacionada à segurança do método devido à forte capacidade do agente clareador induzir estresse oxidativo sobre o tecido gengival, podendo ocasionar danos às estruturas celulares (SILVEIRA et al., 2022).

O clareamento dental realizado em consultório destaca-se por possuir um resultado estético mais rápido e possuir maior controle da aplicação pelo cirurgião-dentista (GEUS et al., 2015). Contudo, o peróxido de hidrogênio (HP), quando não utilizado de forma segura, é responsável por agressões à mucosa bucal, incluindo irritação, queimaduras e sensibilidade, além de ocasionar alterações na taxa de proliferação e morfologia celular (NAIK; TREDWIN; SCULLY, 2006).

Para proteger o tecido gengival das agressões provocadas pelo HP, faz-se o uso de barreiras gengivais (ALMEIDA et al., 2015). A aplicação da barreira gengival pode contribuir para o aumento observado no número de micronúcleos (MN). MN são corpos extranucleares formados por fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros com atraso durante a anáfase (BONASSI et al., 2011), representando dano ao DNA ou instabilidade genômica (SOMMER et al., 2020). Os monômeros de metacrilatos em contato com a mucosa gengival podem provocar reações alérgicas ou irritações leves, podendo gerar alterações nucleares (NAs) em decorrência das reações de polimerização e contração (REZENDE et al., 2016).

As respostas dos tecidos gengivais podem ser diferentes dependendo da faixa etária do paciente. A frequência normal de micronúcleos nas células da mucosa é entre 0,5 e 2,0 / 1000 células (NERSESYAN *et al.*, 2006; NADERI, FARHADI, SARSHAR, 2012). Dentre os métodos citogenéticos para avaliação de genotoxicidade

nas células epiteliais, destaca-se o teste de MN. A técnica é minimamente invasiva e tem sido utilizada como um biomarcador para exposição de vários agentes genotóxicos e sua correlação com o risco de câncer tem sido estudada (GEUS et al., 2015).

A segurança do clareamento dental com uso da barreira gengival, em relação a uma possível carcinogenicidade, são focos de investigação (KLARIC et al., 2013; SILVEIRA et al., 2022) e os efeitos sobre os tecidos gengivais em diferentes grupos etários, ainda não foram estudados (ALMEIDA et al., 2015; REZENDE et al., 2016).

Biomarcadores de danos citogenéticos, como os MN, são bem caracterizados por um aumento constante de acordo com o avanço da idade (REZENDE et al., 2016), porém, dados referentes às NAs (cariólise (CL), cariorrexe (CR), picnose (PIC), células com cromatina condensada (CC), células binucleadas (BN) e células com botão nuclear ou broken-eggs (BN)) dos pacientes submetidos ao clareamento dental, entre as diferentes faixas etárias, são escassos (ALMEIDA et al., 2015; REZENDE et al., 2016). Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar o potencial genotóxico do clareamento dental de consultório em pacientes com diferentes faixas etárias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Potencial genotóxico em estudos sobre clareamento dental.

Goldberg, Grootveld, Lynch (2010) avaliaram o risco dos efeitos colaterais indesejáveis do clareamento dental relatados na literatura. Não houve relato quanto a sensibilidade alérgica para Peróxido de Carbamida (PC) ou HP. Efeitos citotóxicos agudos foram relatados em doses acima de 5 g / kg / dia para um produto contendo 10% de PC ou 0,3 a 1,8 mg / kg / dia de HP. Para um adulto de 70 kg sugere-se que a dose diária deve ser ≤ 10 mg de PC, ou 3,3 mg de HP equivalente. Na cavidade oral, sessões repetidas de HP 30% produzem hiperqueratose, hiperplasia e displasia com intensidade fraca após 22 semanas. A fragmentação do DNA também foi observada em culturas de linfócitos humanos e células epiteliais do trato respiratório (HP 10 μmol / L). O HP em alta concentração, usado em longo prazo, pode ocasionar danos à mucosa oral e promover efeitos genotóxicos e carcinogênicos. Em dentes não vitais

não foram observadas reações adversas, no entanto, reabsorções externas foram relatadas em uma série de pacientes dependendo do método clareador utilizado. Em um número limitado de casos, a hipersensibilidade (2,62-3,38%) e irritação gengival (0,23-0,85%) também foram relatadas. Quando um tratamento com PC 10% é conduzido, 15% a 65% dos pacientes exibem sensibilidade, variando também entre 2,62% e 3,38% entre outros autores dependendo do produto e da concentração. A sensibilidade é maior com HP combinado com o aprimoramento termo-catalítico podendo durar até 39 dias. O clareamento pode induzir mudanças na rugosidade da superfície dental e influenciar a formação de placa supra e subgengival, porém, não há uma ampla pesquisa quanto ao potencial desenvolvimento de cárie. O uso de moldeiras não adaptadas para o clareamento caseiro pode ocasionar irritação gengival e levar a queimaduras. A ingestão do gel clareador pode causar dor gástrica, embora a ingestão repetida de géis com peróxido não parece ter consequências graves. O PC, demonstrada em um estudo *in vitro*, favorece a liberação de mercúrio de amálgamas de prata e, *in vivo*, a reação é limitada pelo biofilme dental. O uso de agentes clareadores também pode modificar a rugosidade da superfície de compósitos à base de resina e cimentos de ionômero de vidro. Em doses mais baixas de peróxido, o tempo necessário para alcançar um efeito clareador é estendido, no entanto, os efeitos nocivos podem ser semelhantes. Todos os efeitos locais devem ser considerados e a decisão de administrar ou não, e o controle dos efeitos do clareamento devem estar nas mãos do dentista.

Klaric et al. (2013) investigaram o possível efeito genotóxico de dois produtos clareadores. O estudo foi realizado em 22 pacientes com faixa etária entre 18 e 25 anos. Os pacientes foram divididos aleatoriamente de forma igual em dois grupos, no grupo 1, o clareamento foi realizado com *ZOOM2* (HP 25% fotoativado) e no segundo grupo, com *Opalescence BOOST* (HP 38% quimicamente ativado). As amostras celulares foram coletadas de dois locais: tecido gengival e fundo de vestibulo do lábio superior, e cada amostra foi coletada três vezes: imediatamente antes, imediatamente após e 72 h após o clareamento. As células foram coradas com Solução Giemsa 5% por 10 minutos e analisadas por microscópio óptico com ampliação de 1000x em um total de 2000 células. O número total de MN determinados também foi contado como o número de células com um, dois e mais de três MN. O número total de MN foi registrado 72 h após o clareamento com *BOOST* em 1,93 vezes maior comparado

com a linha de base e 1,57 vezes maior comparado com o número de MN encontrado imediatamente após o processo de clareamento ($p < 0,001$). O número de células com um MN foi em média 1,45 vezes maior 72 h após o clareamento ($p = 0,012$) e 1,28 vezes maior imediatamente após o clareamento ($p = 0,036$). Além disso, levou a um aumento de 1,54 e 1,73 vezes no número de células com dois MN ($p = 0,007$) e com três MN ($p < 0,001$) em 72 h após clareamento e a um aumento de 1,84 e 1,44 vezes imediatamente após o clareamento ($p < 0,001$ e $p = 0,007$). O número de CL aumentou significativamente após o clareamento ($p = 0,005$) e foi 2,22 vezes maior 72 h após o clareamento ($p < 0,001$). As pontes nucleoplasmáticas e NB aumentaram imediatamente após o clareamento ($p = 0,008$ e $p = 0,007$) e 72 h após o clareamento ($p = 0,043$ e $p = 0,003$). As células BNs aumentaram 2,12 vezes mais 72 h após ($p < 0,001$) e foi 1,67 vezes maior que imediatamente após o clareamento ($p = 0,002$). O clareamento com *ZOOM2* provocou aumento de 1,42 vezes em MN foi 72 h após o processo de clareamento ($p = 0,016$). O gel *ZOOM2* também provocou aumento no número de MN que foi 1,45 vezes maior 72 h após o clareamento ($p = 0,007$) e imediatamente após o clareamento ($p = 0,013$). O número de CL aumentou significativamente 72 h após (1,80 vezes, $p = 0,018$) e imediatamente após o clareamento (1,68 vezes, $p < 0,001$). Células NB e BN aumentaram 72 h após o clareamento ($p = 0,016$ e $p = 0,033$). Os autores concluíram que ambas as preparações demonstraram potencial efeito genotóxico nas células da mucosa oral.

Almeida et al. (2015) avaliaram o efeito genotóxico *in vivo* de duas concentrações de PC (10% e 16%) no epitélio gengival de pacientes em uso do clareamento dental caseiro. Trinta e sete pacientes, sendo 30 mulheres e 7 homens, foram selecionados e instruídos a fazer o uso diário do gel durante 2h por um período de 3 semanas em ambos os arcos ao mesmo tempo. A idade média dos voluntários foi de $28,14 \pm 7,94$ anos para homens e $27,5 \pm 6,82$ anos para mulheres. As células gengivais foram coletadas de pré-molar a pré-molar, de ambas os arcos, em três tempos: imediatamente antes do tratamento (linha de base), 15 dias e 45 dias após o início do tratamento clareador. O corante utilizado foi o *Schiff Fast Green* e a presença de MN foi avaliada em 1000 células em um microscópio óptico com aumento de 400x. Quando houve dúvida na contagem das células, a ampliação foi aumentada para 1000x. Dezenove pacientes ocuparam o primeiro grupo (PC 10%) e 18 pacientes no segundo grupo (PC 16%). Os MN foram notados em ambos os grupos não havendo

diferença entre as taxas nos três períodos de tempo. O intervalo interquartil no acompanhamento de 15 dias foi maior para o PC 10%, enquanto aos 45 dias, o intervalo interquartil foi maior para o grupo de 16%. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o intervalo interquartil para os dois grupos ($p > 0,05$). A taxa média de MN foi ligeiramente maior entre os pacientes do grupo de concentração de 10% de PC. Quinze dias após o início do tratamento, houve aumento nas taxas de MN para ambos os grupos, enquanto a taxa média de MN foi igual para ambos os grupos no dia 15. Os testes *Kruskal-Wallis* não mostrou diferença entre os grupos em nenhum período de acompanhamento (linha de base, 15 dias e 45 dias) ($p = 0,90$). O uso não prolongado e não frequente do PC, isoladamente, não promove estresse mutagênico nas células epiteliais gengivais.

Existe uma correlação positiva entre uma maior frequência de MN e usuários de tabaco. Em um ensaio clínico simples-cego, controlado e não randomizado, Geus et al. (2015) avaliaram a eficácia e genotoxicidade do clareamento caseiro em fumantes e não fumantes. Sessenta pacientes com idade entre 18 e 40 anos e com incisivo central com tonalidade 1M2 ou mais escuro, foram selecionadas. Os pacientes foram divididos em dois grupos com 30 pacientes cada um: os que não fumavam (grupo de não fumantes) e fumantes de no mínimo 10 cigarros por dia (grupo dos fumantes). Foi utilizado o gel de PC 10% (*Whiteness Perfect*®, FGM) durante 3h por dia, por um período de três semanas. A avaliação de cor foi realizada com guia de cores (*Vita Bleachedguide 3D-Master*®) em diferentes momentos: no início do estudo, durante o tratamento (após a primeira, segunda e terceira semanas de clareamento), uma semana e um mês após o término do clareamento. A Escala Visual Analógica (VAS) foi utilizada para medir a sensibilidade dentária. A coleta das células epiteliais esfoliadas ocorreu antes e imediatamente após a terceira semana de clareamento caseiro e foram coradas com Solução de Giemsa. A contagem de células foi realizada a partir da frequência de MN por 1000 células em não fumantes, com ampliação 100x, e quando MN foram encontrados, a ampliação foi aumentada para 400x. Células mortas ou em degeneração (CL, CR, fragmentação nuclear) e NB não foram considerados na análise. O contraste de médias foi calculado a partir dos testes de *Tukey* ($\alpha = 0,05$). O risco absoluto e a intensidade de sensibilidade dentária de ambos os grupos foram comparados com os testes de X^2 e *Mann-Whitney* ($\alpha = 0,05$), respectivamente. Houve uma significativa mudança de aproximadamente 4,5 a 5,0 unidades de guia de cores

para ambos os grupos. Metade dos pacientes tiveram em sensibilidade dentária em algum momento, a intensidade da sensibilidade não foi significativamente diferente entre os grupos (*Mann-Whitney*: $p = 0,83$). A frequência de MN foi significativamente maior em fumantes do que em não fumantes, independentemente do procedimento de clareamento ($p < 0,001$). A eficácia do clareamento não parece ser afetada pelo hábito de fumar. O clareamento caseiro não provocou danos ao DNA do tecido gengival durante o clareamento.

Rezende et al. (2016) avaliaram a eficácia, sensibilidade dentária e genotoxicidade em células epiteliais com o uso de HP 35%. Trinta voluntários, com idade entre 18 e 33 anos e com incisivos centrais cor A1 ou mais escuro foram selecionados. A gengiva dos dentes a serem clareados foi isolada com resina polimerizada (*Top Dam*®, FGM) e o gel clareador utilizado foi o HP 35% (*Whiteness HP Maxx*®, FGM). Foram realizadas três aplicações de 15 min cada uma, com período total de 45 min, em duas sessões de clareamento com uma semana de intervalo. A sensibilidade dentária foi avaliada em até 24h usando a VAS. A avaliação da cor foi realizada antes do procedimento e um mês após o clareamento utilizando o *Vita Bleachedguide 3D-MASTER* (*Vita Zahnfabrik*®) e a avaliação objetiva de cor foi realizada com o espectrofotômetro *Vita Easyshade* (*Vita Zahnfabrik*®). O protocolo de coloração foi preparado imediatamente após a coleta de esfregaço e corado com Solução de Giemsa. O tamanho da amostra foi baseado na frequência de MN por 1000 células, com células esfoliadas da mucosa gengival e fundo de sulco do lábio superior no início do estudo e um mês após. A contagem de células foi realizada sob um microscópio óptico com aumento de 100x e, quando MN foram encontrados, o aumento aumentou para 400x. Células mortas ou em degeneração (CL, CR, fragmentação nuclear) e NB foram excluídos de avaliação. Os dados MN foram submetidos ao *Wilcoxon Signed Rank Test* com nível de confiança de 95%. Não houve diferença significativa na intensidade de sensibilidade dentária entre a primeira e segunda sessão de clareamento ($p > 0,05$). O risco absoluto geral de sensibilidade dentária foi de 93% (Intervalo de Confiança (IC) de 95%, 79% - 98%) e em relação ao clareamento foram observadas mudanças significativas ($p < 0,05$). A mudança da coloração dentro o *Bleachedguide 3D-MASTER* foi de $2,3 \pm 4$ e quanto a diferença geral entre antes e um mês após o clareamento, a mudança foi de $7,7 \pm 3,5$. A frequência de MN não aumentou após o clareamento com HP 35% em ambos os

tecidos ($p > 0,05$). O clareamento com HP 35% não induziu danos ao DNA, foi observado um clareamento eficaz e a maioria dos participantes relataram sensibilidade dentária.

Monteiro et al. (2019) avaliaram a genotoxicidade e eficácia do clareamento de HP 10% aplicado 30 min/dia, por 14 dias, em pacientes submetidos ao clareamento caseiro. Foi realizado um ensaio clínico randomizado, cego e paralelo e em pacientes jovens de boa saúde geral e bucal, com incisivos superiores iguais ou mais escuros que M1.5. A amostra foi de 60 pacientes divididos aleatoriamente em três grupos: moldeira de clareamento personalizada (*White Class*®, FGM), tiras de clareamento (*White Strips*®, Oral-b) ou moldeiras descartáveis pré-preenchidas (*Opalescence Go*®, *Ultradent*). A mudança de cor foi avaliada com o *Vita Bleachedguide* (*Vita Zahnfabrik*®) e a coleta para o esfregaço ocorreu em três fases: antes do tratamento (D0), imediatamente após a segunda semana de clareamento domiciliar (D14) e 30 dias após o tratamento (D30). O protocolo de coloração utilizado foi com a Solução de Giemsa e a leitura foi realizada com ampliação de 100x, quando os MN foram encontrados, a ampliação foi aumentada para 400x. Células mortas ou degeneradas (CL, CR, fragmentação nuclear) foram excluídos da avaliação. Oitenta por cento dos pacientes relataram sensibilidade dentária e 46% relataram irritação gengival, ambos leves e geralmente transitórios. A mudança de cor e o sistema de clareamento não foram significativas ($p = 0,53$ e $p = 0,42$ respectivamente). A diferença observada entre os intervalos de tempo foi a única a apresentar diferença estatisticamente significativa ($p = 0,001$). Após 30 dias, foi observado clareamento significativo para todos os grupos de aproximadamente 3-4 unidades no guia de cores. Em relação à frequência do MN, não houve potencial genotóxico em nenhum dos grupos estudados (*Kruskal-Wallis*: $p = 0,32$) independentemente do intervalo de tempo analisado (*Wilcoxon*: $p = 0,62$). Um clareamento significativo foi alcançado com HP 10% sem sinais de efeitos genotóxicos.

García et al. (2019) avaliaram o dano genético causado pela exposição às tiras de clareamento de HP 10%. O teste de MN foi realizado através da contagem de NAs em células epiteliais orais para detectar seu possível efeito genotóxico e citotóxico. O dano oxidativo foi avaliado através da quantificação de Derivado Oxidado da desoxiguanosina - *8-hydroxy-2' - deoxyguanosine* presente na saliva. Cento e treze pacientes foram selecionados e divididos em 2 grupos: grupo controle ($n = 53$)

composto por pacientes não expostos à tira clareadora, utilizada por 30 min, duas vezes por dia, durante 10 dias, com amostras coletadas no início e 30 dias depois; e grupo exposto (n = 60) composto por pacientes que realizaram o clareamento com tira de HP 10% (*Crest 3D Whitestrips premium plus*®), por 30 min, duas vezes ao dia, durante 10 dias, com amostras coletadas antes do clareamento, 15 e 30 dias após o término do tratamento. As amostras celulares foram coletadas em dois locais: mucosa bucal e gengiva inserida. A coloração utilizada foi com Laranja de Acridina e a contagem de NAs foi avaliada em 2000 células. No grupo controle, não houve aumentos estatisticamente significativos em NAs em qualquer momento de amostragem. No grupo exposto, o clareamento levou a um aumento de marcadores genotóxicos e citotóxicos observados nas células das mucosas bucal e gengival. Os marcadores genotóxicos (MN, BN, NB) e os marcadores citotóxicos (CL, CR, CC e PIC) aumentaram significativamente em 15 e 30 dias após o clareamento (MN: 15 dias após $p = 0,010$ e 30 dias após $p = 0,001$; BN, NB, CL e CR: 15 e 30 dias após $p = 0,001$; CC: 30 dias após $p = 0,05$; PIC: 15 dias após $p = 0,01$). Não houve diferenças entre os grupos quando comparados os valores basais de NAs em ambos os sítios de coleta ($p < 0,05$). Os níveis de Derivado oxidado da desoxiguanosina - *8-hydroxy-2' - deoxyguanosine* não mostraram aumento significativo no grupo controle em qualquer momento de amostragem. No grupo exposto, os níveis aumentaram significativamente, sendo 1,85 vezes mais altos 15 dias após o clareamento e 1,50 vezes mais 30 dias após o clareamento. Foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre o estresse oxidativo e MN ($p = 0,001$). Indivíduos expostos a tiras de clareamento de HP 10% demonstraram aumento de NAs em células epiteliais orais e aumento nos níveis de Derivado Oxidado da desoxiguanosina - *8-hydroxy-2' - deoxyguanosine* na saliva.

Existem evidências de que o peróxido de carbamida 10% e 16% não são genotóxicos para a mucosa oral, no entanto, os efeitos do gel a 22% ainda são pouco estudados. Bonacina et al. (2020) avaliaram os efeitos genotóxicos do PC 22% nas células da mucosa oral utilizando o teste de MN. Foi realizado um experimento clínico-laboratorial observacional entre março e novembro de 2019. Dezesesseis voluntários foram recrutados através de uma amostra por conveniência, sendo 7 homens e 9 mulheres, com idades entre 20 e 26 anos. Os valores basais calculados a partir das células coletadas antes do clareamento foram utilizados como controle para cada

voluntário. O clareamento caseiro foi realizado diariamente, duas horas por dia, durante 21 dias. A coleta das células esfoliadas ocorreu em quatro momentos diferentes: a primeira coleta foi realizada em dia 0 (D0 = basal/controle), antes do tratamento clareador; a segunda coleta ocorreu no dia 14 (D14), duas semanas após o início do tratamento clareador; a terceira coleta foi realizada no dia 21 (D21), último dia do clareamento dental; a quarta coleta ocorreu no dia 52 (D52), 31 dias após o término do clareamento dental. As células foram coletadas por raspagem da mucosa gengival marginal, em ambos os arcos superior e inferior, e de ambos os lados (direito e esquerdo), por uma espátula de madeira. As lâminas foram coradas durante 40 minutos em Giemsa 5% e foram avaliadas com aumento de 1000x em um total de 1000 células por paciente. Os dados foram analisados por meio do teste de *Kruskal Wallis* com nível de significância de 5%. Foi observado um aumento significativo das alterações nucleares ($p < 0,0001$) e do número de células binucleadas ($p = 0,0081$) entre o D0 e o D21. Quanto à frequência observada de micronúcleos, não houve diferença significativa entre os quatro momentos de coleta ($p = 0,08$). O clareamento caseiro realizado com PC a 22% pode causar efeitos temporários nas células da mucosa. No entanto, as alterações desaparecem um mês após o término do tratamento clareador. Logo, os autores demonstram que o protocolo de clareamento não tem efeito genotóxico permanente nas células orais.

Silveira et al. (2022) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de avaliar os potenciais efeitos cancerígenos relacionados ao PH, para clareamento dental, na mucosa oral. A revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes do PRISMA, em setembro 2020, e atualizada em abril de 2021. Apenas ensaios randomizados foram incluídos no estudo. Os estudos analisaram os resultados em células esfoliadas da mucosa oral com concentrações semelhantes de PH e foi avaliada a diferença média na contagem de MN por 1000 células na linha de base e 30 dias após o clareamento. A análise estatística foi calculada com média, desvios padrão e 95% de intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$). A heterogeneidade estatística foi avaliada por meio da estatística I^2 , onde um valor $> 50\%$ foi considerado indicador de heterogeneidade substancial entre os estudos. Os resultados também foram analisados qualitativamente. Treze artigos foram incluídos na revisão, entre eles, 5 eram estudos em animais e 8 eram estudos clínicos em humanos, dos quais 4 foram definidos como ensaios clínicos randomizados e 4 como quase-experimentais. Um

estudo apresentou alteração na proliferação de células epiteliais após exposição ao agente clareador, 3 estudos demonstraram que os agentes clareadores potencializaram o efeito de outros agentes cancerígenos e 1 estudo não detectou consequências da exposição ao clareamento. Quanto a genotoxicidade, 5 estudos concluíram que os agentes clareadores não causaram estresse mutagênico nas células da mucosa oral e apenas 2 apresentaram efeitos genotóxicos após o procedimento de clareamento. A metanálise mostrou uma heterogeneidade I^2 de 100%. A análise quantitativa dos 2 estudos incluídos demonstrou uma pontuação média semelhante para a frequência de MN na linha de base em comparação com 30 dias após o clareamento (diferença média: 0,48; IC 95%: -1,49 - 2,46; $p=0,63$). Os autores concluíram que o PH não parece ter um efeito potencialmente cancerígeno sobre os tecidos moles da cavidade oral.

Silva et al. (2022) analisaram a influência do tabagismo na genotoxicidade das células orais após o clareamento caseiro com PC 22%. Foi realizado um estudo de coorte prospectivo observacional com coleta de células gengivais para avaliação da frequência de MN e alterações nucleares. A frequência de MN por 1000 células foi utilizada como base para cálculo do tamanho da amostra. O tratamento ocorreu durante 14 dias, sendo realizado 1h por dia. O examinador calibrado utilizou uma máscara especial para evitar a detecção de odores típicos de cigarro. As coletas ocorreram nas margens gengivais superior e inferior, por meio de uma espátula de madeira, em 4 tempos: antes do clareamento (D0 - baseline), 1 dia (D1), 15 dias (D15) e 30 dias (D30) após o término do tratamento. O protocolo de coloração utilizado foi a solução de Giemsa 10% e os critérios utilizados para pontuação de micronúcleos e NA foram de acordo com Thomas et al. (2009). Para cada paciente, em cada coleta, 1000 células foram examinadas em um microscópio com aumento de 100x. A diferença de idade entre os grupos foi realizada pelo teste Qui-quadrado. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para analisar a distribuição dos dados. As contagens de MN e alterações celulares foram comparadas usando os testes de Kruskal-Wallis e Dunn. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a frequência de MN e alterações celulares entre os grupos dentro do mesmo tempo de avaliação ($\alpha = 0,05$). A amostra foi composta por 40 participantes (16 fumantes e 24 não fumantes). Não houve diferença significativa na idade entre fumantes e não fumantes (31,6 ($\pm 10,6$) e 23,3 ($\pm 5,9$), respectivamente). A maioria dos voluntários era do sexo feminino (9 fumantes

(56%) e 16 não fumantes (67%)). Os fumantes consumiam 7,6 cigarros por dia em média. A frequência de NA aumentou significativamente no D30 em comparação ao D0 ($p < 0,0001$) em ambos os grupos, e a frequência de MN permaneceu a mesma ($p > 0,05$). Dentro dos mesmos tempos de avaliação, não houve diferenças entre NA e MN entre fumantes e não fumantes ($p > 0,05$). O hábito de fumar associado ao PC 22% não apresentou potencial genotóxico (frequência de MN). No entanto, houve um aumento significativo, proporcional aos tempos de avaliação de NAs, para fumantes e não fumantes.

2.2 Estudo das Alterações Nucleares.

Devido à sua capacidade de detectar alterações cromossômicas em linfócitos periféricos humanos, o ensaio de MN com bloqueio da citocinese é o melhor método para monitoramento da exposição recente à agentes genotóxicos físicos e químicos além de ser também um marcador de risco de câncer e outras doenças crônicas. Bolognesi et al. (2015) objetivaram recuperar, revisar e analisar os estudos publicados sobre a aplicação do teste MN em células bucais com foco na aplicação clínica a fim de investigar sua utilidade para identificação de risco aumentado de desenvolver câncer oral e câncer de cabeça e pescoço. A revisão sistemática seguiu a metodologia descrita na declaração PRISMA com a pesquisa bibliográfica realizada até janeiro de 2015. Apenas estudos em inglês com o texto completo disponível foram considerados. A meta-análise foi aplicada em grupos homogêneos organizados com base nas doenças investigadas. Quarenta e dois estudos atenderam aos critérios de inclusão. Os aumentos relevantes no número de MN possuem intervalo de razão média entre 2,33 e 2,49. O câncer oral e câncer de cabeça e pescoço apresentaram aumento da frequência de MN (Razão Média entre 1,45 e 7,41) e todos os estudos sobre desordens potencialmente malignas mostraram aumento na frequência MN (Razão Média entre 1,42 e 7,36). Um aumento significativo também foi observado em 3 estudos sobre *Diabetes Mellitus* com um intervalo de razão entre 2,07 e 2,95. O aumento da frequência MN também foi relatado para pacientes com artrite reumatoide (Razão média = 4.35 (3.04-6.22)), amigdalite crônica (Razão Média = 3.35 (2.84-3.95)) e Doença de *Behçet* (Razão Média = 2.62 (1.38-5.00)). Frequências de MN semelhantes aos valores basais foram encontradas em pacientes com lúpus

eritematoso sistêmico (Razão média = 0,64 (0,36-1,15)), Doença de *Crohn* (Razão média = 1,00 (0,63-1,60)) e colite ulcerativa (Razão média = 0,85 (0,52-1,39)). Não houve aumento na frequência de MN em pacientes com Síndrome de *Gilbert* (Razão Média = 1,13 (0,61-2,08)) e um aumento não significativo foi encontrado em pacientes jovens com *Alzheimer* em comparação com controles pareados por idade e gênero (Razão Média em pacientes idosos = 0,73 (0,40-1,33) e pacientes jovens = 1,28 (0,78-2,09)). Pacientes com Síndrome de *Down* apresentaram um aumento na frequência de MN de 2 a 3 vezes em idosos e cerca de 8 vezes em jovens. A aplicação de estudos do citoma fornecem informações dos efeitos genotóxicos, citotóxicos e citostáticos. Mais estudos são necessários para identificar outros fatores de confusão para estabelecer uma faixa de "valores normais" para a frequência de MN e definir as condições quanto sua aplicabilidade clínica.

A exposição a derivados de petróleo que apresentam uma complexa mistura de compostos químicos, entre eles o benzeno, durante longos períodos de tempo, mostrou afetar os diferentes sistemas fisiológicos do corpo. Metgud et al. (2015) objetivaram explorar o dano citogenético em células bucais esfoliadas através do ensaio de MN em frentistas de postos de gasolina. Quatro postos de gasolina diferentes foram usados para o estudo e 80 indivíduos saudáveis, sem quaisquer doenças ou lesões orais, foram selecionados. Quarenta homens trabalhavam como atendentes na bomba de gasolina e outros 40 homens eram indivíduos saudáveis sem exposição ocupacional a agentes tóxicos (grupo controle). Os pacientes, em ambos os grupos exposto e controle, 20 eram fumantes e 20 não fumantes. As lâminas foram coradas com Feulgen e Giemsa e alterações como MN, BN, CR e CL foram avaliados em 1000 células por lâmina. Os dados foram analisados por Análise de Variância Unilateral (ANOVA) e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Quando intercomparados os valores médios para MN, BN, CR e CL, com a coloração de Feulgen, entre fumantes dos grupos de estudo e controle, bem como fumantes e não fumantes dos grupos estudo e controle revelaram resultados altamente significativos ($p = 0,00002$ e $0,0001$, respectivamente). A intercomparação dos valores médios entre não fumantes de ambos os grupos (estudo e controle) usando coloração de Feulgen e, entre fumantes de ambos os grupos (estudo e controle) usando Giemsa, também revelou resultados estatisticamente significativos ($p = 0,0034$ e $0,0004$, respectivamente). Os autores concluíram que os indivíduos

estudados fazem parte do grupo de risco e devem realizar monitoramentos periódicos e receber cuidados e orientações adequadas.

Cavalcante et al. (2017) determinaram alterações metanucleares em células da mucosa oral de crianças, associados ao ambiente escolar, gênero, exposição à fumaça de cigarro e tráfego de veículos. Duas escolas constituíram este estudo: Escola A, localizada em uma área comercial com tráfego intenso (1.628,6 veículos/h), e escola B, localizada em uma área residencial com baixo tráfego (194 veículos/h). A amostra foi de 43 crianças (24 crianças da escola A e 19 crianças da escola B) com idade entre 10 e 14 anos. Os voluntários foram divididos em relação à idade: de 10 anos a 12 anos e 6 meses e de 12 anos e 7 meses a 14 anos; com base no gênero (masculino e feminino); exposição à fumaça de cigarro em um ambiente residencial (fumantes passivos e não exposto) e ambiente escolar (escola A e B). As células foram coradas com Giemsa e duas lâminas foram preparadas para cada voluntário. Foram analisadas 500 células em cada lâmina (1000 células por indivíduo) em uma ampliação de 1000x. Os veículos foram classificados de acordo com o porte (pequeno, médio e grande) e o número de veículos foi analisado em três intervalos de tempo por dia: 6h30 às 7h30, 12h00 às 13h00 e 16h30 às 17h30. As células BNs de fumantes passivos foram superiores ao número de BN de crianças não expostas à fumaça do cigarro. As crianças fumantes passivas do sexo feminino mostraram maior número de CL e genotoxicidade (CL: $4,35 \pm 1,59$ e Genotoxicidade: $0,08 \pm 0,04$). Não foi observada diferença entre os grupos feminino e masculino de crianças que eram não expostas à fumaça do cigarro. Um número maior de CL e um maior índice de genotoxicidade e mutagenicidade foram observados em crianças do sexo feminino não expostas à fumaça do cigarro (CL: $3,36 \pm 2,37$ e Índice de Genotoxicidade: $0,06 \pm 0,03$). Na escola A, foi observado maior número de CR e BN quando comparado ao exposto alunos da escola B em crianças expostas à fumaça de cigarro. Um maior número de CL foi detectado no grupo feminino, porém, um maior índice de mutagenicidade foi observado no grupo masculino. Nenhuma diferença significativa foi observada na escola B. Houve uma correlação significativa entre frequência de células BNs e o tráfego de veículos da escola A (*Mann-Whitney*: $p= 0,05$). O número de veículos nas estradas próximas as escolas analisadas influenciam a quantidade de NAs e crianças do sexo feminino podem ser mais suscetíveis a genotóxicos e agentes mutagênicos.

A exposição à fumaça do cigarro causa vários distúrbios de células e tecidos. Tonina et al. (2017) avaliaram as NAs mais frequentes em células esfoliadas da mucosa oral de jovens fumantes. Foi realizado um estudo observacional analítico transversal constituído por estudantes fumantes (entre 10 e 20 cigarros por dia) e não fumantes. A técnica de Feulgen foi usada para coloração e 1000 células por indivíduo foram analisadas de acordo com a técnica de Tolbert et al. (1992). A frequência de MN e outras NAs, como CR, BN, CL, PIC e BE, foram analisadas com base nas considerações de Bolognesi et al. (2013). A análise ocorreu com ampliação de 1000x e os dados foram analisados usando o teste *T-Student* para um nível de confiança $p < 0,05$. A amostra foi composta por 49 alunos com faixa etária entre 18 a 25 anos e foi dividida em dois grupos: fumantes (18 homens e 6 mulheres no grupo de fumantes) e não fumantes (6 homens e 19 mulheres). Foi encontrado um maior número de NAs nas células totais de fumantes em comparação com células de não fumantes: CL (0,092% em fumantes e 0,009% em não fumantes), MN (0,074% em fumantes e 0,011% em não fumantes), CR (0,046% em fumantes e 0,0015% em não fumantes); PIC (0,028% em fumantes e 0,007% em não fumantes) e BE (0,028% em fumantes e 0,006% em não fumantes). Células BN e CC não obtiveram valores significativos ($p = 0,28$ e $p = 0,27$, respectivamente). Foram observadas NAs causadas pelos componentes encontrados na fumaça do cigarro. A necrose celular apresentou maior frequência e apoptose e efeitos genotóxico apareceram em menor grau.

Aslantürk e Çelik (2017) determinaram o risco genotóxico para cabeleireiros através da frequência de MN observadas nas células epiteliais da mucosa bucal. Foram selecionados 20 pacientes (10 cabeleireiros mulheres e 10 homens) para o grupo de estudo e outros 20 pacientes (10 mulheres e 10 homens) grupo controle. As células esfoliadas foram coradas primeiramente em Solução *May-Grünwald* por 3-5 min e, posteriormente com 10% de Giemsa por 10 min. A avaliação foi realizada em 1000 células por indivíduo com ampliação de 40x e outras NAs também foram registradas. A média de idade das mulheres cabelereiras foi menor em relação ao grupo controle feminino ($24,8 \pm 11,313$ e $30,27 \pm 0,707$ respectivamente) e a idade média dos cabeleireiros masculinos foi semelhante ao do grupo controle dos homens ($26,50 \pm 14,849$ e $28,40 \pm 2,121$ respectivamente). O tempo médio de trabalho para o grupo de cabeleireiros masculino foi maior do que o de cabeleireiros feminino ($12,60 \pm 17,677$ e $7,30 \pm 2,728$ respectivamente). Houve um aumento significativo na

frequência de MN observada em ambos os grupos de cabeleireiro em relação ao observado nos grupos controle ($p < 0,05$). A frequência de MN no grupo de cabeleireiros masculinos foi maior do que o encontrado no grupo de mulheres cabeleireiras. Os NB, em ambos os grupos de cabeleireiros, foram encontrados significativamente mais elevados do que os do grupo controle e não foram observados no grupo controle masculino. A média de células BN no grupo de cabeleireiros masculinos foi significativamente maior quando comparado com o grupo de cabeleireiros feminino e o grupo controle ($p < 0,05$). As células CL no grupo de cabeleireiros masculinos foram maior do que o encontrado em outros grupos ($p < 0,05$). Células PIC foram observadas em ambos os grupos (controle e cabeleireiros) e nos grupos de cabeleireiros (mulheres e homens) foram encontrados valores significativamente mais elevados do que no grupo de controle. A exposição à produtos químicos presentes em produtos para o cabelo provocou um aumento na frequência de MN e outros danos nas células epiteliais da mucosa bucal.

Ribeiro et al. (2017) realizaram uma revisão de literatura para relatar os resultados de genotoxicidade induzida por materiais odontológicos. O HP é um agente oxidante potente em células eucarióticas. O estudo realizado pelo autor demonstrou que 6 agentes clareadores foram genotóxicos *in vitro* e que dentífricos contendo produtos de clareamento também foram genotóxicos em células gengivais humanas *in vitro*. O dano oxidativo do DNA induzidas por HP são reparados por sistemas de reparo de DNA. Os monômeros e polímeros presentes em resinas são liberados na cavidade oral devido a abrasão mecânica e atividade química das enzimas salivares. Também, a polimerização incompleta deixa uma parcela livre de monômeros que ocasiona efeitos deletérios nos tecidos orais. Os resultados presentes na literatura mostraram que o *Bisfenol glicidil metacrilato* e *Trietilenoglicoldimetacrilato* induziram danos ao DNA. Os estudos sugerem que o estresse oxidativo induzidos por metil metacrilato pode induzir efeitos genotóxicos e mutagênicos, no entanto, novos estudos investigando o papel das espécies reativas de oxigênio, bem como a atividade antioxidante enzimática são necessárias para compreender os efeitos genotóxicos induzidos por esses polímeros. Os resultados para o uso de resinas compostas ou amálgama nas células da mucosa oral em humanos pelo teste de MN são divergentes quanto a evidência de genotoxicidade e não há relatos de aumentos significativo de dano ao DNA quando as células foram expostas aos primers dentários. Todos os

estudos *in vitro* publicados para materiais endodônticos mostraram algum grau de genotoxicidade como danos ao DNA, mutações e morte celular. A avaliação de 3 corantes usados para revelar placa dentária mostrou alterações cromossômicas induzido por fucsina básica, mas não por fucsina ácida e eritrosina B. O cloridrato de lidocaína, prilocaína e procaína foram negativos para alterações cromossômicas. A clorexidina é potente em causar danos genotóxicos em diversos tecidos e órgãos, como fígado, rim e células da mucosa oral *in vivo*. Nenhum dano genético foi detectado *in vitro* no uso de aço inoxidável e níquel-titânio na terapia ortodôntica. As ligas de cobalto-cromo e níquel-cromo mostraram dano genético em aparelhos de metal. O titânio com a superfície não tratada provocou danos ao DNA, contribuindo para a genotoxicidade. Os dados publicados mostraram evidências de genotoxicidade. Entretanto, são necessários mais estudos para promover a saúde bucal e prevenir a carcinogênese oral.

Os altos níveis de glicose podem aumentar o estresse oxidativo e a formação de radicais livres que danificam as células. Ojeda et al. (2018) compararam a frequência de MN e outras NAs na mucosa jugal e língua de pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 1 (tratado com insulina) e pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 (tratados com metformina, isoladamente ou em combinação) e indivíduos saudáveis. Foi realizado um estudo comparativo, transversal e analítico com 10 pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 1, 40 pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 e 40 indivíduos saudáveis etnicamente e geograficamente pareados de ambos os sexos, maiores de 18 anos e com histórico médico e odontológico completo. As células foram esfoliadas da mucosa jugal e da língua e coradas com *Fluoroshield* com 4', 6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI), e ao todo, 2000 células foram analisadas por lâmina. O grupo de *Diabetes Mellitus* tipo 1 recebeu tratamento apenas com insulina e *Diabetes Mellitus* tipo 2 estava tomando apenas metformina (17,5%) ou com glibenclamida (47,5%), mais captopril ou enalapril (35,0%). O tempo médio de início da doença foi semelhante para pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 1 e 2. O Índice de Massa Corporal por gênero mostrou diferença apenas no controle e mulheres com *Diabetes Mellitus* tipo 2 (Índice de Massa Corporal: 25,4 e 33,9 respectivamente). Pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2 apresentaram um Índice de Massa Corporal mais alto comparado com os controles, principalmente feminino. Não houve correlação entre gênero ou idade (Teste de *Pearson*: $p > 0,05$). A média e o intervalo de idades entre os grupos não

mostraram diferenças significativas. A frequência de MN nas células epiteliais da mucosa jugal foi maior em pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 1 (Frequência de MN: $0,75 \pm 0,31$, $p < 0,001$) e com *Diabetes Mellitus* tipo 2 (Frequência de MN: $0,52 \pm 0,27$, $p < 0,001$) quando comparados com controles saudáveis (Frequência de MN: $0,07 \pm 0,06$). Também houve aumento na frequência de MN na língua no *Diabetes Mellitus* tipo 1 (Frequência de MN: $0,81 \pm 0,22$, $p < 0,001$) e *Diabetes Mellitus* tipo 2 (Frequência de MN: $0,41 \pm 0,21$, $p < 0,001$) em comparação aos controles (Frequência de MN: $0,06 \pm 0,05$). A análise comparativa por gênero mostrou a mesma tendência para as NAs na mucosa jugal e língua e quando comparadas em relação ao tempo de início da doença, os MN, em pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2, mostraram um resultado positivo para ambos os lados da mucosa jugal ($p = 0,69$, $p < 0,001$) e língua ($p = 0,71$, $p < 0,001$). Um aumento semelhante de NAs foi observado em ambos os grupos. Os autores concluíram que o ensaio de MN melhoraria a qualidade da gestão para os pacientes com diabetes e suas complicações.

Bolognesi et al. (2021) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise para avaliar a aplicação do ensaio de MN como um teste preditivo e prognóstico para o risco de câncer. Duas pesquisas separadas foram realizadas, uma revisão para MN e câncer de cabeça e pescoço e outra para MN e câncer de mama. Dezenove artigos foram incluídos na revisão sistemática para MN e câncer de cabeça e pescoço. A frequência foi calculada com base em MN por 1000 células. O subgrupo com câncer oral incluiu 243 pacientes (casos) e 370 controles com a razão média variando entre 1,45 e 33,25 (Razão Média: 4,71 - 95% IC: 2,75-8,06) estatisticamente significativo ($p < 0,001$). O teste de *Egger* não foi significativo ($p = 0,457$). O subgrupo com câncer de cabeça e pescoço incluiu 204 pacientes (casos) e 163 controles e indicaram um aumento (Razão Média: 2,28 - IC 95%: 2,02-2,58) estatisticamente significativo ($p < 0,001$) e o teste de *Egger* não foi significativo ($p = 0,516$). A meta-análise foi realizada em 5 estudos sobre a aplicação do teste MN em linfócitos humanos periféricos e incluiu 160 pacientes para câncer oral e de cabeça e pescoço (casos) e 160 controles (Razão Média: 3,27 - IC 95%: 1,41-7,59), o teste de *Egger* também não foi significativo ($p = 0,498$). Vinte e um artigos foram incluídos na revisão sistemática para MN e câncer de mama. Com base em a 761 pacientes (casos) e 788 controles, a estimativa combinada de efeito aleatório aumentou significativamente em pacientes comparados aos controles (Razão Média: 1,90 - IC 95%: 1,44-2,49 e $p < 0,001$). Indivíduos

saudáveis com história familiar (224 pacientes e 203 controles) mostraram aumento na frequência de MN (Razão Média: 1,32 - IC - 95%: 0,85-2,04), mas não estatisticamente significativo ($p = 0,220$). Com base em 43 pacientes e 430 controles em pacientes com câncer de mama, não houve um aumento estatisticamente significativo da frequência MN (Razão Média: 1,27 - IC 95%: 0,82-1,96). Estudos em mutação para câncer de mama 1 e 2 com 101 pacientes (casos) e 412 controles não foram estatisticamente significativos (Razão Média: 1,30 - 95% IC: 0,79-2,13 e $p = 0,305$). Após o desafio ex-vivo com radiação ionizante, a meta-análise revelou um aumento significativo ($p < 0,001$) em MN apenas em pacientes com câncer de mama ($n = 614$) (Razão Média: 1,11 - 95% IC: 1,02-1,21). Uma alta heterogeneidade foi observada em todas as análises (71,4 - 99,9%). A meta-análise foi realizada em 183 pacientes e 165 controles (Razão Média: 3,89 - 95% IC: 1,54-9,78) e o teste de *Egger* não foi significativo ($p = 0,756$). A aplicação de um protocolo padronizado e com critérios validados para pontuação MN e outros biomarcadores é recomendada para reduzir a variabilidade encontrada.

Malacarne et al. (2021) realizaram uma revisão de literatura sobre o teste de MN, em células epiteliais orais, como um biomarcador genético em crianças expostas à poluição ambiental. A revisão seguiu a metodologia descrito nas diretrizes do PRISMA em estudos publicados até abril 2021. Os estudos classificados como elegíveis para inclusão na revisão, utilizaram o teste de MN em crianças de 0 a 19 anos expostos à poluição ambiental. Um total de 20 artigos atenderam aos critérios de inclusão, 12 relacionados a crianças expostas à poluição do ar, 4 sobre exposições à pesticidas, 2 sobre estilo de vida, 1 artigo sobre exposição ao arsênico e outro para uma base de estação móvel. A idade mínima encontrada nos artigos foi de 7 meses e a idade máxima foi de 16 anos. Todos os artigos descreveram o número de pacientes, porém, 3 não relataram dados quanto ao sexo. A publicação mais recente incluída foi de 2021 e a mais antiga foi de 2012. Dez artigos não utilizaram um grupo controle e apenas 9 estudos realizaram a avaliação da citotoxicidade, enquanto os demais não avaliaram os parâmetros de morte celular. Em relação ao corante, Feulgen, DAPI e brometo de etídio foram os mais utilizados, respectivamente. O número de células avaliadas por paciente variou entre 1000 e 4000 células. O número de participantes examinados, por pesquisa, variou entre 40 (menor amostra avaliada) e 1149 (maior amostra avaliada). Quatro trabalhos não encontraram diferenças significativas em

qualquer parâmetro de genotoxicidade, dois artigos não encontraram resultados positivos para a frequência de MN, porém, mostraram diferenças em outros parâmetros nucleares avaliados, quatorze trabalhos mostraram um aumento na frequência de MN. De acordo com os parâmetros do Projeto de Práticas Eficazes em Saúde Pública, 12 artigos tiveram pontuação moderada e forte, e 8 tiveram classificação fraca para risco de viés. Como resultado, a revisão demonstrou associação entre a frequência de MN e exposição à poluentes ambientais nas células esfoliadas orais de crianças.

Rehani et al. (2021) avaliaram a frequência de MN e outras NAs em atendentes de postos de gasolina, juntamente com efeitos adicionais do tabagismo. Participaram 60 indivíduos do sexo masculino, com faixa etária de 25 a 45 anos, e estes foram divididos em quatro grupos: Grupo 1 (exposto) - Trabalhador de bomba de gasolina fumante; Grupo 2 (exposto) - Trabalhador de bomba de gasolina não fumante; Grupo 3 (não exposto) - Fumantes não trabalhadores de postos de gasolina; Grupo 4 (não exposto) - Não trabalhadores e não fumantes. No grupo exposto, as amostras foram coletadas no final do turno de trabalho de 8h, no grupo não exposto, a coleta ocorreu durante a consulta de rotina, entre 10 e 12h. Dois esfregaços foram coletados e corados com coloração de papanicolaou. A avaliação ocorreu em um microscópio com magnificação de 40x em um total de 1000 células. Entre o grupo dos expostos (atendentes de postos de gasolina) (Grupos I e II) e o grupo não exposto (não trabalhadores de postos de gasolina) (Grupos III e IV), a análise obteve uma diferença estatisticamente maior na contagem de MN ($p = <0,0001$) e outras NAs ($p = 0,024$) em geral no primeiro grupo. Um resultado significativo foi evidente em MN ($p <0,0001$), CR ($p <0,0001$) e BC ($p = 0,008$), no entanto, CL ($p = 0,370$) e PIC ($p = 0,523$) não revelaram uma diferença estatística. Nos quatro grupos, em todos os parâmetros, os valores médios de MN ($7,27 \pm 2,187$), CL ($23,73 \pm 6,181$) e BN ($1,67 \pm 0,976$) foram os mais altos nos grupos expostos de fumantes (Grupo I). As frequências de CR ($17,87 \pm 4,642$) e PIC ($1,53 \pm 0,516$) foram maiores no grupo de fumantes expostos (Grupo II) e grupo de fumantes não expostos (Grupo III), respectivamente. Na comparação intragrupo, o grupo de fumantes não expostos (Grupo III) obteve uma contagem maior nos parâmetros total e individual quando comparado com um grupo de não fumantes não expostos (Grupo IV). Entre o grupo de fumantes expostos (Grupo I) e o fumantes não expostos (Grupo II), houve diferença

estatisticamente significativa nos parâmetros totais, no parâmetro individual, houve diferença na CL ($p = 0,096$) e BN (valor não apresentado). Na comparação intergrupos entre os fumantes expostos (Grupo I) e fumantes não expostos (Grupo III), não houve uma diferença significativa ($p > 0,05$). No entanto, a frequência de MN ($p = 0,002$), BN (valor não apresentado) e PIC ($p = 0,013$) tiveram diferença significativa. Entre os grupos exposto não fumante (Grupo II) e não exposto não fumante (Grupo IV), houve uma diferença nos parâmetros gerais e individuais, exceto na frequência de CL ($p = 0,096$) e BN (valor não apresentado). O estudo demonstrou que os frentistas do grupo exposto (atendentes de postos de gasolina) demonstraram maiores níveis de anomalias que no grupo não exposto.

2.3 Evolução do método para mensuração da instabilidade cromossômica.

Nersesyanyan et al. (2006) investigaram se, e em que medida, as diferentes técnicas de coloração afetam os resultados de estudos de MN em células esfoliadas. Trinta participantes foram incluídos na pesquisa (10 não fumantes e 20 fumantes) e 5 a 7 lâminas, de cada amostra, foram preparadas e coradas. A coloração Giemsa (10%) foi preparada em tampão de *Sorensen* (pH 6,8) no tempo de 20 min. Para *May-Grünwald*, a solução de *May-Grünwald* foi usada de 3 a 5 min e posteriormente com Giemsa (10%) por 10 min. O Laranja de Acridina foi dissolvida em água destilada (0,01%) e o tempo de coloração foi de 15 min. Para DAPI, a solução estoque foi diluída (1 mg / ml) com água destilada e corada por 30 min. Para Feulgen, as células foram colocadas em béqueres com ácido clorídrico 5,0 mol / L em temperatura ambiente (15 min), enxaguado com água destilada (15 min) e corado com reagente de *Schiff* por 90 min. O mínimo de 1500 células foi avaliado com cada procedimento de coloração. As frequências de NAs (CL, PIC, CR, BE e CC) foram corados com Feulgen. As colorações de Giemsa, *May-Grünwald-Giemsa* e Feulgen foram avaliadas em microscópio de luz e a Laranja de Acridina e DAPI foram avaliadas sob um microscópio de fluorescência. Todas as análises foram realizadas com aumento de 1000x com óleo de imersão. As frequências de MN marcados com Giemsa foram significativamente maiores (5 vezes) em fumantes do que em não fumantes. A coloração *May-Grünwald-Giemsa*, exibiu uma frequência de MN 4,5 vezes mais alta. Assim, nenhum efeito significativo foi observado com as manchas específicas de DNA.

Para Laranja de Acridina, as frequências de MN foram 90% maiores em fumantes e com DAPI e Feulgen, as diferenças foram de 30% e 120%, respectivamente. Nas lâminas coradas com Feulgen e avaliadas sob fluorescência foi observado um aumento de 89%. Idade, sexo e o consumo de álcool não alterou a frequência de MN com qualquer um dos métodos. Também não houve alteração na frequência de MN para coloração específica de DNA, no entanto, houve diferença entre fumantes e não fumantes com *May-Grünwald*. CR (146%), CL (350%), BN (117%) e CC (54%) foram maiores em fumantes do que em não fumantes e um número maior de PIC foram encontradas em fumantes. Gênero e consumo de álcool não apresentaram relação com a indução de NAs, mas uma correlação significativa foi observada com a idade ($p = 0,05$). Os autores constataram que as NAs e corpos de queratina podem ser interpretados como MN com colorações inespecíficas para o DNA e levar a resultados falso-positivo.

O projeto MN humano teve como foco inicial a análise de MN em linfócitos periféricos e busca padronizar as metodologias, definir taxas de frequência de linha de base do MN, caracterizar os efeitos de fatores demográficos e genéticos e determinar se as frequências MN em diferentes tecidos são preditivas de risco de câncer. Holland et al. (2008) buscaram fornecer uma visão geral do estado atual do ensaio MN em células bucais para que as variações de resultados que afetam a expressão de MN e outras NAs sejam identificadas além de comparar pontos fortes e limitações quanto a coleta, coloração e pontuação de células bucais. O ensaio de MN em células bucais esfoliadas foi usado para monitoramento de populações expostas a uma variedade de agentes mutagênicos e agentes cancerígenos químicos ou físicos. Um número variado de frequências foi relatado com valores entre 0,5 e 2,5 MN / 1000 células. Fatores metodológicos quanto a coleta, fixação, coloração, seleção e número de células contadas e os critérios de pontuação para MN e outras NAs causam variações quanto aos resultados. *Cytobrushes* possuem maior eficácia na coleta e o tempo estimado mínimo para o aparecimento de MN após a exposição a um evento genotóxico é de 7-21 dias. Os fixadores comumente usados são: 80% de metanol, etanol absoluto ou uma mistura de ácido acético glacial e a coloração *Feulgen-Fast Green* é indicada por sua especificidade para DNA. Os critérios básicos para contagem de MN desenvolvidos por Tolbert et al. (1992) são as mais utilizadas em um número mínimo de 1000 células. O ensaio MN em linfócitos de bloqueio de

citocinese mostrou que uma abordagem baseada na pontuação, não apenas de MN, mas também outros marcadores de danos do genoma, como as células mortas ou degeneradas. Variáveis como idade, sexo, genótipo, estação, dieta, higiene e saúde bucal, estilo de vida, fumo, álcool e outras drogas recreativas devem ser identificadas e controladas. É bem estabelecido que as alterações cromossômicas em linfócitos humanos predizem risco de câncer, porém, ainda é desconhecido se uma frequência elevada de MN é preditiva do risco de câncer e se a relação é específica do local ou se estende ao risco geral de câncer. Diferentes fatores de confusão influenciam a frequência de MN, dessa forma, é necessária uma padronização do protocolo MN e dos critérios de pontuação para uma consolidação do uso para biomonitoramento de danos ao DNA.

Thomas et al. (2009) descrevem os métodos estabelecidos para coleta, preparação da lâmina, coloração celular e nuclear e critérios de pontuação. A migração celular da camada basal à camada de superfície queratinizada varia em um período de 7 a 21 dias. Os corantes específicos de DNA, como Laranja de Acridina, Feulgen ou DAPI são recomendados visto que as colorações de *Romanowsky*, Giemsa, ou *Leishmann* podem gerar resultados falsos positivos. Os critérios de pontuação tiveram como base os descritos por Tolbert et al. (1992). As células basais possuem núcleo uniformemente corado, oval e são menores. Células diferenciadas possuem um núcleo uniforme, de forma oval ou redonda, são maiores que as células basais e a razão núcleo-citoplasma é menor. As células com MN são caracterizadas pela presença de um núcleo principal e um ou mais núcleos menores com diâmetro entre $1/3$ e $1/16$ do núcleo principal. Possuem a mesma intensidade de coloração e textura do núcleo principal. A frequências base para células varia de 0,5 - 2,5MN / 1000 células. Células PIC, CC e CR não são pontuados para MN. Células com NB contêm núcleos com uma extremidade com constrição acentuada que sugere um processo de brotamento, os núcleos parecem estar ligados um ao outro e seu diâmetro pode variar de $1/2$ a $1/4$ do núcleo principal. As células BNs contêm dois núcleos principais que geralmente estão muito próximos e podem se tocar. Células CC possuem um padrão nuclear estriado em que a cromatina agregada é intensamente corada. As células CR possuem núcleos com agregação de cromatina mais extensa e um padrão nuclear densamente pontilhado. As células PIC possuem um encolhimento nuclear com uma alta densidade de material mais intensamente

corado, com diâmetro entre 1/3 e 2/3 das células diferenciadas normais. As células CL tem o núcleo completamente esgotado de DNA aparentando uma imagem “fantasma”. CC, CR, PIC e CL indicam estágios de morte celular. As lâminas são melhores examinadas em 1000x com campo claro e / ou microscópio de fluorescência. A análise ideal é primeiro determinar a frequência de todos tipos de células em um mínimo de 1000 células e, em seguida, a frequência de outros biomarcadores de danos ao DNA em um mínimo de 2000 células. Os resultados dependem do nível de exposição, da potência de agentes genotóxicos ou citotóxicos, genética, idade e sexo. O ensaio ainda não foi aprovado para uso diagnóstico sendo aplicado apenas para pesquisa.

O *HUMAN MicroNucleus project on exfoliated buccal cells* (HUMNXL) foi projetado para avaliar o impacto dos fatores de risco, ocupação, estilo de vida e estado da doença e estabelecer um protocolo de execução, além de fornecer valores de referência para todas NAs avaliadas no ensaio do citoma. Bonassi et al. (2011) objetivaram determinar as frequências espontâneas de MN na mucosa bucal de indivíduos saudáveis e não expostos às genotoxinas ambientais. O banco de dados HUMNXL contém 5424 participantes e 30 laboratórios foram incluídos de estudos realizados entre 1989 e 2009. Além da frequência de MN, o estudo avaliou PIC, CR, BN e NB, as frequências foram avaliadas em 1000 células e o modelo de efeitos aleatórios foi adotado para investigar preditores de MN. O *Feulgen-Fast Green* foi definido como padrão pelo HUMNXL como o método de coloração mais específico e versátil. A frequência espontânea de MN em indivíduos não expostos foi de 0,74% (IC 95% 0,52-1,05), no entanto, um intervalo entre 0,3 e 1,7% é aceito. Não houve diferença na frequência em relação ao sexo dos participantes, mas a idade é marcada e caracterizada por um aumento constante com o avanço ($p < 0,001$). As exposições ocupacionais avaliadas foram associadas a aumentos significativos de MN em relação ao grupo controle. Houve uma maior frequência MN para câncer de orofaringe (Frequência média = 1,72; IC 95% 1,19-2,49), cânceres do sistema respiratório (Frequência média = 1,40; IC 95% 1,06-1,86) e outros cânceres agrupados (Frequência média = 1,94; IC 95% 1,46-2,59). Não houve aumento significativo em associação com o grupo de doenças neurodegenerativas (*Parkinson* e *Doença de Alzheimer*) (Frequência média = 1,29; IC 95% 0,73-2,26). Indivíduos que fumaram mais de 40 cigarros por dia tiveram um aumento significativo no MN em relação aos

não fumantes (Frequência média = 1,37; IC 95% 1,03-1,82). O consumo de frutas *versus* aqueles que nunca comem frutas teve uma redução de 32% frequência de MN (Frequência média = 0,68, IC de 95% 0,50-0,91). A heterogeneidade dos métodos usados para coleta, coloração e pontuação foi a fonte mais importante de variabilidade (38%). O projeto HUMNXL abordou técnicas de estudos para fornecer valores de referência para validação da base de ensino e contribuiu para a criação de uma rede de laboratórios para permitir a avaliação do risco de doença associado à frequência de MN.

O ensaio do citoma do MN bucal é um teste citogenético minimamente invasivo que mede o dano genético, a proliferação celular, diferenciação e morte celular em células bucais esfoliadas. Bolognesi et al. (2013) descreveram um conjunto de critérios para marcar todos os biomarcadores no ensaio de MN juntamente com fotomicrografias para aplicação do método. Estudos que a coloração com Giemsa ou Aceto-Orceína foram utilizados e frequências mais altas de MN foram observadas, confirmando a baixa especificidade que pode levar a resultados falsos positivos quando comparados com colorações que são específicas de DNA, como o Feulgen. O método de coloração nuclear Feulgen juntamente com *Fast Green* para a coloração do citoplasma é usada como método padrão. Uma deficiência apresentada para esse método de coloração é que este não é permanente, prejudicando a reclassificação dos slides. As lâminas são melhor examinadas com uma ampliação de 1000x usando uma boa qualidade de campo e microscópio. Para a pontuação das lâminas, como uma primeira etapa, a frequência de vários tipos de células (normais e anormais) é avaliada em 1000 células, na segunda etapa, os biomarcadores de danos ao DNA são pontuados em um mínimo de 2000 em células. As células basais, transitórias e diferenciadas mostram NAs associadas a diferentes processos, incluindo biomarcadores de danos ao DNA (MN e NB); morte celular (CC, CR, PIC e CL); defeitos citocinéticos (BN) e atividade proliferativa (frequência de células basais). Células NB e BE também foram incluídos e para fins de pontuação, NB e BE foram classificados juntos em uma única categoria de NB. Células com CC, CR e PIC não são pontuadas para a presença de MN a fim de evitar confusão com corpos apoptóticos. A frequência de linha de base para MN em indivíduos saudáveis não expostos a agentes genotóxicos é de 0,30 - 1,70 por 1000 células. A detalhada descrição dos critérios de pontuação e as fotomicrografias fornecidas são

complementos essenciais para o Protocolo do Ensaio do Citoma do MN Bucal de 2009 para padronizar a aplicação do ensaio de MN no biomonitoramento humano e promover melhorias de capacidade técnica.

Sommer; Buraczewska; Kruszewski (2020) apresentaram várias aplicações dos testes de MN e discutiram os desafios técnicos e as direções futuras. Os testes de genotoxicidade permitem uma avaliação do impacto de fatores físicos e químicos que afetam a estabilidade do genoma. Os testes *in vivo* incluem 3 métodos citogenéticos: ensaio cometa, ensaio de NAs e diferentes tipos de ensaio de MN, incluindo ensaio de MN de bloqueio de citocinese, ensaio de MN eritrocitário e ensaio do citoma do MN bucal. A estimativa da extensão da exposição do dano é possível conhecendo a frequência de alterações no material genético. O MN é ocasionado por dano ao DNA ou instabilidade genômica, no entanto todos os tipos de ensaios baseados na análise da frequência de MN variam em termos de células e protocolos usados. Diferentes tipos de ensaios de MN foram apresentados. O ensaio de MN de bloqueio de citocinese é o ensaio mais comum em MN, onde a citocalasina B, que inibe os filamentos de actina, polimerização e formação de microfilamentos contráteis, são usados para interromper a citocinese. Porém, a citocalasina B não interrompe a cariocinese e as células BN são formadas com MN presentes em seu citoplasma, este ensaio também pode ser estendido para outros biomarcadores. O ensaio de MN eritrocitário é um método invasivo para avaliar a frequência de MN em eritrócitos imaturos na medula, no entanto apenas uma pequena porcentagem apresenta MN devido a seleção esplênica. O ensaio de citoma do MN bucal foi usado durante 40 anos e parece ser vantajoso para estudar os fatores genotóxicos tornando-se um teste citogenético padrão. Fatores como idade, sexo e o tabagismo podem alterar o nível de controle de MN geralmente baixos (1,1 / 1000 células - IC 95% 0,70-1,72). Para reduzir a variabilidade da média, recomenda-se pontuar 4000 células. A automação da análise de MN aumenta a certeza estatística gerando resultados semelhantes em um menor tempo. A automação da citometria de fluxo tornou viável o exame de hemácias e é possível considerar os danos encontrados em sangue humano, como um índice de dano na medula óssea. A cromotripsia é a quebra do DNA seguido por rearranjos e processos de reparo e foi apresentada como resultado de uma direção futura sobre o MN como representação passiva do material genético. Mais tentativas serão realizadas para determinar a relação entre a formação de MN e o

desenvolvimento do câncer em novas direções previstas para o desenvolvimento de ensaios de MN.

Em uma recente revisão de literatura, Fenech (2020) estudou a expressão de anormalidades cromossômicas. O autor verificou que a expressão de anormalidades cromossômicas, como o MN, requer a conclusão da divisão nuclear, portanto, a variação da proporção de células que completam a divisão nuclear e são capazes de expressar o MN tornam os resultados não confiáveis. As células que completaram a divisão nuclear são acumuladas e identificadas por sua aparência binucleada após inibir a formação do anel de microfilamento de actina necessário para a citocinese. Outras vantagens do método de bloqueio de citocinese seriam a medição eficiente da formação de pontes nucleoplasmáticas, a formação de NB (outro indicador de instabilidade), a capacidade de pontuar MN, pontes nucleoplasmáticas e NB nas mesmas células e atestar sua correlação, as razões de células mononucleadas, e células multi-nucleadas para avaliar a proliferação celular e citostase e células necróticas e apoptóticas para avaliação toxicológica. O uso de sondas de telômero e centrômero foi possível determinar a origem de MN e NB induzidos por deficiência de folato. O MN foi derivado principalmente de cromossomos atrasados (22,0%) e fragmentos acêntricos terminais (62,2%), e a maioria dos NB origina-se principalmente de fragmentos intersticiais (42,7%) ou fragmentos acêntricos terminais (43,5%). Outras NAs podem ser observadas em células com instabilidade cromossômica, mas estas têm ainda não foram devidamente validadas. O aprisionamento de cromossomos em MN pode resultar em condensação prematura do cromossomo e sua fragmentação. Uma das razões para o atraso na replicação do DNA em MN pode ser devido ao estresse de replicação do DNA. O vazamento de DNA para o citoplasma, devido a ruptura da membrana, fornece acesso para DNAases citoplasmáticas ataquem o DNA em MN. O aumento da expressão de interferon e ativação de genes pró-inflamatórios se não for resolvida, pode aumentar o estresse oxidativo e agravar a instabilidade cromossômica. As consequências do aprisionamento de cromossomos dentro do MN são cromotripsia e cromoanagênese. A consequência adicional da formação de MN é a estimulação do sistema imunológico inato por meio da Via de detecção de DNA citosólico.

3 OBJETIVOS:

3.1 Geral:

Avaliar o potencial genotóxico e citotóxico do clareamento dental de consultório em pacientes com diferentes faixas etárias.

3.2 Específicos:

- Avaliar a diferença da frequência de MN entre as diferentes faixas etárias.
- Avaliar a frequência de NAs (CL, CR, PIC, CC, BN e BN) na gengiva de pacientes jovens e adultos submetidos ao clareamento dentário de consultório.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

A pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM – número do protocolo: CAAE: 63049722.7.0000.5020 (Anexo 1). O recrutamento dos participantes da pesquisa foi realizado por meio de anúncios publicitários locais (site da Universidade e redes sociais). Os voluntários maiores de 18 anos foram convidados a participar do estudo, e receberam informações referentes à metodologia do trabalho por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), com os objetivos e justificativas para a realização do mesmo, os benefícios e riscos aos quais poderão estar expostos e os demais itens previstos nas Diretrizes do Conselho Nacional de Saúde - CONEP/MS (Resolução 466/2012), e aqueles que concordaram, assinaram o TCLE (Apêndice A). Para os voluntários menores de idade, os responsáveis foram informados conforme descrição acima, e convidados a assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) autorizando a participação dos adolescentes (Apêndice B), enquanto os voluntários foram convidados a assinarem o Termo de Assentimento (Apêndice C). Foi garantido ao voluntário o direito de recusar

ou abandonar o estudo a qualquer momento, sem nenhum prejuízo, sendo também informado sobre as formas de contato com os pesquisadores envolvidos e com o CEP - UFAM. O presente estudo foi submetido ao CEP - UFAM para efetivação de responsabilidade perante os órgãos competentes.

Para coleta de dados, as medidas de segurança foram adotadas para proteção da equipe de pesquisa, a saber: lavagem das mãos ou uso de álcool em gel 70% antecedendo o manuseio dos arquivos, uso de máscara, manutenção do ambiente arejado e com distanciamento entre os pesquisadores, conforme recomendações da instituição.

4.2 Desenho do Estudo

Trata-se de um ensaio clínico controlado, cego, no qual o avaliador desconhecia a atribuição do grupo. O estudo foi estruturado com base nas normas do CONSORT (*Consolidated Standards of Reporting Trials*).

4.3 Critérios de elegibilidade

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a adolescência como o período entre 10 e 19 anos, uma fase do desenvolvimento caracterizada por uma série de mudanças, físicas, mentais e sociais que culminarão com as características próprias de um adulto. Por sua vez, o Estatuto da Criança e do Adolescente (Lei n. 8.069/1990), em seu artigo 2º, a adolescência é a faixa etária entre 12 a 18 anos de idade. Utilizamos a faixa etária mais jovem (grupo 1) com intervalo de 14 - 19 anos (BONASSI et al., 2011).

A OMS também classifica indivíduos adultos como aqueles com faixa etária entre 20 - 59 anos. Para compor o grupo 2, e se obter dois grupos com faixas etárias distantes para comparação da frequência de MN, utilizamos indivíduos de 30 - 39 anos (BONASSI et al., 2011).

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos, com idade entre 14 e 19 anos e 30 e 39 anos, sem doenças sistêmicas (metabólicas, imunológicas e cardiopatias), com condição bucal livre de lesões cáries ou doenças periodontais, que apresentaram pelo menos um incisivo central ou canino com cor A2 ou mais escura e

os seis dentes anterior superiores livres de restaurações na face vestibular, esmalte hígido, insatisfação com a cor de seus dentes e sem alterações patológicas, fisiológicas e medicamentosas.

Foram excluídos do estudo pacientes com hipersensibilidade dentinária, tabagista (qualquer quantidade de cigarros/ dia ou semana), etilista (com nível de consumo alcoólico moderado: 16–32 g/dia para homens e 12–24 g para mulheres ou 84–168 g/semana para homens e 56–112 g para mulheres (GELL; MEIER; GOYDER., 2015)), grávida ou lactante, com aparelho ortodôntico, apinhamento severo e presença de manchas intrínsecas.

4.4 Desfecho primário

Genotoxicidade pelo teste de MN.

4.5 Desfecho secundário

Frequência de NAs (CL, CR, PIC, CC, BN e NB ou BE).

4.6 Cálculo do tamanho da amostra

O cálculo para determinar o tamanho da amostra do estudo foi baseado na frequência de MN por 2000 células com base em um estudo da literatura (GARCÍA et al., 2019). Observou-se que a frequência normal de MN na mucosa oral é entre 0,5 e 2,0 / 1000 células (HOLLAND et al., 2006; REZENDE et al., 2016; THOMAS et al., 2009). Para que o procedimento clareador fosse considerado seguro, espera-se não encontrar uma diferença média superior a um. A média de MN em jovens (10 - 19 anos) é 1,7. Para adultos (30 - 39 anos), a média de MN é de 2,13. A diferença entre grupos é de 40% (BONASSI et al., 2011). Desta forma, foi necessário um tamanho amostral mínimo de 32 participantes para um estudo com poder de 80% e alfa de 5%. O tamanho da amostra foi calculado utilizando o *website* www.sealedenvelope.com.

4.7 Métodos de alocação dos grupos experimentais

Os voluntários incluídos na pesquisa foram divididos em dois grupos: Grupo 1 – pacientes com idades entre 14 e 19 anos e Grupo 2 – pacientes com idades entre 30 e 39 anos.

Os pacientes foram submetidos a duas sessões de clareamento de consultório, com aplicação realizada por um primeiro membro da equipe de pesquisa, com intervalo de 1 semana entre as sessões, com aplicação do gel de HP 35% (*Total Blanc Office 35%*®, NOVA DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por um período de 45 min, na arcada superior do elemento 15 ao elemento 25. O tecido gengival dos dentes clareados foi isolado usando barreira de proteção gengival fotopolimerizável (*Total Blanc Office*®, NOVA DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A barreira gengival foi aplicada recobrando a margem gengival e estendendo-se 0,5 mm além desta. A mesma foi fotopolimerizada durante 40 segundos, a cada dois dentes, permanecendo em contato com a mucosa gengival, também, durante 45 min. O procedimento de clareamento dental foi realizado por um único operador não envolvido na análise de genotoxicidade

4.8 Coleta e fixação do esfregaço

A técnica de citologia esfoliativa (Figura 1) foi realizada por um segundo integrante da equipe de pesquisa, em três tempos (T): primeiramente antes do procedimento de clareamento (T0), 7 dias após o término da segunda sessão do clareamento (T14) e 30 dias após o final do tratamento (T30). A coleta foi realizada duas vezes, de canino a canino, na arcada dentária superior, com uma escova citológica friccionada firmemente e com pouca pressão para não causar lesões ao tecido gengival. A cada coleta, foi realizada a troca da escova citológica. Os procedimentos de coleta, coloração e avaliação de MN foram realizados conforme descrito por Monteiro et al. (2019) (Quadro 1 e Figura 2).

Figura 1: Coleta do esfregaço na gengiva.



Fonte: COELHO, (20204).

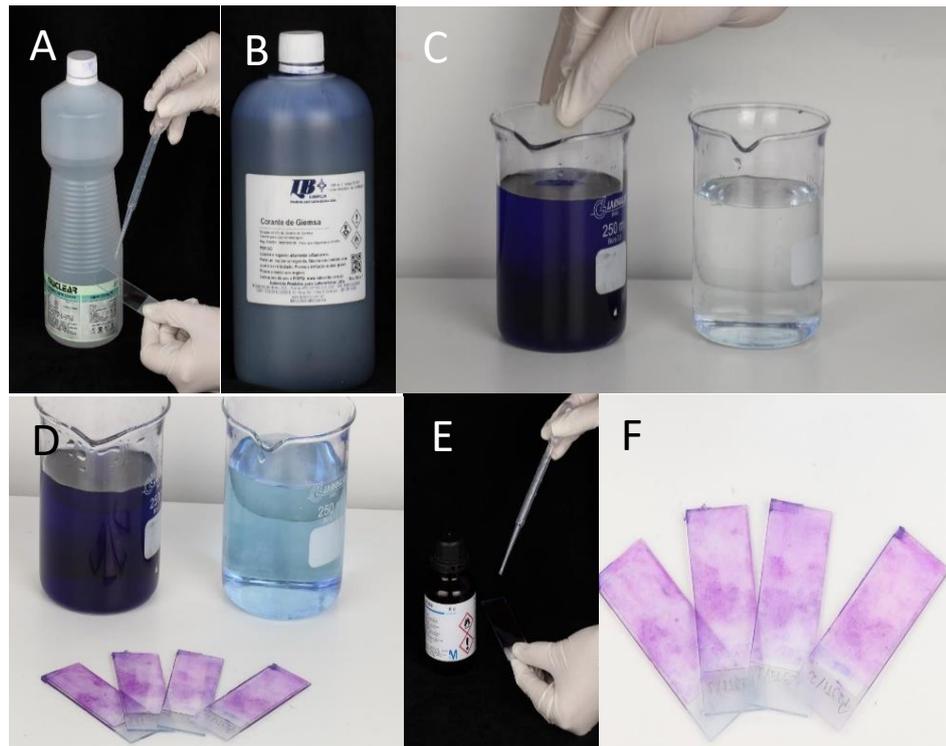
Quadro 1: Protocolo de coloração das lâminas.

SEQUÊNCIA	AÇÃO	PROCEDIMENTO
1	Coleta do esfregaço	Realizada no tecido com escova citológica e distribuída sobre a lâmina.
2	Secagem	Realizada com seringa tríplice por 1 min. A uma distância de 30 cm.
3	Fixação	Com Metanol 80% por 1min.
4	Secagem	Realizada com seringa tríplice por 1 min. A uma distância de 30 cm.
5	Coloração	Cinco a seis gotas de solução de Giemsa em estoque (7,6 g/L; Glicerol: 500 ml/L; Metanol: 500 ml/L; <i>Newprov</i> ®), por 2 min.

6	Lavagem	Recipiente 1 = 3 mergulhos, recipiente 2 = 2 mergulhos.
7	Secagem	Realizada com seringa tríplice por 1 min. A uma distância de 30 cm.
8	Montagem da lâminula	3 gotas de adesivo Entellan aplicadas sobre o esfregaço visivelmente seco.

Fonte: MONTEIRO et al. (2019).

Figura 2: A – Fixação com metanol, B – Coloração de Giemsa, C, D – Lavagem das lâminas, E – Aplicação do adesivo Entellan, F – Lâminas prontas para a leitura.



Fonte: COÊLHO, (2024).

4.9 Avaliação das lâminas/contagem dos micronúcleos e outras alterações nucleares

Um examinador treinado e calibrado (Kappa intraexaminador = 0,97) realizou a avaliação das lâminas.

O avaliador foi calibrado de acordo com os critérios de classificação de TOLBERT et al. (1992). Foi realizada através do método *in lux*, realizado com 20 imagens contendo MN e outras NAs coradas com Giemsa, no intervalo de uma semana entre as avaliações. Foi calculado o coeficiente Kappa com a concordância de 0,80 ou superior (LANDIS; KOCH, 1977).

A contagem das células foi realizada sob um microscópio óptico *Coleman®*, com 100x de magnificação e quando os MN ou outras NAs foram encontrados, a magnificação foi aumentada para 400x. Foram preparadas duas lâminas para cada paciente, para cada período de tempo (T0, T14 e T30) e em cada lâmina foram contadas 2000 células.

Os critérios para inclusão na contagem total de células foram os seguintes (TOLBERT et al., 1992) (Figura 3):

1. Citoplasma intacto e que se encontre relativamente plano;
2. Pouca ou nenhuma sobreposição com as células adjacentes;
3. Pouco ou nenhum detrito/sujeira;
4. Núcleo normal e intacto, com perímetro nuclear normal e distinto.

Os parâmetros para identificação de MN foram os seguintes (TOLBERT et al., 1992) (Figura 3):

1. Arredondado com perímetro liso sugestivo de uma membrana
2. Menos de um terço do diâmetro do núcleo associado, mas suficientemente grande para discernir forma e cor;
3. Intensidade de coloração semelhante ao núcleo;
4. Textura similar ao núcleo;
5. Mesmo plano focal do núcleo;
6. Não ter pontes com o núcleo principal.

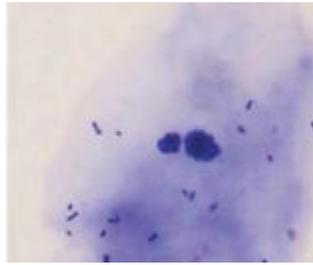


Figura 3: Célula diferenciada com presença de MN evidenciada pelo corante Giemsa (Magnificação: 1000x). Fonte: Bonacina et al. (2020).

A presença e quantidade de CL, CR, PIC, BN, e de células com CC e NB ou BE foram avaliadas (METGUD et al., 2015; TONINA et al., 2017; THOMAS et al., 2009; Bonacina et al., 2020), empregando o mesmo padrão microscópico utilizado para avaliar a presença de MN (Quadro 2).

Quadro 2: Descrição das alterações celulares avaliadas na pesquisa.

Alteração Nuclear	Descrição
Micronúcleos (MN)	<ul style="list-style-type: none"> • Presença de 01 núcleo principal e 01 ou mais pequenas estruturas centrais nucleares; • Redondos ou ovais; • Diâmetro pode variar entre 1/3 e 1/16 do núcleo principal, com a mesma intensidade de coloração e textura; • Frequências normal: 0.5 – 2.5 MN/1000 células; • São raros em indivíduos saudáveis, mas tornam-se mais comuns em indivíduos expostos a radiação ou outros agentes genotóxicos; • O MN deve estar localizado dentro do citoplasma das células e sua presença é indicativo de perda de cromossomo ou fragmentação.
Células com botões nucleares (NB)	<ul style="list-style-type: none"> • Contém núcleos com uma aparente constrição acentuada em uma extremidade do núcleo

	<p>sugestivo de um processo de brotamento;</p> <ul style="list-style-type: none"> • O NB e o núcleo estão geralmente muito próximos, e parecem ser anexados uns aos outros; • Tem a mesma morfologia e propriedades de coloração; • Seu diâmetro pode variar de 1/2 a 1/4 do núcleo principal.
Células binucleares (BN)	<ul style="list-style-type: none"> • Contém dois núcleos principais; • Podem ser muito próximos um do outro a ponto de se tocarem; • Apresentam geralmente a morfologia de um núcleo de células normais; • Parecem indicar falha da citocinese após a última divisão nuclear na camada de células basais.
Células bucais com cromatina condensada (CC)	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão nuclear estriado em que a cromatina agregada é intensamente manchada; • Nestas células, é evidente que a cromatina está agregando em algumas regiões do núcleo ao ser perdidos em outras áreas; • Quando a agregação de cromatina é extensa, o núcleo pode parecer fragmentado; • Estas células podem ser submetidas aos estágios iniciais de apoptose, embora isso não tenha sido mostrado conclusivamente.
Cariorrexes (CR)	<ul style="list-style-type: none"> • Os núcleos são caracterizados por uma maior extensão da agregação de cromatina nuclear em relação às células CC; • Eles têm um padrão nuclear densamente salpicado indicativo de fragmentação nuclear que conduz à eventual desintegração do núcleo; • Essas células podem estar passando por um estágio tardio de apoptose.

Picnose (PIC)	<ul style="list-style-type: none"> • São caracterizadas por um pequeno e encolhido núcleo com uma alta densidade de material nuclear uniformemente e intensamente corado; • O diâmetro nuclear é geralmente 1/3 a 2/3 de um núcleo em células normais diferenciadas; • Podem representar uma alternativa para o mecanismo de desintegração nuclear.
Cariólise (CL)	<ul style="list-style-type: none"> • São células em que o núcleo é completamente destruído; • O DNA é aparente como uma célula-fantasma e não pode ser corado; • As células aparentam não ter núcleo e representam uma fase muito tardia no processo de morte celular.

Fonte: THOMAS et al. (2009).

4.10 Análise estatística

Os dados originais foram tabulados utilizando o programa *Excel*, versão 16.45 (*Microsoft Excel*®, *Microsoft Inc.*, *Redmond, WA, USA*). Foram submetidos ao teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov* que identificou uma distribuição amostral não normal. Os dados de MN e NAs foram avaliados com o teste de *Mann-Whitney* para as diferenças entre os dois grupos em cada intervalo de tempo (T0, T14 e T30) e o teste de *Friedman* para avaliação entre cada grupo nos diferentes intervalos de tempo. Em todos os testes estatísticos, o nível de significância foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS

Cinquenta e seis pacientes foram triados e 24 pacientes (42,86%) não foram incluídos não cumprir com os critérios de inclusão, por falta de disponibilidade ou por não completarem todos os tempos de avaliação por motivos alheios à pesquisa. Um total de 32 (57,14%) foram selecionados para participar desta pesquisa com base nos

critérios de inclusão e exclusão (Figura 2). A média de idade e sexo dos participantes estão descritos na tabela 1.

Figura 4 - Fluxograma de distribuição da amostra.

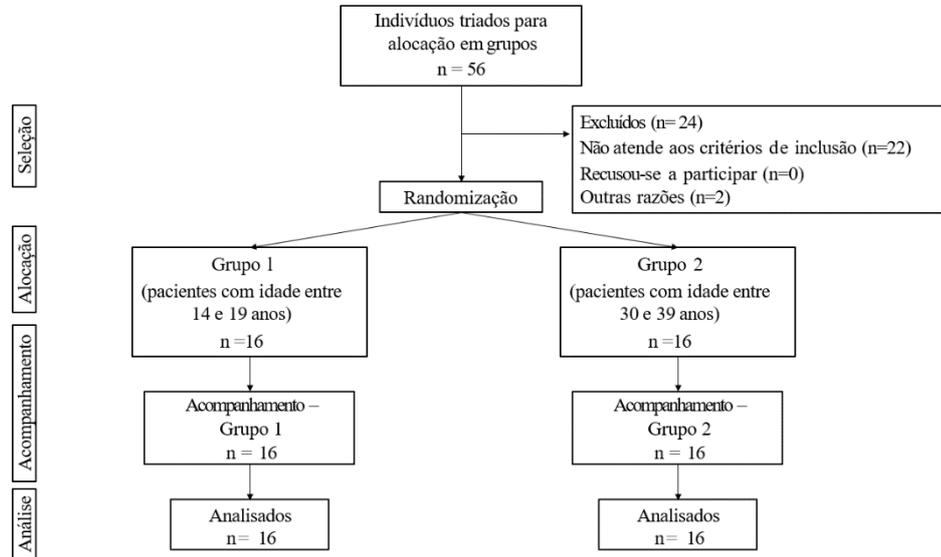


Tabela 1 – Características dos grupos experimentais.

Características	G1	G2	p
Idade (média ± DP, Anos)	16,5 ± 1,7	36,4 ± 5,0	0,00*
Sexo (homens, %)	50%	31,25%	0,47*

DP = Desvio Padrão

* Teste de Mann-Whitney

A tabela 2 apresenta a média e desvio padrão dos grupos 1 e 2 com relação às NAs de acordo com o tempo.

A frequência de MN foi semelhante no grupo de pacientes jovens (grupo 1) (T0:0,97 ± 0,43; T14: 1,47 ± 0,62; T30: 1,34±0,68) e no grupo de pacientes adultos (grupo 2) (T0: 0,81 ±0,57; T14: 1,22 ± 0,55; T30: 1,06 ± 0,75), não demonstrando potencial genotóxico, independentemente do período avaliado (p = 0,12 e p = 0,60 para os grupos 1 e 2, respectivamente).

Em relação às NAs, a CL e NB foram encontradas em baixa quantidade nos dois grupos. Já as células BNs foram mais frequentes no grupo 1 (p = 0,00), permanecendo aumentadas mesmo após 30 dias do término do clareamento dental

em ambos os grupos (grupo 1: $p = 0,01$ e grupo 2: $p = 0,04$). A CR, PIC e CC não foram observadas, independentemente da faixa etária (Tabela 2).

Tabela 2: Média e desvio padrão da frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares por 2000 células de acordo com as diferentes faixas etárias e intervalos de tempo avaliados.

		Micronúcleos				Cariólise				Cariorrexis				Picnose				Células Binucleadas				Botão nuclear				Cromatina Condensada			
		T0	T14	T30	p*	T0	T14	T30	p*	T0	T14	T30	p*	T0	T14	T30	p*	T0	T14	T30	p*	T0	T14	T30	p*	T0	T14	T30	p*
G1	Média	0,97	1,47	1,34	0,12	0,16	0,94	0,12	0,99	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	2,47	3,34	3,78	0,01	0,00	0,31	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	DP	0,43	0,62	0,68		0,40	0,20	0,29		0,00	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		1,10	1,07	1,61		0,00	0,12	0,00		0,00	0,00	0,00	
G2	Média	0,81	1,22	1,06	0,60	0,06	0,12	0,09	0,84	0,03	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	1,62	2,62	2,16	0,04	0,00	0,00	0,31	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00
	DP	0,57	0,55	0,75		0,17	0,22	0,27		0,12	0,00	0,00		0,00	0,00	0,00		1,04	1,27	0,83		0,00	0,00	0,12		0,00	0,00	0,00	
	p**	0,32	0,31	0,21		0,59	0,67	0,65		0,31	1,00	1,00		1,00	1,00	1,00		0,02	0,08	0,00		1,00	0,32	0,32		1,00	1,00	1,00	

p*: Teste de Friedman; p** Teste de Mann-Whitney

DISCUSSÃO

Este ensaio clínico controlado objetivou avaliar o potencial genotóxico e citotóxico do clareamento dental de consultório em pacientes com diferentes faixas etárias. Este constitui o primeiro estudo clínico que visa avaliar o potencial genotóxico do clareamento comparando dois grupos de faixas etárias diferentes. Os demais estudos encontrados na literatura, apesar de não compararem o potencial genotóxico do clareamento dental em diferentes faixas etárias, afirmam que a idade é um fator bem caracterizado por um aumento constante na frequência de MN de acordo com seu avanço (ALMEIDA et al., 2015; BONASSI et al., 2011; HOLLAND et al., 2008; NERSESYAN et al., 2006; REZENDE et al., 2016; THOMAS et al., 2009). Por outro lado, os resultados obtidos por Ojeda et al. (2018), ao analisar o potencial genotóxico em pacientes com *Diabetes Mellitus*, relataram que gênero e idade não influenciaram o dano celular no epitélio oral, no entanto, segundo os autores, as médias e o intervalo de idades entre os grupos foram semelhantes.

O clareamento dental consiste na aplicação de um gel clareador sobre a superfície do dente, podendo este ser à base de PC, geralmente utilizados no clareamento caseiro, ou HP, geralmente utilizados no clareamento de consultório, ambos realizados sempre com supervisão do cirurgião-dentista (BARBOSA et al., 2015). O gel HP 35% (*Total Blanc Office 35%®*, NOVA DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi escolhido para ser usado neste ensaio clínico. A principal vantagem relacionada ao clareamento de consultório é que este é controlado pelo cirurgião-dentista, apresentando maior controle da irritação gengival, principalmente em locais de retração gengival, locais estes propícios a reações de hipersensibilidade (BARBOSA et al., 2015; GEUS et al., 2015; GOLDBERG; GROOTVELD; LYNCH, 2010). Diferente da técnica domiciliar, o procedimento em consultório utiliza géis clareadores com altas concentrações de HP, geralmente em torno de 35%, a fim de promover um clareamento mais rápido com número reduzido de aplicações (TORRES et al., 2021). Os resultados apresentados por Torres et al. (2021) mostraram que a concentração de peróxido é diretamente proporcional ao efeito clareador, concluindo que maiores concentrações de peróxido levam ao aumento do efeito clareador, aumentando também a penetração de hidrogênio na estrutura dentária.

Por outro lado, o clareamento causa preocupações relacionadas a sua segurança por causa da sensibilidade dentária e irritação gengival relatadas pelos pacientes (ALMEIDA et al., 2015; KLARIC et al., 2013; NAIK; TREDWIN; SCULLY, 2006). Além disso, sua carcinogenicidade e genotoxicidade são apontados como focos de investigação (GOLDBERG; GROOTVELD; LYNCH, 2010). Os efeitos genotóxicos do HP são os resultados da formação de radicais livres que podem danificar um número de estruturas intracelulares (KLARIC et al., 2013; METGUD et al., 2015; REZENDE et al., 2016). Um número crescente de MN sugere que estresse oxidativo e danos ao genoma ocorreram após o clareamento (KLARIC et al., 2013). O dano oxidativo ao DNA inclui a oxidação de nucleosídeos que pode ocasionar quebras na fita de DNA, falhas no sistema de reparo do DNA e apoptose, danos estes que podem ter consequências carcinogênicas (GARCÍA et al., 2019).

O ensaio de MN é executado desde 1980 para o biomonitoramento da inalação ou exposição local a agentes genotóxicos e era utilizado, a princípio, para medir apenas a frequência de MN, no entanto, todos os tipos celulares e outras NAs foram introduzidas para a forma atual como ensaio de "citoma" de danos ao DNA, proliferação, diferenciação e morte celular (BOLOGNESI et al., 2013). Os efeitos genotóxicos do HP *in vivo* são questionáveis, estudos anteriores sobre a toxicidade do HP foram conduzidos *in vitro* nas culturas celulares e *in vivo* em modelos animais (KLARIC et al., 2013). Ainda não há um consenso na literatura sobre as alterações genéticas na mucosa oral devido a ação de produtos clareadores dentais em estudos clínicos (ALMEIDA et al., 2015). A literatura apresenta apenas dois estudos (KLARIC et al., 2013; REZENDE et al., 2016) que avaliam o potencial genotóxico do clareamento em alta concentração. Outros estudos foram realizados apenas *in vitro* (GOLDBERG; GROOTVELD; LYNCH, 2010; RIBEIRO et al., 2017) ou são relacionados ao clareamento caseiro (ALMEIDA et al., 2015; GARCÍA et al., 2019; GEUS et al., 2015; MONTEIRO et al., 2019). As pesquisas realizadas *in vitro* mostraram efeito genotóxico positivo. As diferenças nos resultados dos estudos *in vivo* e *in vitro* são provavelmente devidas as diferentes condições experimentais sob as quais as culturas celulares foram expostas. As células *in vitro* são diretamente expostas à altas concentrações de HP e não possuem mecanismos de proteção como as catalases e os antioxidantes, por esses motivos, as células *in vivo* possuem maior

capacidade de resistir ao efeito genotóxico dos radicais livres do que as células em culturas celulares (KLARIC et al., 2013).

A genotoxicidade é propriedade de um agente capaz de danificar o material genético de uma célula, podendo causar mutações e levar ao câncer (GARCÍA et al., 2019). A citologia esfoliativa foi utilizada para analisar a formação de MN na mucosa bucal. Este é um método simples, não invasivo, com relativa facilidade de pontuação, baixo custo e eficiência de tempo que tem sido usado como adjunto para a epidemiologia molecular (ALMEIDA et al., 2015; METGUD et al., 2015). A análise das células esfoliadas da mucosa bucal também fornece evidências da presença de outras NAs, como BN, NB, CR, CL, CC e PIC (METGUD et al., 2015). A análise de outras NAs, além de MN, é fundamental para apresentar outros mecanismos de danos ao material genético, conhecido como efeito genotóxico, necrose, apoptose, amplificação de genes e defeitos citogenéticos (GARCÍA et al., 2019). Uma combinação da avaliação de MN e NAs pode aumentar a sensibilidade para avaliação dos efeitos genotóxicos, citotóxicos e citostáticos, fornecido pelo método do citoma, melhorando o potencial preditivo do ensaio para o risco de câncer (BOLOGNESI et al., 2015; GOLDBERG; GROOTVELD; LYNCH, 2010; METGUD et al., 2015).

O presente estudo também analisou as NAs presentes, como os marcadores genotóxicos (MN, BN e NB) e os marcadores citotóxicos (CL, CR, CC e PIC). Em relação à frequência de MN, biomarcador mais estudado em relação a genotoxicidade, observou-se que o clareamento de consultório com HP 35%, sob uso de barreira gengival, não apresentou efeito genotóxico independente da faixa etária do paciente. Resultado similar foi observado por Rezende et al. (2016), em que a frequência de MN não aumentou após o clareamento com HP 35%, os autores sugerem que o gel HP em alta concentração em condições controladas não induz danos ao DNA quando aplicados em duas sessões dentro com intervalo de uma semana. Por outro lado, Almeida et al. (2015) avaliaram o potencial genotóxico em duas concentrações (10% e 16%) de PC na gengiva marginal durante 21 dias, os autores observaram um aumento na frequência MN em ambas as concentrações quando comparadas aos valores basais e 15 dias após a exposição.

No presente estudo, as células BNs apresentaram-se aumentadas, mesmo após 30 dias do término do clareamento. As células BNs são provavelmente um indicativo de falha na citocinese após a última divisão nuclear na camada basal

(BOLOGNESI et al., 2013; METGUD et al., 2015). O número de células BNs é um indicador de toxicidade nas estruturas proteicas de uma célula, particularmente do citoesqueleto. A citocinese e a migração cromossômica são afetadas por danos ao citoesqueleto, e como uma manifestação da falha na citocinese, ocorre o aparecimento de células contendo dois núcleos. Um aumento do número de células BNs implica que o dano também afeta os microtúbulos do fuso mitótico e outras formações de proteínas intracelulares (KLARIC et al., 2013), dessa forma, a presença de células BN é um biomarcador indicativo de falha de citocinese e suscetibilidade à aneuploidia (BOLOGNESI et al., 2013; BONASSI et al., 2011; THOMAS et al., 2009). O nível médio para controle de 6,5 MN por 1000 células BN foi encontrado (SOMMER et al., 2020) e a frequência média espontânea de células BN avaliada em 852 controles saudáveis foi de 3,04% (BONASSI et al., 2011). Um aumento na frequência de células BNs também foi observado nos estudos de Cavalcante et al. (2017) que apresentou em seus resultados um aumento significativo das células BNs em crianças expostas à poluição decorrente do tráfego intenso de veículos e Aslantürk et al. (2017) que observou um aumento de células BNs em cabeleireiros expostos à produtos químicos, sugerindo que essa NA é sensível à prováveis carcinógenos.

As demais NAs apresentaram-se em baixa frequência ou não foram observadas na presente pesquisa. Poucos estudos avaliam as NAs em pacientes submetidos ao clareamento dental. Klaric et al. (2013) observaram um aumento significativo nas frequências de MN, BN, NB e CL e concluíram que ambas as preparações estudadas (HP 25% e 38%) demonstraram potencial genotóxico. García et al. (2019) avaliaram o efeito genotóxico e citotóxico após clareamento caseiro com tiras contendo HP 10% e observaram que o clareamento levou a um aumento de marcadores genotóxicos (MN, BN e NB) e citotóxicos (CL, CR, CC e PIC).

As coletas para a contagem de MN foram realizadas em três intervalos de tempo (T0, T14 E T30) para avaliar quaisquer possíveis efeitos durante o processo de renovação celular como em estudos anteriores (MONTEIRO et al., 2019). A frequência de MN na mucosa oral normal é entre 0,5 - 2,0 / 1000 células, (HOLLAND et al., 2006; REZENDE et al., 20216; THOMAS et al., 2009). A taxa de renovação celular varia entre 7 e 21 dias, e após esse período, os efeitos genotóxicos são observados (HOLLAND et al., 2008; THOMAS et al., 2009). A renovação do epitélio oral ocorre por meio de mitoses da camada basal que migram para a superfície e, uma vez que

ocorre a formação de MN, eles não são reparáveis e permanecem como evidência do dano genético ocorrido durante a divisão das células basais (METGUD et al., 2015). Os resultados obtidos por Klaric et al. (2013) foram coletadas em até 72 h após o clareamento, considerando o período de renovação celular do epitélio oral, os efeitos genotóxicos observados durante esse período reduzido podem não ser conclusivos.

A fim de evitar o contato de géis clareadores em consultório com o tecido gengival, uma barreira fotopolimerizável é aplicada sobre a gengiva (KLARIC et al., 2013; REZENDE et al., 2016). O curto tempo de uso e exposição da barreira gengival fotopolimerizável ao tecido gengival pode compensar o aumento da concentração de HP utilizada em protocolos de clareamento em consultório (REZENDE et al., 2016). A resina fotopolimerizável usada em géis gengivais de proteção contém monômeros de metacrilato com um potencial efeito genotóxico (KNEZEVIC et al., 2008). Como uma resina fotopolimerizável nunca é completamente polimerizada, uma certa quantidade de monômero permanece em contato com a gengiva por toda a duração do clareamento (KLARIC et al., 2013; RIBEIRO et al., 2017). Klaric et al. (2013) atribuíram o alto número de MN após o clareamento em consultório à polimerização inadequada da barreira gengival, no entanto, Goldberg; Grootveld; Lynch (2010) relataram que os efeitos de genotoxicidade e carcinogenicidade ocorrem apenas em concentrações nunca alcançadas durante tratamentos dentários. Assim como nas pesquisas realizadas por Klaric et al. (2013) e Rezende et al. (2016), a gengiva foi isolada com uma barreira gengival fotopolimerizável. Neste estudo, o clareamento com HP 35% com uso da barreira gengival não apresentou potencial genotóxico para o marcador MN, independente do grupo, embora as células BNs apresentaram-se aumentadas em jovens e adultos.

Este estudo apresenta limitações quanto aos seus resultados e deve ser visto com cautela em relação a coloração utilizada. A escolha de um protocolo de coloração não específico para DNA, como a solução de Giemsa, pode levar a resultados falsos positivos na classificação de corpos não nucleares, bactérias ou grânulos de queratohialina quando comparados com colorações específicas, como DAPI ou o método de Feulgen (BOLOGNESI et al., 2013; BOLOGNESI et al., 2015). A coloração *Feulgen - Fast Green* é usada como método padrão (BOLOGNESI et al., 2013), visto que algumas NAs são difíceis de interpretar e podem ser classificados erroneamente como MN (METGUD et al., 2015). A fim de comparações na literatura, os únicos autores que

realizaram o clareamento em consultório foram Klaric et al. (2013) e Rezende et al. (2016), ambos os autores utilizaram solução de Giemsa como protocolo de coloração. Portanto, este estudo utilizou o protocolo com Giemsa, com base na literatura apresentada acima, tendo em vista que a principal razão para a variabilidade de resultados encontrados na literatura é a falta de um protocolo padronizado dos métodos de coloração e pontuação (BOLOGNESI et al., 2015). No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a possível genotoxicidade e carcinogenicidade do clareamento dental em ambiente clínico e um número maior de participantes, além de outras faixas etárias, são necessários.

CONCLUSÃO

Com base nos métodos aplicados e nos resultados obtidos, o presente estudo chegou à conclusão de que:

- O clareamento dental com HP 35% com uso de barreira gengival fotopolimerizável não apresenta potencial genotóxico para o marcador MN, em adolescentes de 14 a 19 anos e em adultos de 30 a 39 anos.
- As células BNs foram frequentes em pacientes de ambos os grupos, e apresentaram-se elevadas 30 dias após o clareamento dental.

Mais pesquisas são necessárias para avaliar a possível genotoxicidade e carcinogenicidade do clareamento dental em ambiente clínico e um número maior de participantes, além de outras faixas etárias, são necessários.

REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, A. F. et al. Genotoxic potential of 10% and 16% carbamide peroxide in dental bleaching. **Braz oral res**, v. 29, n. 1, p. 1-7, jan. 2015.
2. ASLANTÜRK, O. S.; ÇELİK, T. A. Genotoxic risk assessment in professionals working hairdressers area using buccal micronucleus assay, in Aydın City, Turkey. **Environ Sci Pollut Res Int**, v. 24, n. 17, p. 14700-05, jun. 2017.
3. BOLOGNESI, C. et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: a systematic review and metanalysis. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 766, [s.n.], p. 20-31, out.-dez. 2015.
4. BOLOGNESI, C. et al. Micronuclei and upper body cancers (head, neck, breast cancers) a systematic review and meta-analysis. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 787, [s.n.], p. 108358, jan.-jun. 2021.
5. BOLOGNESI, C. et al. The HUMNxl scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay—An update and expanded photogallery. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 753, n. 2, p. 100-13, out.-nov. 2013.
6. BONACINA, L. V. et al. Genotoxicity of 22% Carbamide Peroxide Bleaching Agent on Oral Cells using the Micronucleus Technique. **J. Clin. Diagnostic Res.**, v. 14, n. 3, p. 14-17, mar. 2020.
7. BONASSI, S. et al. The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. **Mutat Res Rev Mutat Res**, v. 728, n. 3, p. 88-97, nov.-dez. 2011.
8. CAVALCANTE, D. N. C. et al. Genotoxic and mutagenic effects of passive smoking and urban air pollutants in buccal mucosa cells of children enrolled in public school. **Toxicol Mech Methods**, v. 27, n. 5, p. 346-51, jan. 2017.
9. FENECH, M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1203, out. 2020.
10. GARCÍA, J. F. D. R. et al. In vivo evaluation of the genotoxicity and oxidative damage in individuals exposed to 10% hydrogen peroxide whitening strips. **Clin Oral Investig**, v. 23, n. 7, p. 3033-46, jul. 2019.
11. GELL, L.; MEIER, P. S.; GOYDER, E. Alcohol consumption among the over 50s: international comparisons. **Alcohol and alcoholism**, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2015.
12. GEUS, J. L. et al. Evaluation of genotoxicity and efficacy of at-home bleaching in smokers: a single-blind controlled clinical trial. **Oper Dent**, v. 40, n. 2, p.47-55, mar.-abr. 2015.
13. GOLDBERG, M.; GROOTVELD, M.; LYNCH, E. Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. **Clin Oral Investig**, v. 14, n. 1, p. 1-10, fev. 2010.
14. HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the humn project perspective on current status and knowledge gaps. **Mutat Res**, v. 659, n. 1-2, p. 93-108, jul.-ago. 2008.
15. JOINER, A.; LUO, W. Tooth colour and whiteness: a reviw. **J Dent**, v. 67, supl, p. 3-10, dez. 2017.

16. KLARIC, E. et al. Genotoxic effect of two bleaching agents on oral mucosa. **Cancer Genomics Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 209-15, set.-out. 2013.
17. LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. A medição da concordância do observador para dados por categoria. **Biometrics**, v. 33, p. 159-74, 1977.
18. MALACARNE, I. T. et al. Is micronucleus assay in oral exfoliated cells a suitable tool for biomonitoring children exposed to environmental pollutants? A systematic review. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 28, n. 46, p. 65083-65093, out. 2021.
19. METGUD, R. et al. Nuclear anomalies in exfoliated buccal epithelial cells of petrol station attendants in Udaipur, Rajasthan. **J Cancer Res Ther**, v. 11, n. 4, p. 868-73, out.-dez. 2015.
20. MONTEIRO, M. J. F. et al. Evaluation of the genotoxic potential of different delivery methods of at-home bleaching gels: a single-blind, randomized clinical trial. **Clin Oral Investig**, v. 23, n. 5, p. 2199-206, maio 2019.
21. NAIK, S.; TREDWIN, C. J.; SCULLY, C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): review of safety in relation to possible carcinogenesis. **Oral Oncol**, v. 42, n. 7, p. 668-74, ago. 2006.
22. NERSESYAN, A. et al. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells. **Cancer Epidemiol Biomarker Prev.**, v. 15, n. 10, p. 1835-40, out. 2006.
23. OJEDA, J. E. Q. et al. Increased Micronuclei Frequency in Oral and Lingual Epithelium of Treated Diabetes Mellitus Patients. **Biomed Res**, v. 2018, [s.n.], p. 1-8, jan. 2018.
24. REHANI, S. et al. Genotoxicity in oral mucosal epithelial cells of petrol station attendants: A micronucleus study. **J. Cytol.**, v. 38, n. 4, p. 225-30, nov. 2021.
25. REZENDE, M. et al. Clinical evaluation of genotoxicity of in-office bleaching. **Oper Dent**, v. 41, n. 6, p. 578-86, nov.-dez. 2016.
26. RIBEIRO, D. A. et al. Genotoxicity induced by dental materials: a comprehensive review. **Anticancer res**, v. 37, n. 8, p. 4017- 24, ago. 2017.
27. SILVA, R. R. Rohenkohl et al. Influence of smoking on oral cells genotoxicity after at-home bleaching using 22% carbamide peroxide: a cohort study. **Clin. Oral Investig**. v. 26, n. 2, p. 1409-1416, ago. 2022.
28. SILVEIRA, F. M. et al. Potentially carcinogenic effects of hydrogen peroxide for tooth bleaching on the oral mucosa: A systematic review and meta-analysis. **J Prosthet Dent**, [S.L.], p. 1-9, mar. 2022.
29. SOMMER, S.; BURACZEWSKA, I.; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus assay: the state of art, and future directions. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 4, p. 1534, fev. 2020.
30. THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay. **Nat Protoc**, v. 4, n. 6, p. 825-37, maio 2009.
31. TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutat Res**, v. 27, n. 1, p. 69-77, fev. 1992.
32. TONINA, E. et al. Anomalías Nucleares em células exfoliadas de la mucosa bucal de estudiantes fumadores. **CIMEL**, v. 22, n. 1, p. 46-9, abr. 2017.
33. TOTAL BLANC, NOVA DFL. Manual de instrução. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.dfl.com.br/wp-content/uploads/2020/03/055-msds-total-blanc-protetor-gengival_port.pdf>. Acesso em: 24/08/2021.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do participante.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar da Pesquisa “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO”, sob a responsabilidade da pesquisadora Anna Paula Silva Coêlho, e-mail: annapaulacoelho11@gmail.com, orientada pela Professora Doutora Juliana Vianna Pereira, e-mail: juvpereira@icloud.com, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (Av. Ayrão, 1539 – Praça 14 de Janeiro, Manaus – AM, 69025-050), telefone (92) 3305-1480, o qual pretende avaliar o potencial genotóxico do Peróxido de Hidrogênio (HP) a 35%, com uso da barreira gengival, aplicado pela técnica do clareamento de consultório.

A participação é voluntária e se dará por meio da realização do tratamento clareador pela técnica de consultório, realizado pelos pesquisadores na clínica odontológica da Faculdade de Odontologia da UFAM. O (a) Sr. (a) será submetido a duas sessões de clareamento dentário de consultório e três vezes à técnica de citologia esfoliativa. O clareamento será realizado com HP 35% durante 45 minutos e a citologia esfoliativa será feita através da rotação manual de uma escova citológica sob a gengiva inserida. Todos esses procedimentos serão realizados na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas por profissionais especializados, e os horários serão previamente agendados.

Os procedimentos a serem realizados são seguros e consagrados na prática clínica. Apesar disso, toda pesquisa envolvendo seres humanos apresenta algum tipo de risco. Não há como garantir o quanto de alteração de cor será atingida, já que isso depende de fatores que variam de um indivíduo para o outro, portanto, não é possível garantir que o Sr. (a) ficará completamente satisfeito ao fim do tratamento. Caso o (a) Sr. (a) não fique satisfeito com a cor resultante do clareamento após as duas sessões programadas neste estudo, poderá ser analisada a possibilidade de uma associação com técnica de clareamento caseiro, com o intuito de melhorar o resultado. Além disso, no decorrer da pesquisa, o (a) Sr. (a) poderá sentir algum tipo de desconforto como sensibilidade dental excessiva e/ou irritação gengival. Caso ocorram, o clareamento pode ser imediatamente suspenso e tratamentos para eliminar e/ou reduzir o desconforto serão imediatamente aplicados, como uso de fluoretos e medicação analgésica. Essas ocorrências são temporárias e desaparecem com a suspensão do tratamento clareador. A realização da citologia esfoliativa pode ocasionar algum desconforto momentâneo durante a rotação das cerdas na mucosa gengival, no entanto, a rotação será realizada de forma lenta e com pouca pressão para evitar injúrias na mucosa e garantir que as células coletadas não sofram deformação. Quanto ao risco de identificação dos dados, serão tomadas todas as medidas para resguardar sigilo e confidencialidade. Caso ocorra algum dano de natureza física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual, os Srs. (as) terão acompanhamento integral com profissionais da área, oferecido pelos pesquisadores, sem custos adicionais.

Os benefícios esperados são o clareamento dental e a melhora na sua auto-percepção estética. Além disso, caso o (a) Sr. (a) aceite participar, ajudará a fornecer embasamento científico aos profissionais que poderão escolher qual técnica será utilizada como protocolo na prática odontológica e que realmente fornecerá qualidade e segurança ao tratamento estético, resultando na evolução do tratamento nas diferentes faixas etárias, trazendo novas informações a respeito das técnicas utilizadas, assim como os efeitos genotóxicos do produto, resultando em aplicabilidade com maior segurança e menos efeitos adversos aos pacientes durante a realização de tratamento clareador.

O (a) Sr. (a) não terão nenhuma despesa direta com o estudo e também não receberão nenhuma remuneração, no entanto, em caso de algum problema relacionado com a pesquisa, você (s) terá (ão) direito à garantia de ressarcimento e indenização, além de assistência gratuita prestada na clínica de Odontologia da UFAM.

Caso após consentir em sua participação o (a) Sr. (a) desistir de continuar na pesquisa, são preservados 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. Reiteramos que o (a) Sr. (a) e seu (sua) acompanhante, se assim desejarem, terão suas despesas ressarcidas, sejam elas devido a alimentação, transporte, ou qualquer outra despesa que sua participação no projeto venha a acarretar.

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 participação do (a) Sr. (a). No fim da pesquisa, o (a) Sr. (a) será informado sobre os resultados. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a) poderão entrar em contato com as pesquisadoras nos endereços, telefones e e-mails citados anteriormente 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, ramal 2004, e-mail: cep.ufam@gmail.com.

O CEP/UFAM é uma comissão constituída por treze membros das várias áreas do conhecimento, e um representante dos usuários, que tem por finalidade a avaliação da pesquisa com seres humanos em nossa Instituição, em conformidade com a legislação brasileira regulamentada pela CONEP.

Dessa forma, se o (a) Sr. (a) concordar em participar desta pesquisa, coloque seu nome no local indicado abaixo. Desde já, agradecemos a colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que também será assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, ficando uma o (a) Sr. (a) e outra com o pesquisador (a).

Consentimento Pós-Infomação:

Eu, _____,
declaro que li e concordo em participar da pesquisa "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM PACIENTES COM DIFERENTES

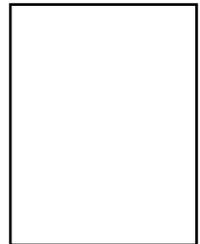
FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO“. Declaro ter recebido uma via original deste documento rubricada em todas as folhas e assinada ao final pelo pesquisador e por mim.

Assinatura do participante

Manaus, ____ de _____ de 2022.

Assinatura da Pesquisador Responsável

Assinatura do Orientador Responsável



Impressão
Datiloscópica

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do responsável.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) seu (a) filho (a) para participar da Pesquisa “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO”, sob a responsabilidade da pesquisadora Anna Paula Silva Coêlho, e-mail: annapaulacoelho11@gmail.com, orientada pela Professora Doutora Juliana Vianna Pereira, e-mail: juvpereira@icloud.com, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (Av. Ayrão, 1539 – Praça 14 de Janeiro, Manaus – AM, 69025-050), telefone (92) 3305-1480, o qual pretende avaliar o potencial genotóxico do Peróxido de Hidrogênio (HP) a 35%, com uso da barreira gengival, aplicado pela técnica do clareamento de consultório.

A participação é voluntária e se dará por meio da realização do tratamento clareador pela técnica de consultório, realizado pelos pesquisadores na clínica odontológica da Faculdade de Odontologia da UFAM. O (a) seu (a) filho (a) será submetido a duas sessões de clareamento dentário de consultório e três vezes à técnica de citologia esfoliativa. O clareamento será realizado com HP 35% durante 45 minutos e a citologia esfoliativa será feita através da rotação manual de uma escova citológica sob a gengiva inserida. Todos esses procedimentos serão realizados na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas por profissionais especializados, e os horários serão previamente agendados.

Os procedimentos a serem realizados são seguros e consagrados na prática clínica. Apesar disso, toda pesquisa envolvendo seres humanos apresenta algum tipo de risco. Não há como garantir o quanto de alteração de cor será atingida, já que isso depende de fatores que variam de um indivíduo para o outro, portanto, não é possível garantir que o (a) seu (a) filho (a) ficará completamente satisfeito ao fim do tratamento. Caso o (a) seu (a) filho (a) não fique satisfeito com a cor resultante do clareamento, após as duas sessões programadas neste estudo, poderá ser analisada a possibilidade de uma associação com técnica de clareamento caseiro, com o intuito de melhorar o resultado. Além disso, no decorrer da pesquisa, o (a) seu (a) filho (a) poderá sentir algum tipo de desconforto como sensibilidade dental excessiva e/ou irritação gengival. Caso ocorram, o clareamento pode ser imediatamente suspenso e tratamentos para eliminar e/ou reduzir o desconforto serão imediatamente aplicados, como uso de fluoretos e medicação analgésica. Essas ocorrências são temporárias e desaparecem com a suspensão do tratamento clareador. A realização da citologia esfoliativa pode ocasionar algum desconforto momentâneo durante a rotação das cerdas na mucosa gengival, no entanto, a rotação será realizada de forma lenta e com pouca pressão para evitar injúrias na mucosa e garantir que as células coletadas não sofram deformação. Quanto ao risco de identificação dos dados, serão tomadas todas as medidas para resguardar sigilo e confidencialidade. Caso ocorra algum dano de natureza física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual, o (a) seu (a) filho (a) terá acompanhamento integral com profissionais da área, oferecido pelos pesquisadores, sem custos adicionais.

Os benefícios esperados são o clareamento dental e a melhora na sua auto-percepção estética. Além disso, caso o (a) seu (a) filho (a) aceite participar, ajudará a fornecer embasamento científico aos profissionais que poderão escolher qual técnica

será utilizada como protocolo na prática odontológica e que realmente fornecerá qualidade ao tratamento estético, resultando na evolução do tratamento nessa idade, trazendo novas informações a respeito das técnicas utilizadas, assim como os efeitos genotóxicos do produto, resultando em aplicabilidade com maior segurança e menos efeitos adversos aos pacientes durante a realização de tratamento clareador.

O (a) seu (a) filho (a) não terá nenhuma despesa direta com o estudo e também não receberá nenhuma remuneração, no entanto, em caso de algum problema relacionado com a pesquisa, seu (a) filho (a) terá direito à garantia de ressarcimento e indenização, além de assistência gratuita prestada na clínica de Odontologia da UFAM.

Caso após consentir em sua participação o (a) seu (a) filho (a) desistir de continuar na pesquisa, é preservado 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. Reiteramos que o (a) seu (a) filho (a) e seu (sua) acompanhante, se assim desejarem, terão suas despesas ressarcidas, sejam elas devido a alimentação, transporte, ou qualquer outra despesa que sua participação no projeto venha a acarretar.

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 participação do (a) seu (a) filho (a). No fim da pesquisa, vocês serão informados sobre os resultados. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas a identidade do seu (a) filho (a) não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, vocês poderão entrar em contato com as pesquisadoras nos endereços, telefones e e-mails citados anteriormente 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, ramal 2004, e-mail: cep.ufam@gmail.com.

O CEP/UFAM é uma comissão constituída por treze membros das várias áreas do conhecimento, e um representante dos usuários, que tem por finalidade a avaliação da pesquisa com seres humanos em nossa Instituição, em conformidade com a legislação brasileira regulamentada pela CONEP.

Dessa forma, se concordar que seu (a) filho (a) participe desta pesquisa, coloque seu nome no local indicado abaixo. Desde já, agradecemos a colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que também será assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, ficando uma o (a) Sr. (a) e outra com o pesquisador (a).

Consentimento Pós–Informação:

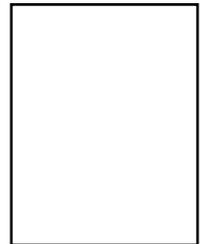
Eu, _____,
declaro que li e concordo que meu (a) filho (a) participe da pesquisa “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO“. Declaro ter recebido uma via original deste documento rubricada em todas as folhas e assinada ao final pelo pesquisador e por mim.

Assinatura do participante

Manaus, _____ de _____ de 2022.

Assinatura da Pesquisador Responsável

Assinatura do Orientador Responsável



Impressão
Datiloscópica

APÊNDICE C – Termo de Assentimento do menor.

TERMO DE ASSENTIMENTO DO MENOR

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO”, sob a responsabilidade da pesquisadora Anna Paula Silva Coêlho, e-mail: annapaulacoelho11@gmail.com, orientada pela Professora Doutora Juliana Vianna Pereira, e-mail: juvpereira@icloud.com, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (Av. Ayrão, 1539 – Praça 14 de Janeiro, Manaus – AM, 69025-050), telefone (92) 3305-1480. Seus pais concordaram que você participe da pesquisa, a qual pretende avaliar o potencial genotóxico do Peróxido de Hidrogênio (HP) a 35%, com uso da barreira gengival, aplicado pela técnica do clareamento de consultório.

A sua participação é voluntária e se dará por meio da realização do tratamento clareador pela técnica de consultório, realizado pelos pesquisadores na clínica odontológica da Faculdade de Odontologia da UFAM. Você será submetido a duas sessões de clareamento dentário de consultório e três vezes à técnica de citologia esfoliativa. Todos esses procedimentos serão realizados na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas por profissionais especializados, e os horários serão previamente agendados.

Os procedimentos a serem realizados são seguros, mas toda pesquisa envolvendo seres humanos apresenta algum tipo de risco. Não há como garantir o quanto de alteração de cor será atingida, por isso, não é possível garantir que você ficará completamente satisfeito ao fim do tratamento. Caso você não fique satisfeito com a cor resultante do clareamento, após as duas sessões programadas neste estudo, poderá ser analisada a possibilidade de uma associação com técnica de clareamento caseiro, com o intuito de melhorar o resultado. Além disso, no decorrer da pesquisa, você poderá sentir algum tipo de desconforto como sensibilidade dental e/ou irritação gengival, caso isso aconteça você entrará em contato conosco, imediatamente, para realizarmos os procedimentos adequados. A rotação das cerdas da escova também podem ocasionar algum desconforto na gengiva, no entanto, qualquer desconforto deverá ser relatado e o procedimento será interrompido.

Há vantagens que podem acontecer com este tratamento, como os seus dentes serem clareados e conseguirmos novas informações sobre esse tratamento. Se você aceitar participar, estará contribuindo para o avanço científico da comunidade acadêmica, resultando na evolução do tratamento nessa idade, trazendo novas informações a respeito das técnicas utilizadas, assim como os danos nas células presentes na sua boca, resultando em uma maior segurança e menos efeitos adversos aos pacientes quando da realização do tratamento de clareamento.

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

Para qualquer outra informação, você e seu responsável poderão entrar em contato com as pesquisadoras nos endereços, telefones e e-mails citados anteriormente 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, ramal 2004, e-mail: cep.ufam@gmail.com.

O CEP/UFAM é uma comissão constituída por treze membros das várias áreas do conhecimento, e um representante dos usuários, que tem por finalidade a avaliação da pesquisa com seres humanos em nossa Instituição, em conformidade com a legislação brasileira regulamentada pela CONEP.

Dessa forma, se você concordar em participar desta pesquisa, coloque seu nome no local indicado abaixo. Desde já, agradecemos a colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que também será assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, ficando uma com você e seu responsável e outra com o pesquisador (a).

Consentimento Pós-Infomação:

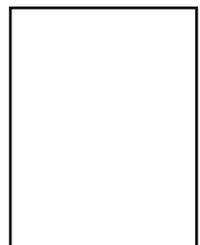
Eu, _____,
 declaro que li e concordo em participar da pesquisa “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO CONTROLADO”. Declaro ter recebido uma via original deste documento rubricada em todas as folhas e assinada ao final pelo pesquisador e por mim.

 Assinatura do menor

Manaus, ____ de _____ de 2022.

 Assinatura da Pesquisador Responsável

 Assinatura do Orientador Responsável



Impressão
 Datiloscópica

ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer Consubstanciado do CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Pesquisador: ANNA PAULA SILVA COELHO

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREAMENTO DENTAL EM PACIENTES COM DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS: ESTUDO CLÍNICO

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Versão: 2

CAAE: 63049722.7.0000.5020

Área Temática:

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.733.147

Apresentação do Projeto:

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2011988.pdf

"É um ensaio clínico controlado, cego, estruturado com base nas normas do CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials). O clareamento dental vem sendo amplamente utilizado como uma opção conservadora para tratamentos estéticos. No entanto, preocupações sobre a segurança do método em relação a uma possível carcinogenicidade, ainda são levantados. Portanto, este ensaio clínico controlado terá como objetivo avaliar o potencial genotóxico do clareamento dental de consultório em pacientes com diferentes faixas etárias. Os voluntários serão divididos em dois grupos: Grupo 1 – pacientes com faixa etária de 14 a 18 anos, Grupo 2 – pacientes com faixa etária de 31 a 50 anos. O cálculo para determinar o tamanho da amostra se baseou na frequência de micronúcleos por 2000 células. Desta forma será necessário um tamanho amostral mínimo de 20 participantes, por grupo, para um estudo com poder de 80% e alfa de 5%. Todos os voluntários serão submetidos à duas sessões de clareamento de consultório com Peróxido de Hidrogênio a 35% e farão uso da barreira de proteção gengival fotopolimerizável, ambos serão aplicados uma única vez por sessão, durante 45 minutos, nos elementos dentais 15 ao 25. A técnica de citologia esfoliativa será realizada em três tempos diferentes: primeiramente antes do procedimento de clareamento (T0), 7 dias após o término da

segunda sessão do clareamento (T14) e 30 dias após o fim do tratamento (T30). O teste de

1.2. Consentimento Pós Informação: Este deve ter redação simples, como “Li e concordo em participar da pesquisa” ou “Declaro que concordo em participar da pesquisa”. Ressalta-se que não devem ser introduzidas novas informações ou informações contraditórias ao conteúdo do restante do termo. (Carta Circular nº 51-SEI/2017-CONEP/SECNS/MS).

1.2.1. Avaliação da Pendência: Atendida.

Considerações Finais a critério do CEP:

O(A) pesquisador(a) deve enviar por Notificação os relatórios parciais e final. (item XI.d. da Res 466/2012- CNS), por meio da Plataforma Brasil e manter seu cronograma atualizado, solicitando por Emenda eventuais alterações antes da finalização do prazo inicialmente previsto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2011988.pdf	04/10/2022 00:15:22		Aceito
Outros	Carta_Resposta_Projeto.docx	04/10/2022 00:13:41	ANNA PAULA SILVA COELHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CEP_UFAM.docx	04/10/2022 00:10:39	ANNA PAULA SILVA COELHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado_CEP_UFAM.docx	04/10/2022 00:09:59	ANNA PAULA SILVA COELHO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	07/09/2022 19:29:32	ANNA PAULA SILVA COELHO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 01 de Novembro de 2022

**Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador(a))**