

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO

Rodrigo Rohenkohl Silva

**INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA
ALTERAÇÃO DE COR E
GENOTOXICIDADE DAS CÉLULAS ORAIS
APÓS CLAREAMENTO DENTAL CASEIRO
COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA 22%:
ESTUDO DE COORTE**

Passo Fundo

2020

Rodrigo Rohenkohl Silva

**INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA
ALTERAÇÃO DE COR E
GENOTOXICIDADE DAS CÉLULAS ORAIS
APÓS CLAREAMENTO DENTAL CASEIRO
COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA 22%:
ESTUDO DE COORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UPF, para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Odontológica, sob orientação do prof. Dr^a. Paula Benetti e coorientação do prof. Dr. João Paulo de Carli.

Passo Fundo

2020

Folha reservada para
Ata de aprovação da Banca Examinadora

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ata de aprovação fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

Folha reservada para
Ficha catalográfica

Observação:

Mantenha esta página no seu arquivo, imprimindo-a.
Após, faça a substituição pela Ficha Catalográfica fornecida pela
Secretaria para manter a correta numeração do seu trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Rodrigo Rohenkohl Silva, nascido no dia 23 de Setembro de 1988, na cidade de Tangará da Serra, Mato Grosso, filho de Ricardo Manoel Arioli Silva e Virgínia Rohenkohl Silva. Formado em Odontologia pela Universidade de Cuiabá no dia 11 de Janeiro de 2010. Realizou Aperfeiçoamento de Cirurgia Oral e Maxilofacial pela Associação Brasileira de Odontologia-Seção Mato Grosso (ABO-MT), durante o mesmo ano de formação, em Junho de 2012 concluiu Especialização em Endodontia pelo Instituto de Pesquisa Ensino e Extensão em Odontologia (INPEO), em Abril de 2016 finalizou Especialização em Dentística pela Associação Brasileira de Cirurgiões-Dentistas (ABCD), ambos na cidade de Cuiabá, Mato Grosso e em Março de 2018 iniciou o Programa de Mestrado em Odontologia, linha de pesquisa Clínica Odontológica Baseada em Evidências pela Universidade de Passo Fundo (UPF), trabalhando como especialista.

OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por todas as conquistas e oportunidades.

Aos meus pais, Ricardo e Virgínia, pela vida e infinito apoio.

Aos meus irmãos, Rafael e Renata, pela eterna fidelidade.

As minhas avós, Lourdes e Magdalena, por sempre acreditarem em meu potencial.

Aos meus padrinhos, Rogério e Verônica, pelo carinho e incentivo.

Aos demais familiares, amigos e colegas de trabalho, por todo auxílio durante esta jornada.

A minha orientadora, Professora Dr^a. Paula Benetti, meus sinceros agradecimentos pela confiança em mim depositada, contribuição e ensino em todos os momentos do Mestrado, e meu eterno respeito.

Ao meu co-orientador Professor Dr. João Paulo De Carli, pela competência e nunca medir esforços, colaborando imensamente nesta pesquisa.

Aos meus colegas de Mestrado, pela convivência e troca de conhecimentos durante o curso.

Aos colegas da pesquisa, Valquíria Freitas, Júlia Vanini, Júlia Pressoto, Larissa Simião, João Renato, Eduardo Fávero, Mariana Hofstetter, Carlos Eduardo, Laís Bonacina e Viviane Cantelli, obrigado por toda ajuda durante execução das avaliações.

Ao Programa de Pós-Graduação de Odontologia e Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, professores e funcionários minha eterna gratidão.

Ao Dr. Oscar Pecho, pela imensa ajuda e contribuição.

Ao Professor Dr. Álvaro Della Bona, pela expressiva colaboração.

Ao Professor Dr. Kauê Collares, pela ajuda com a estatística.

À empresa FGM produtos Odontológicos, pelo material fornecido que foi utilizado neste estudo.

A todos os pacientes que colaboraram e participaram deste estudo, confiando em nosso trabalho.

Meus sinceros agradecimentos, Obrigado!

SUMÁRIO

BIOGRAFIA DO AUTOR.....	5
OFERECIMENTOS E AGRADECIMENTOS.....	6
LISTA DE TABELAS.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	11
1.INTRODUÇÃO.....	16
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.PROPOSIÇÃO.....	35
CAPÍTULO 1. - INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA ALTERAÇÃO DE COR APÓS CLAREAMENTO DENTAL CASEIRO COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA 22%: ESTUDO DE COORTE.....	36
1.1.INTRODUÇÃO.....	40
1.2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
1.3.RESULTADOS.....	53
1.4.DISSCUSSÃO.....	69
1.5.CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
CAPÍTULO 2. – INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA GENOTOXICIDADE DE CÉLULAS ORAIS APÓS CLAREAMENTO DENTAL CASEIRO COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA 22%: ESTUDO DE COORTE.....	82
2.1.INTRODUÇÃO.....	86
2.2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
2.3. RESULTADOS.....	95
2.4.DISSCUSSÃO.....	103
2.5.CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS.....	110
ANEXOS.....	115
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
REFERÊNCIAS.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 Descrição dos períodos de avaliação para as diferenças de cor (ΔE^*_{ab} e ΔE_{00}) e de índice de brancura (ΔWI_D)	51
Tabela 1.2 Caracterização sócio-demográfica dos participantes da pesquisa.....	55
Tabela 1.3 Valores da mediana de WI_D (Índice de Brancura em Odontologia) entre fumantes e não fumantes para grupo de dentes nos respectivos tempos de avaliação	56
Tabela 2.1 Caracterização sócio-demográfica dos participantes da pesquisa.....	97
Tabela 2.2 Frequência de micronúcleos entre os tempos para fumantes e não fumantes.....	99
Tabela 2.3 Frequência de micronúcleos e alterações metanucleares entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Fluxograma do recrutamento e acompanhamento de voluntários da pesquisa.....	54
Figura 1.2 Boxplots das diferenças ΔW_{ID} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os IC.....	58
Figura 1.3 Boxplots das diferenças ΔW_{ID} entre fumantes e não-fumantes nos períodos de avaliação para os IL	59
Figura 1.4. Boxplots das diferenças ΔW_{ID} entre fumantes e não-fumantes nos períodos de avaliação para os C	60
Figura 1.5 Boxplots das diferenças ΔE^*_{ab} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os IC	62
Figura 1.6 Boxplots das diferenças ΔE^*_{ab} entre fumantes e não-fumantes nos períodos de avaliação para os IL	63
Figura 1.7 Boxplots das diferenças ΔE^*_{ab} entre fumantes e não-fumantes nos períodos de avaliação para os C	64
Figura 1.8 Boxplots das diferenças ΔE_{00} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os IC.....	66
Figura 1.9 Boxplots das diferenças ΔE_{00} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os IL.....	67
Figura 1.10 Boxplots das diferenças ΔE_{00} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os C.....	68
Figura 2.1 Desenho esquemático destacando o aspecto morfológico das alterações metanucleares, adaptado.....	92
Figura 2.2 Boxplots da frequência de alterações metanucleares* entre os tempos para fumantes e não fumantes.....	99
Figura 2.3 Boxplots das diferenças de alterações metanucleares entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação.....	101

RESUMO

OBJETIVOS: Avaliar o efeito do tabagismo na alteração de cor e genotoxicidade das células orais após clareamento dental caseiro. **METODOLOGIA:** Estudo de coorte com 2 grupos (n=40) de pacientes entre 18 e 54 anos: NF-não fumantes (n=24) e F- fumantes (n=16). Os grupos foram submetidos ao clareamento caseiro com peróxido de carbamida (PC) a 22 %, por 1h ao dia, durante 14 dias. As análises de cor e alterações celulares foram realizadas antes do clareamento (T0-*baseline*), um dia (T15), 15 dias (T30) e 30 dias (T45) após seu término. A alteração de cor foi avaliada por espectrofotômetro Vita Easy Shade™. O Índice de Brancura (WID-*Whiteness Index for Dentistry*) foi utilizado para avaliação da eficácia do clareamento. As coordenadas de cor foram registradas e as diferenças de cor entre F e NF nos períodos foram calculadas com as equações CIELAB (ΔE^*_{ab}) e CIEDE2000 (ΔE_{00}). A genotoxicidade foi avaliada pela contagem de micronúcleos (MN) e alterações metanucleares (AM) em células do raspado superficial da gengiva marginal superior e inferior (1.000 células por paciente). O material foi corado por Giemsa a 10% e analisado em microscópio fotônico por observador treinado. A coleta e análise dos dados ocorreram de forma cega. Comparações de variáveis socio-demográficas foram realizadas por Qui-Quadrado. As comparações entre F e NF de alteração de cor por grupo dentário (IC - incisivos centrais, IL – incisivos laterais e C- caninos) e quantidade de MN e AM foram realizadas por Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). **RESULTADOS:** Foi possível observar que o Índice de Brancura (WID) inicial (T0) foi igual entre F e NF. NF mostraram maior WID que F nos outros tempos de avaliação. NF mostraram significativa diferença de Índice de Brancura (ΔWID) de IC e IL (clareou mais) entre (T0) e os demais tempos (T15), (T30) e (T45) em comparação aos F. Em geral as diferenças de cor detectadas por ΔE^*_{ab} e ΔE_{00} acompanharam o WID. Os F apresentaram escurecimento maior de IC (ΔWID) que NF após

clareamento (T45-T15). Em relação à quantidade de MN e AM não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos grupos nos períodos avaliados ($p>0,05$). CONCLUSÕES: O tratamento clareador caseiro com PC 22% pode ser influenciado negativamente pelo tabagismo, mas foi considerado seguro quanto à genotoxicidade dentro do protocolo deste estudo.

Palavras-chave: Clareamento dental, eficácia, fumantes, genotoxicidade

¹ Influence of the smoking on the color change and oral cells genotoxicity after at-home bleaching using 22% carbamide peroxide: a cohort study

Rodrigo Rohenkohl Silva

João Paulo De Carli

Paula Benetti

ABSTRACT¹

OBJECTIVES: To evaluate the effect of smoking on the color change and genotoxicity after at-home bleaching. **METHODOLOGY:** this is a cohort study with 40 patients between 18 and 54 years old, divided into 2 groups (n = 40): NF-nonsmokers (n = 24) and F-smokers (n = 16). The groups were submitted to at-home bleaching with 22% carbamide peroxide (PC), with individual trays for 1 hour a day, for 14 days. Color analyzes and cellular alterations were performed before bleaching (T0-baseline), one day (T15), 15 days (T30) and 1 month (T45) after treatment finishing. The color was measured using the Vita Easyshade™ spectrophotometer. The whitening index (WI_D-*Whiteness Index for Dentistry*) was calculated to evaluate the efficacy of bleaching. The color differences between F and NF at different times were calculated using the CIELAB (ΔE^*_{ab}) and CIEDE2000 (ΔE_{00}) equations. Genotoxicity was assessed by counting micronuclei (MN) and metanuclear alterations (AM) in cells of the superficial scraping of the upper and lower marginal gingiva (1,000 cells per patient). The material was stained by Giemsa at 10% and analyzed under a photonic microscope by a trained observer. Data collection and analysis occurred blindly. Descriptive analysis was performed. Socio-demographic variables were compared by chi-square and Pearson's correlation. Color change comparisons between F and NF by dental group (IC - central incisors, IL - lateral incisors and C-canine) and the frequency of MN and AM were performed by Mann-Whitney ($\alpha = 0.05$). **RESULTS:**

Baseline (T0) whiteness index (WID) was similar between F and NF. NF showed higher WID than F at all other evaluation times. NF showed difference in whiteness index (ΔWID) of CI and C (lighter) between (T0) and the other times (T15), (T30) and (T45) compared to F. In general, the color differences detected by ΔE^*_{ab} and ΔE_{00} followed WID. The F showed a higher darkening of IC than NF in ΔWID (T45-T15). Regarding the amount of MN and AM, no significant differences were found between groups at the evaluated times ($p>0.05$). CONCLUSIONS: At-home bleaching treatment with CP 22% can be negatively affected by smoking. The treatment is considered safe for genotoxicity using the bleach protocol of this study.

Key words: Tooth bleaching, effectiveness, smokers, genotoxicity

1.INTRODUÇÃO

O tratamento clareador de dentes vitais, técnica caseira ou de consultório, é um tratamento odontológico estético com alta demanda, relatado como um procedimento eficaz e conservador, amplamente utilizado para remoção de descolorações extrínsecas e intrínsecas (MEIRELES *et al.*, 2010; BAZZI *et al.*, 2012; LAGO *et al.*, 2016). O tratamento altera a cor dos dentes naturais para cores mais claras, o que leva ao aumento da satisfação com a estética dental dos pacientes (MEIRELES *et al.*, 2010; GEUS *et al.*, 2015a; REZENDE *et al.*, 2016; GRAZIOLI *et al.*, 2017; MARAN *et al.*, 2018).

Os componentes clareadores ativos mais comuns são o peróxido de hidrogênio e o peróxido de carbamida. O clareamento dental caseiro é frequentemente realizado, com peróxido de carbamida que é um complexo estável, em concentrações de 10% a 22 %, o qual se quebra em contato com a água, liberando peróxido de hidrogênio em uma moldeira customizada, usada diariamente pelo paciente por um tempo determinado (MEIRELES *et al.*, 2008; BERNARDON *et al.*, 2010; LA PEÑA *et al.*, 2014; CAREY *et al.*, 2014).

O tabagismo, embora nocivo à saúde geral e bucal, é um hábito bastante presente na população. Pacientes fumantes são frequentemente desestimulados a realizar tratamentos clareadores e excluídos de estudos que avaliam a efetividade deste procedimento (BERNARDON *et al.*,

2010; LA PEÑA *et al.*, 2014; BERNARDON *et al.*, 2015) pois alguns componentes de coloração escura do cigarro como alcatrão, açúcar, cacau e nicotina podem ser transferidos à fumaça durante a queima com potencial de manchar a superfície dental (NERSESYAN *et al.*, 2011; GEUS *et al.*, 2015a; GEUS *et al.*, 2018).

Contudo, a literatura mostra eficácia do tratamento clareador em fumantes, utilizando peróxido de carbamida 10%, com manutenção da cor por um mês até um ano após o tratamento, quando efetuada profilaxia dental (GEUS *et al.*, 2015a; GEUS *et al.*, 2015b; GEUS *et al.* 2015c).

Além disso, o cigarro contém cinquenta componentes carcinogênicos conhecidos (NERSESYAN *et al.*, 2011) e poderia apresentar aumento no potencial genotóxico (BANSAL *et al.*, 2012) ou seja prejuízos no conteúdo genético, quando associado com o tratamento clareador (KLARIC *et al.*, 2013; GEUS *et al.*, 2015a; RIBEIRO *et al.*, 2017).

O teste de micronúcleos possibilita verificar, de maneira eficaz alterações no DNA, causadas pela exposição do indivíduo a algum agente químico como o tabaco (BONASSI *et al.*, 2011; BANSAL *et al.*, 2012). Tendo sido comumente empregado em estudos que avaliaram o potencial genotóxico de agentes clareadores (KLARIC *et al.*, 2013; GEUS *et al.*, 2015a; BOANCINA *et al.*, 2020).

Entretanto, até o momento, o efeito do tabagismo na segurança (genotoxicidade) e eficácia do tratamento clareador utilizando peróxido de carbamida a 22% não foi relatado na literatura.

2.REVISÃO DE LITERATURA

Dentes com descoloração constituem o principal motivo para indicação e realização do tratamento clareador. O clareamento dentário de dentes vitais, apresenta indicação para manchas extrínsecas e intrínsecas. Quando intrínsecas estão relacionadas à fatores como idade (esmalte de dentes jovens é mais espesso e opaco, a dentina é menos espessa e cromatizada), genética (naturalmente escuros), ingestão de alta quantidade de flúor (fluorose), ou de antibióticos específicos, e de algumas desordens que podem se desenvolver, antes da erupção dos dentes (TERRY *et al.*, 2014). As manchas extrínsecas, podem ser originadas pela absorção de componentes coloridos (fumaça do cigarro, corantes presentes em alimentos e bebidas, antibióticos e metais como cobre e ferro), película adquirida ou diretamente pela superfície do dente (CAREY *et al.*, 2014). O clareamento dentário acontece através da dissociação do peróxido de hidrogênio ou carbamida, em oxigênio reativo que degrada quimicamente os cromógenos da matriz orgânica da estrutura dentária ou das pigmentações extrínsecas (CAREY *et al.*, 2014).

O clareamento de dentes vitais é relatado como um tratamento conservador (GRAZIOLI *et al.*, 2017; MARAN *et al.*, 2018) e pode ser realizado no consultório ou em casa, sob a supervisão de um cirurgião-dentista, utilizando uma variedade de agentes ativos em diferentes concentrações comercialmente disponíveis. Existem atualmente duas principais técnicas de clareamento, a caseira e a de consultório

(BERNARDON *et al.*, 2010). O clareamento caseiro é frequentemente realizado com peróxido de carbamida 10% a 16%, o qual é aplicado em uma moldeira individualizada pelo paciente usado diariamente por 1 a 2 horas de 2 a 6 semanas (MEIRELES *et al.*, 2010; BERNARDON *et al.*, 2015). Há estudos mostrando que dentes clareados com a técnica caseira clareiam de modo similar comparada com a técnica de consultório (BERNARDON *et al.*, 2010; BERNARDON *et al.*, 2015). Além disso, por utilizar menor concentração das substâncias ativas, o clareamento caseiro é associado à menor ocorrência de efeitos adversos (como a hipersensibilidade dentinária e irritação gengival) do que o clareamento de consultório (MEIRELES *et al.*, 2008; BERNARDON *et al.*, 2010; MEIRELES *et al.*, 2010).

Portanto, trata-se de um tratamento eficaz com resultados estéticos previsíveis (BERNARDON *et al.*, 2015; GRAZIOLI *et al.*, 2017). Contudo, com a vasta quantidade de clareadores disponíveis, a escolha do produto mais eficiente (maior grau e maior duração de clareamento, com menor ocorrência de efeitos indesejáveis) é considerado difícil pelos clínicos (MEIRELES *et al.*, 2010).

2.1 Avaliação da eficácia do tratamento clareador

A fim de verificar a eficácia do tratamento clareador, clinicamente podem ser realizados dois tipos de análise de cor dos dentes antes e após o clareamento: análise subjetiva (observação e registro de cor com escalas) e análise objetiva (espectrofotômetros).

A análise subjetiva é geralmente realizada comparando-se a cor do terço médio da face vestibular dos dentes do paciente com escalas de cor (Ex: Vita Bleachedguide 3-D Master ou Vita Classical, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha), ordenadas e numeradas sequencialmente da cor mais clara para a cor mais escura (GEUS *et al.*, 2015a). Assim, o avaliador registra a unidade da escala de cor antes e subtrai da medida de cor após o tratamento para determinar o grau de branqueamento em Δ SGU (Shade guide units) (BERNARDON *et al.*, 2016; GEUS *et al.*, 2015a; GEUS *et al.*, 2015b; MEIRELES *et al.*, 2010). Há grande influência da luminosidade do ambiente e do olho do operador na análise subjetiva, por isso, recomenda-se analisar a cor dos dentes com luz natural sempre no mesmo horário (preferencialmente a tarde) ou em condições de luminosidade controlada (padronizada). Além disso, a análise realizada por mais de um avaliador e a sua calibração são aspectos importantes. A análise subjetiva de diferença de cor detectada pelo avaliador pode ser mais facilmente comparada com a percepção de alteração de cor do próprio paciente, o que impacta na sua satisfação com o tratamento (BERNARDON *et al.*, 2010).

A análise objetiva de diferença de cor pode ser realizada em pontos distintos da estrutura dentária (terço incisal, médio e cervical por exemplo), porém para avaliação de cor de forma padronizada, recomenda-se o uso do terço médio (ADA., 2006). Para padronizar o local de mensuração de cor antes e depois do clareamento, uma guia de silicone com perfurações para encaixe da ponta do equipamento (espectrofotômetro) pode ser utilizada. Essa análise pode ser efetuada com espectrofotômetros digitais (Ex.: Vita Easyshade, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha) (BERNARDON *et al.*, 2010; MEIRELES *et al.*,

2010; GEUS *et al.*, 2015b), colorímetros (ShadeVision, X-Rite, Grandville, MI) espectralradiômetros (SP-SpectraScan, Chatsworth, CA, EUA) (PECHO *et al.*, 2016a; PEREZ *et al.*, 2016) além da análise digital de imagem (Clear Match, Clarity Dental, SL, UT), (CHU *et al.*, 2010). Os feixes de luz são incididos na superfície dentária, a sua reflexão é captada pelo equipamento que converte a informação em coordenadas de cor CIELAB (PEREZ *et al.*, 2019a).

O espaço de cor CIELAB é o espaço de cor uniforme mais frequentemente utilizado para avaliação de cor em pesquisas clínicas e laboratoriais. O espaço baseia-se em três coordenadas de cores o L* que representa a luminosidade, o a* representando o eixo vermelho (positivo) e verde (negativo) e o b* sendo o eixo amarelo (positivo) e azul (negativo) (CIE, 2004).

Para avaliar a diferença de cor entre dois objetos ou no mesmo objeto, entre diferentes tempos e após um tratamento a diferença de cor CIELAB (ΔE^*_{ab}) foi desenvolvida (CIE, 2004). Nesta métrica de cor quanto maior o valor, maior e mais perceptível esta diferença de cor ao olho humano (PECHO *et al.*, 2016a).

Utilizando ΔE^*_{ab} atribui-se igual peso para as três coordenadas de cor (L*, a* e b*) e existe divergência com a percepção dos observadores quanto às diferentes coordenadas de cor (PEREZ. *et al.*, 2011; PECHO *et al.*, 2016b; DA SILVA *et al.*, 2017). Correções no cálculo da diferença entre a cor computada e cor percebida foram realizadas, desenvolvendo-se a métrica de diferença de cor CIEDE2000 (ΔE_{00}) (LUO *et al.*, 2001; CIE, 2004). A diferença de cor CIEDE2000 baseia-se nos conceitos de croma e matiz e está sendo utilizado em estudos recentes de comparação da diferença de cor em odontologia (LAGO *et al.*, 2016; PECHO *et al.*,

2016, DA SILVA *et al.*, 2017; DELLA BONA *et al.*, 2019; PEREZ *et al.*, 2019a), pois foi demonstrado que representa uma melhor concordância com avaliação subjetiva de cor, quando comparada com ΔE^*_{ab} . (GHINEA *et al.*, 2010; PARAVINA *et al.*, 2015; PECHO *et al.*, 2016a; PECHO *et al.*, 2017; PEREZ *et al.*, 2019a).

A fórmula de alteração de cor ΔE^*_{ab} , é a mais utilizada para comparar resultados de técnicas clareadoras (BERNARDON *et al.*, 2010; MEIRELES *et al.*, 2010; GEUS *et al.*, 2015b), avaliar o efeito de diferentes concentrações de agentes clareadores, estabilidade de cor após o término do clareamento (MEIRELES *et al.*, 2008; MEIRELES *et al.*, 2010) e tempo necessário de tratamento para satisfação do paciente (BERNARDON *et al.*, 2015). Estudos laboratoriais mais recentes têm utilizado uma nova fórmula para verificação de alteração de cor, ΔE_{00} quando resinas compostas são submetidas ao tratamento clareador (LAGO *et al.*, 2017; DELLA BONA *et al.*, 2019; PECHO *et al.*, 2019) e estabilidade de cor de materiais resinosos após fotoativação e imersão em bebidas contendo corantes (DA SILVA *et al.*, 2017).

O “nível de branco” de um material, é adequadamente retratado por meio de índices de brancura (PEREZ *et al.*, 2019b), já que a mensuração correta do procedimento clareador, tem importância para pesquisa, fabricação de materiais odontológicos e prática clínica como o monitoramento deste tratamento (PEREZ *et al.*, 2016). Recentemente, foi desenvolvido um Índice de Brancura para Odontologia (WI_D), baseado no espaço de cor CIELAB. Valores maiores deste índice (WI_D) indicam amostras brancas e valores menores, amostras escuras (PEREZ *et al.*, 2016).

Considerando a aplicação da avaliação de cor na prática clínica, a comparação entre avaliação objetiva e subjetiva é importante de ser realizada (JOINER *et al.*, 2017). Com esse intuito, os limiares de perceptibilidade (PT- *perceptibility threshold*) e aceitabilidade (AT- *acceptability threshold*) das diferenças de cor e brancura foram desenvolvidos (PARAVINA *et al.*, 2015; PEREZ *et al.*, 2019). Valores de diferença de cor abaixo do PT indicam diferenças de cor não perceptíveis pelo olho humano. Valores entre PT e AT indicam diferenças de cor perceptíveis, porém aceitáveis. Valores acima do AT indicam diferenças de cor não aceitáveis. Estes limiares podem servir como uma ferramenta de controle de qualidade, guiando a seleção de materiais odontológicos, avaliando sua performance clínica e interpretando conclusões visuais e instrumentais na clínica e pesquisa odontológica, subsequente padronização e verificando também a efetividade do tratamento clareador (GHINEA *et al.*, 2010; PARAVINA *et al.*, 2015; PEREZ *et al.*, 2019b).

Apenas diferenças de cores perceptíveis se referem à menor diferença de cor, que pode ser detectada por observadores humanos. Uma diferença de cor notada por 50% dos observadores, corresponde ao 50:50% limiar de perceptibilidade (PT), enquanto uma diferença de cor aceitável para 50% dos observadores, corresponde ao 50:50% limiar de aceitabilidade (PEREZ *et al.*, 2019a). Estes limiares apresentam diferenças dependendo dos grupos de observadores (dentistas, estudantes de odontologia, auxiliares odontológicos, técnicos odontológicos e pessoas leigas), da fórmula de alteração de cor utilizada, CIELAB, CIEDE2000, assim como para o Índice de Brancura para Odontologia WI_D (PARAVINA *et al.*, 2015; PEREZ *et al.*, 2019b).

2.2 Efeito do tabagismo na eficácia do clareamento

O tabagismo e o consumo de bebidas e alimento corantes tem o potencial de alterar as propriedades de materiais dentários (MAHROSS *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2017) e promover descoloração dentária, reduzindo a eficácia e o tempo de efeito do clareamento (GEUS *et al.*, 2015b). Entretanto, até o momento, não existe evidência suficiente que sustente que essas substâncias causam significativa mudança de cor e interferência no resultado do clareamento dental (GEUS *et al.*, 2015a; GEUS *et al.*, 2015b; GEUS *et al.*, 2015c; MATIS *et al.*, 2015). O tabagismo é prejudicial à saúde geral e bucal dos pacientes, contudo este hábito é ainda bastante presente na população. Dentre os vários componentes do cigarro (nicotina, monóxido e dióxido carbono, açúcar, alcatrão e cacau; amônia, níquel, arsênio, e metais pesados entre eles chumbo e cádmio) alguns tem potencial para impregnar na estrutura dentária e produzir descoloração (escurecimento) dentário, podendo interferir no resultado do tratamento clareador (NERSESYAN *et al.*, 2011; ALENDIA-ROMAN *et al.*, 2013; GEUS *et al.*, 2015; GEUS *et al.*, 2018). Colorações amarelas, marrons, marrom escura ou até mesmo preta são provocadas pelo tabaco e a severidade depende parcialmente da duração e frequência do hábito (ALKHATIB *et al.*, 2005). A quantidade de cigarros consumidos por dia (leve – consumo esporádico <1; moderado - 1 a 14, e pesado - >15 cigarros por dia) pode ter impacto no grau de escurecimento dos dentes (KNUTSSON *et al.*, 2017). Em um estudo, uma maior porcentagem (28%) dos fumantes relatou apresentar níveis severos

e moderados de descolorações dentárias em relação aos não fumantes (15%) (ALKHATIB *et al.*, 2005).

Nos estudos de GEUS *et al.*, 2015a e GEUS *et al.*, 2015c, fumantes apresentaram resultado de clareamento com PC 10% semelhante à não-fumantes. Contudo, um ano após o término do tratamento os tabagistas apresentaram escurecimento dental na aferição de cor antes da profilaxia (GEUS *et al.*, 2015b). Além disso, pesquisadores relataram que a fumaça do cigarro pode alterar a cor, a microdureza, e aumentar a rugosidade de superfície de resinas compostas e materiais a base de resina utilizados em próteses odontológicas (MAHROSS *et al.*, 2015). Algumas manchas extrínsecas derivadas da dieta ou substâncias corantes podem ser adequadamente removidas por escovação ou profilaxia profissional (TEREZHALMY *et al.*, 2008). Na persistência de descoloração ou escurecimento dental após o emprego dessas técnicas, o clareamento dental pode ser empregado, pois provou ser eficaz na redução de manchas causadas pela fumaça do cigarro e café, (BAZZI *et al.*, 2012).

2.3 Avaliação de genotoxicidade

Genotoxicidade é a capacidade de um agente físico ou químico interagir com o material genético (RIBEIRO *et al.*, 2017). Tal evento pode ser estudado através de células da mucosa oral, oportunizando o estudo da capacidade regenerativa do tecido epitelial em humanos (THOMAS *et al.*, 2009).

Micronúcleos (MN) são induzidos em células esfoliadas orais por uma variedade de substâncias, incluindo agentes genotóxicos e compostos carcinogênicos do tabaco, noz de betel e álcool. A indução de células com

MN através de agentes carcinógenos e mutagênicos é sinal de efeito genotóxico de tais substâncias. Os MN podem também ser encontrados em células bucais esfoliadas de pessoas expostas a solventes orgânicos, agentes antineoplásicos, derivados do diesel, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, tintas e solventes contendo chumbo e água potável contaminada com arsênico. A quantidade considerada normal de MN na mucosa oral está entre 0,5 e 2,0/1000 células (BANSAL *et al.*, 2012; GEUS *et al.*, 2015a).

A técnica de contagem de MN é amplamente utilizada em estudos de epidemiologia molecular para investigar o impacto da nutrição, fatores relacionados ao estilo de vida, exposições a genotoxinas e genótipo sobre danos ao DNA e morte celular (THOMAS *et al.*, 2009). Possibilita verificar alterações no DNA causadas pela exposição do indivíduo a algum agente químico, sendo que atualmente vários agentes químicos são considerados genotóxicos na literatura científica (CÔRREA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2017). O teste de MN é considerado uma ferramenta rápida, de baixo custo, não invasiva e indolor. Os MN em maior número mostram a exposição de indivíduos a carcinógenos e advêm de quebras nos cromossomos, podendo indicar o início de uma neoplasia (REZENDE *et al.*, 2016). O ensaio de MN através da coleta de células da cavidade oral foi proposto inicialmente em 1983 e continuou ganhando popularidade como biomarcador de dano genético em várias aplicações (HOLLAND *et al.*, 2008).

Este ensaio (MN) em um tecido de divisão celular rápida como a mucosa oral, não necessita do passo de replicação celular, e por ser minimamente invasivo, pode ser usado sem o estabelecimento de uma cultura celular, técnica que é geralmente associada à análises de metáfases

clássicas e também de intérfases, como no método do bloqueio da citocinese em linfócitos binucleados (BONASSI *et al.*, 2011).

O método de coleta de células esfoliadas da mucosa oral é um ensaio considerado adequado para estudos de biomonitoramento. Outra vantagem seria a especificidade para detectar os efeitos agudos recentes ou exposições crônicas quando um agente genotóxico é inalado ou ingerido, além da facilidade em armazenar as amostras antes e após processamento, em uma solução fixadora ou em uma lâmina fixada a temperatura ambiente (HOLLAND *et al.*, 2008) Ainda, a forte correlação da alta frequência de MN em células bucais esfoliadas junto com o aumento da frequência de MN em linfócitos implica que a) efeitos genotóxicos sistêmicos podem também impactar e serem detectáveis em células bucais, b) descobertas sobre exposição e variáveis genéticas afetam a frequência de MN em linfócitos, e podem também serem aplicadas em algum grau das células orais, assim como a associação de micronúcleos com risco de câncer (BONASSI *et al.*, 2011). Consoante há de se dar maior ênfase a mecanismos capazes de detectar atividade genotóxica em seres humanos, como é o caso dos marcadores biológicos ou MN, haja vista serem sensíveis às interações do material genético com as substâncias químicas e permitirem a constatação da exposição a carcinógenos.

Os MN apresentam material resultante dos eventos clastogênicos ou aneugênicos, devido à perda de material genético durante a mitose, condição prévia à neoplasia histopatológica (GEUS *et al.*, 2015a). Quando ocorre a divisão celular na camada basal da mucosa, alterações na molécula de DNA, levam à formação de MN, definidos como cromossomos acêntricos, cromátides fragmentadas ou cromossomos

inteiros que não se incorporaram no núcleo principal durante a mitose (GEUS *et al.*, 2015a). Micronúcleos são corpos citoplasmáticos extranucleares associados a alterações cariotípicas (BANSAL *et al.*, 2012), presentes no citoplasma de células em divisão (CÔRREA *et al.*, 2009), caracterizados por possuírem um terço do diâmetro e textura semelhante do núcleo principal (GEUS *et al.*, 2015a).

Dependendo da extensão do dano celular, as consequências podem ser prejuízos ao ciclo celular e morte celular (ALMEIDA *et al.*, 2015). Assim, os autores consideraram ser o teste de MN uma técnica eficiente de pesquisa quanto à genotoxicidade, pois os agentes químicos podem promover rupturas cromossômicas (BORTOLUZZI *et al.*, 2014), como deleções e translocações, prenúncio de uma possível neoplasia maligna.

Dentre os meios de monitoramento por parâmetros biológicos, o ensaio de MN é o mais viável para a detecção a curto prazo, dos efeitos nocivos causados à população por agentes agressores, pois permite identificar alterações causadas ao material genético de forma precoce, indicando a possibilidade de que os indivíduos venham a desenvolver a longo prazo, problemas de saúde (CÔRREA *et al.*, 2009). A utilização da técnica de MN em células esfoliadas da mucosa oral, se presta não somente à constatação de alterações metanucleares, mas também como instrumento de prevenção de alterações malignas ainda não evidentes. Isto decorre do fato de que os MN surgem de duas a três semanas depois do dano provocado pelo agente agressor, mas antes de qualquer alteração cancerígena ou mesmo histológica (BONASSI *et al.*, 2011).

É imperiosa uma contagem de MN seguindo parâmetros corretos, do contrário chegando-se a resultados equivocados. Estudos demonstram uma grande diversidade no número de MN encontrados em colheitas

realizadas aleatoriamente em pacientes. A contagem destes é comumente realizada em microscópio fotônico (GEUS *et al.*, 2015a). Há um aumento na frequência de micronúcleos em fumantes que usam mais de quarenta cigarros por dia, assim como há uma diminuição em pessoas que consomem frutas e vegetais verdes diariamente (BONASSI *et al.*, 2011).

Para análise de micronúcleos da cavidade bucal, podem ser utilizadas a coleta de células da mucosa oral ou da borda lateral da língua, pois se tratam de tecidos em processo constante no DNA de divisão celular. Após passarem por um processo de esfoliação, as células não sofrem mais divisão, mas refletem as anormalidades citogenéticas que ocorreram na camada basal (ANGLIERI *et al.*, 2010).

Além dos MN são avaliadas também outras anomalias nucleares, como botões nucleares, indicando amplificação de gene, células binucleadas, causadas devido falhas de citocinese, além de várias formas de morte celular consideradas como cromatina condensada, cariorrexe, núcleo picnótico ou cariólise celular, assim como a frequência de células basais e totalmente diferenciadas (BONASSI *et al.*, 2011).

2.4 Genotoxicidade dos agentes clareadores

As células eucarióticas são responsáveis por reparar injúrias ao ácido desoxirribonucleico (DNA), porém quando não ocorre um efetivo reparo após resposta celular, pode haver formação de uma lesão permanente chamada de mutagenicidade. Existe atualmente na Odontologia uma grande quantidade de materiais; dentre eles, muitos apresentam potencial genotóxico, como: agentes clareadores, resinas compostas e clorexidina. Os clareadores são capazes de causar danos genéticos, pois contêm

peróxido de hidrogênio, causando potente oxidação nas células eucarióticas (RIBEIRO *et al.*, 2017).

Podem ser encontrados dentifrícios com presença de clareadores (CONSOLARO *et al.*, 2011), os quais também apresentaram genotoxicidade em células da gengiva humana. Assim, Ribeiro *et al.* (2017) afirmam que futuras pesquisas *in vivo* quanto ao potencial de genotoxicidade dos materiais dentários devem ser conduzidas, com a finalidade de esclarecer os riscos à saúde humana do profissional e paciente.

Com relação à segurança de um tratamento clareador, existem pesquisas que relatam efeitos colaterais, como por exemplo a desmineralização do esmalte e a descamação do tecido epitelial da mucosa oral. Podem ser observados também uma redução na microdureza, alteração da superfície, aumento da rugosidade superficial do esmalte, queimação, efeitos co-carcinogênicos e ulcerações quando se faz o uso de altas concentrações de peróxido de hidrogênio ou carbamida (MONDELLI *et al.*, 2015; GRAZIOLI *et al.*, 2018).

Dentre as principais consequências indesejáveis do clareamento, relacionadas aos tecidos moles, podem-se citar: a necrose, causada pelo potencial cáustico do peróxido de hidrogênio e a co-carcinogenicidade que desenvolvem os efeitos iniciais provocados por outras substâncias com potencial cancerígeno (CONSOLARO *et al.*, 2011).

As lesões gengivais são principalmente causadas por aplicações descontroladas de géis clareadores. Assim, para evitar irritações na gengiva decorrentes da técnica clareadora de consultório, é imprescindível o uso de moldeiras bem adaptadas. (GOLDBERG 2010). Estudos mostram que o oxigênio reativo tem potencial genotóxico. Nesse sentido,

tem sido afirmado que, apesar da Agência de Pesquisa de Dados sobre o Câncer não relatar nenhum risco de câncer devido à exposição profissional ao peróxido de hidrogênio, foi detectado em modelos animais o adenoma e carcinoma do duodeno após a administração de peróxido de hidrogênio via oral (GOLDBERG 2010). Sabe-se que a quantidade de micronúcleos indica a presença de lesões cancerígenas, o clareamento de consultório com peróxido de hidrogênio a 35% não induz danos ao DNA, assim como não pode ser considerado responsável por causar câncer cutâneo; porém, seu uso excessivo pode levar à hiperqueratose, hiperplasia e displasia (GOLDBERG 2010; REZENDE *et al.*, 2016).

Assim, o efeito genotóxico do agente clareador nos tecidos moles em humanos necessita de maior investigação, já que até o momento somente estudos em modelos *in vitro* e animais comprovaram tal efeito (GOLDBERG 2010; REZENDE *et al.*, 2016). Além de que a maioria dos estudos experimentais relacionados à genotoxicidade são feitos de forma artificial, pois envolvem graus elevados de exposição não apresentando relevância em uma potencial exposição em humanos, que utilizam baixas concentrações de produtos clareadores (ALMEIDA *et al.*, 2015).

2.5 Efeito do tabagismo na genotoxicidade após clareamento

O consumo de álcool e tabaco é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de câncer oral, além de que indivíduos tabagistas e consumidores de álcool concomitante, apresentaram aumento na taxa de prevalência de cânceres em estágios mais avançados (RIVEIRA 2015; BEZERRA *et al.*, 2018).

É verídico que fumantes e usuários de tabaco sem fumaça, os quais mastigam o tabaco, possuem maior prevalência de desenvolver câncer na cavidade oral, sendo que quantidade de micronúcleos em usuários de tabaco sem fumaça é maior que a de fumantes de cigarro (BANSAL *et al.*, 2012). Relata-se que indivíduos tabagistas apresentam um potencial três vezes maior de desenvolver este câncer na cavidade oral em comparação àqueles que não possuem este hábito e ainda a forma de consumo do tabaco, assim como o tipo e a quantidade de cigarros podem estar fortemente associados com este potencial (NERSESYAN *et al.*, 2011; BANSAL *et al.*, 2012; RIVERA 2015).

O tratamento clareador apresenta como um de seus efeitos colaterais a irritação de tecidos moles (GOLDBERG *et al.*, 2010; BERNARDON *et al.*, 2016), condição agravada pelo uso descontrolado de géis clareadores e moldeiras mal adaptadas (CONSOLARO *et al.*, 2011; KIRSTEN *et al.*, 2012). Os radicais livres liberados pela decomposição do peróxido entram em contato com a gengiva e mucosa, provocando queimações e ulcerações (GOLDBERG 2010; REZENDE *et al.*, 2016). Klaric *et al* (2013), concluíram em um estudo clínico que o clareamento de consultório, no qual são utilizadas concentrações maiores de peróxido de hidrogênio, foi considerado genotóxico, diferente daqueles resultados onde foram utilizados peróxido de carbamida para clareamento dental caseiro (ALMEIDA *et al.*, 2015; BONACINA *et al.*, 2020), no entanto os efeitos deste agente na mucosa oral são controversos dependendo da técnica que foi empregada (GOLDBERG 2010).

Um estudo realizado por SILVA *et al.* (2018) mostrou que pacientes fumantes apresentaram maior prevalência no desejo de realizar tratamento

clareador, sendo considerados principais candidatos para cirurgiões-dentistas efetuarem este procedimento (GEUS *et al.*, 2015a). Porém a maioria de estudos clínicos onde se realiza clareamento dental excluem pacientes fumantes (MEIRELES *et al.*, 2008; MEIRELES *et al.*, 2010, LA PEÑA *et al.*, 2013; BERNARDON *et al.*, 2015; MARAN *et al.*, 2018) provavelmente, por acreditarem que a associação entre fumo e clareamento possa trazer prejuízos à saúde destes indivíduos.

Os pacientes fumantes, geralmente apresentam um número maior de MN em relação aos não-fumantes (GEUS *et al.*, 2015a). Quando indivíduos tabagistas foram submetidos ao tratamento clareador caseiro com PC 10%, estes não apresentaram marcadores para genotoxicidade significantemente maiores que os não tabagistas, mostrando haver uma segurança para o DNA, das células da gengiva no uso deste produto por 3 horas diárias, durante 3 semanas (GEUS *et al.*, 2015a).

3.PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

Avaliar o efeito do tabagismo na alteração de cor e brancura, além da genotoxicidade das células orais após clareamento dental caseiro

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a alteração de brancura ($\Delta W I_D$) e de cor (ΔE^*_{ab} e ΔE_{00}), dentária em pacientes fumantes e não fumantes após clareamento dental caseiro testando a hipótese de que o resultado do clareamento dentário será semelhante entre os grupos.

- Avaliar o efeito do tabagismo, na genotoxicidade das células da mucosa oral de pacientes após realizarem clareamento dental caseiro com peróxido de carbamida a 22%, testando a hipótese de que a frequência de alterações celulares (MN e AM) será semelhante entre os grupos durante os tempos avaliados.

CAPÍTULO 1-INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA ALTERAÇÃO DE COR APÓS CLAREAMENTO DENTAL CASEIRO COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA 22 %: ESTUDO DE COORTE

Resumo

OBJETIVOS: Avaliar o efeito do tabagismo na alteração de cor e brancura dentária após clareamento caseiro. **METODOLOGIA:** Este estudo de coorte avaliou 2 grupos (n=40) de pacientes: NF- não fumantes (n=24) e; F- fumantes (n=16). Os grupos executaram clareamento caseiro com peróxido de carbamida (PC) a 22%, por 1 hora ao dia, durante 14 dias. As análises de cor foram realizadas antes do clareamento (T0-*baseline*), um dia (T15), 15 dias (T30) e 1 mês (T45) após seu término. As coordenadas de cor foram avaliadas por espectrofotômetro Vita Easyshade™. O índice de brancura (WID- *Whiteness Index for Dentistry*) foi utilizado para avaliação da eficácia do clareamento. As diferenças de cor para F e NF entre os diferentes tempos foram calculadas com as equações CIELAB (ΔE^*_{ab}) e CIEDE2000 (ΔE_{00}). As comparações de alteração de cor entre F e NF por grupo dentário (IC - incisivos centrais, IL – incisivos laterais e C- caninos) foram realizadas por Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). **RESULTADOS:** O índice de brancura (WID) inicial (T0) foi igual entre F e NF. NF mostraram maior WID que F nos outros tempos de avaliação ($p<0,05$). NF mostraram diferença significativa de índice de brancura (ΔWID) de IC e C (clareou mais) entre T0 e os demais tempos T15, T30 e T45 em comparação aos F. Em geral, as diferenças de cor detectadas por ΔE^*_{ab} e ΔE_{00} acompanharam o WID. Os F apresentaram maior escurecimento

de IC após clareamento do que NF em ΔWID (T45-T15)($p < 0,05$).

CONCLUSÕES: O tratamento clareador caseiro com PC 22 % pode ser influenciado negativamente pelo tabagismo.

Palavras-chave: Clareamento dental, eficácia, fumantes

Rodrigo Rohenkohl Silva
João Paulo De Carli
Oscar Emilio Pecho
Kauê Faria Collares
Alvaro Della Bona
Paula Benetti

CHAPTER 1-INFLUENCE OF SMOKING ON THE COLOR CHANGE AFTER AT-HOME BLEACHING USING 22% CARBAMIDE PEROXIDE: A COHORT STUDY

Abstract

OBJECTIVES: To evaluate the effect of smoking on the tooth whiteness and color change after at-home bleaching. **METHODOLOGY:** This is a cohort study with 40 patients between 18 and 54 years old, divided into 2 groups (n=40): NF-nonsmokers (n=24) and: F-smokers (n=16). The groups accomplished at-home bleaching with 22% carbamide peroxide (PC) using individuals trays for 1 hour a day, during 14 days. Color analysis were performed before (T0-*baseline*), one day (T15), 15 days (T30) and one month after bleaching. The color coordinates were measured using Vita Easy Shade TM spectrophotometer and recorded. The color differences for F and NF between different times were calculated using CIELAB (ΔE^*_{ab}), CIEDE 2000 (ΔE_{00}) equations. The whitening index (WI_D . Whiteness Index for Dentistry) was used to evaluate the efficacy of bleaching. The color changes comparisons between F and NF in distinct dental groups (IC-Central Incisors, IL- Lateral Incisors and C- Canine) were performed by Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). **RESULTS:** The baseline (T0) whiteness index (WI_D) was similar between F and NF. NF showed higher WI_D than F at other evaluation times (T15, T30, T45) ($p<0.05$). NF showed significant difference in whiteness index (ΔWI_D) for IC and C (lighter) between (T0) and the other times (T15), (T30) and (T45) compared to F. In general, the color differences detected by ΔE^*_{ab}

and ΔE_{00} followed WI_D . The F showed a higher darkening of IC than NF in ΔWI_D in (T45-T15)($p < 0,05$). CONCLUSIONS: At-home bleaching treatment with PC 22% can be affected by smoking.

Keywords: Tooth bleaching, effectiveness, smoking

1.1 INTRODUÇÃO

O tratamento clareador de dentes vitais altera a cor dos dentes naturais para cores mais claras, o que leva ao aumento da satisfação com a estética dental dos pacientes (GEUS *et al.*, 2015a; REZENDE *et al.*, 2016; GRAZIOLI *et al.*, 2017; MARAN *et al.*, 2018). É um tratamento odontológico eficaz e conservador, amplamente utilizado para remoção de descolorações extrínsecas e intrínsecas (MEIRELES *et al.*, 2010; BAZZI *et al.*, 2012; LAGO *et al.*, 2016; GRAZIOLI *et al.*, 2017; MARAN *et al.*, 2018). O clareamento dentário acontece por meio da dissociação do peróxido de hidrogênio ou carbamida em oxigênio reativo, que degrada quimicamente os cromógenos da matriz orgânica da estrutura dentária ou das pigmentações extrínsecas (MEIRELES *et al.*, 2008; BERNARDON *et al.*, 2010; LA PEÑA *et al.*, 2014; CAREY *et al.*, 2014).

Existem duas principais técnicas de clareamento; a caseira e a de consultório (BERNARDON *et al.*, 2010; BERNARDON *et al.*, 2015). O clareamento caseiro é frequentemente realizado com o peróxido de carbamida de 10% a 22%, aplicado em uma moldeira individualizada, por 1 a 2 horas, durante 2 a 6 semanas (BERNARDON *et al.*, 2015). Há estudos mostrando que os dentes clareados pela técnica caseira têm eficácia semelhante à técnica de consultório (BERNARDON *et al.*, 2010; BERNARDON *et al.*, 2015). Além disso, por utilizar menor concentração das substâncias ativas, o clareamento caseiro é associado à menor ocorrência e intensidade de efeitos adversos (como a sensibilidade

dentinária e irritação gengival) do que o clareamento de consultório (MEIRELLES *et al.*, 2008; BERNARDON *et al.*, 2010; MEIRELES *et al.*, 2010).

O clareamento é um tratamento com diferentes técnicas e concentrações de géis com resultado eficaz (GRAZIOLI *et al.*, 2018; BERNARDON *et al.*, 2015). Contudo, a influência do consumo de alimentos e bebidas corantes, assim como o tabagismo na sua eficácia ainda é controversa na literatura (BAZZI *et al.*, 2012; MATIS *et al.*, 2015; TERRY *et al.*, 2014). O tabagismo, embora nocivo à saúde geral e bucal dos usuários, é um hábito bastante presente na população. Pacientes fumantes são frequentemente desestimulados a realizar tratamentos clareadores e excluídos de estudos que avaliam a efetividade deste procedimento (BERNARDON *et al.*, 2010; LA PEÑA *et al.*, 2014; BERNARDON *et al.*, 2015), pois dentre os vários componentes do cigarro (nicotina, monóxido e dióxido de carbono, açúcar, alcatrão, cacau; amônia, níquel, arsênio, e metais pesados entre eles chumbo e cádmio), alguns tem potencial para impregnar na estrutura dentária e produzir descoloração (escurecimento) dentário, podendo interferir no resultado do tratamento clareador (NERSESYAN *et al.*, 2011; ALANDIA-ROMAN *et al.*, 2013; GEUS *et al.*, 2015; GEUS *et al.*, 2018).

Pigmentos amarelos, marrons, marrom escuro ou pretos podem ser depositados com o uso de cigarros, e a severidade do escurecimento depende da duração e frequência do hábito (ALKHATIB *et al.*, 2005). A quantidade de cigarros consumidos por dia (leve – consumo esporádico <1; moderado - 1 a 14, e pesado - >15 cigarros por dia) pode ter impacto no grau de escurecimento dos dentes (KNUTSSON *et al.*, 2017). Contudo, a literatura mostra eficácia do tratamento clareador em fumantes

utilizando peróxido de carbamida 10%, semelhante aos não fumantes, com escurecimento maior para fumantes após 1 ano do fim do tratamento (GEUS *et al.*, 2015a, GEUS *et al.*, 2015b e GEUS *et al.*, 2015c).

A fim de verificar a eficácia clínica do tratamento clareador podem ser realizadas dois tipos de análise de cor: análise subjetiva (observação e registro de cor com escalas) e análise objetiva (espectrofotômetros). A análise subjetiva é comumente efetuada comparando-se a cor do terço médio da face vestibular dos dentes do paciente com escalas de cor (Ex: Vita Bleachedguide 3-D Master ou Vita Classical Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha), ordenadas e numeradas sequencialmente da cor mais clara para a cor mais escura (GEUS *et al.*, 2015a). Assim, o avaliador registra a unidade da escala de cor antes e subtrai da medida de cor após o tratamento para determinar o grau de branqueamento em Δ SGU (Shade guide units) (BERNARDON *et al.*, 2016; GEUS *et al.*, 2015a; GEUS *et al.*, 2015b; MEIRELES *et al.*, 2010). Há grande influência da luminosidade do ambiente e do olho e calibração do observador na análise subjetiva (BERNARDON *et al.*, 2010).

A análise objetiva da diferença de cor é realizada com a utilização de espectrofotômetros digitais (Ex.: Vita Easyshade, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha), colorímetros, e espectralradiômetros (MEIRELES *et al.*, 2010; PEREZ *et al.*, 2019a). Nos espectrofotômetros, feixes de luz são incididos na superfície dentária, a sua reflexão é captada pelo equipamento que converte a informação em coordenadas de cor, o que permite cálculo da diferença de brancura Δ WI_D-Whiteness Index for Dentistry) e de alteração de cor (ΔE^*_{ab} - CIELAB e ΔE_{00} - CIEDE 2000) (PECHO *et al.*, 2016a, PEREZ *et al.*, 2019a).

O espaço de cor CIELAB é o espaço de cor uniforme mais frequentemente utilizado para avaliação da cor em pesquisas clínicas e laboratoriais (MEIRELES *et al.*, 2010; BERNARDON *et al.*, 2010). Baseia-se em três coordenadas de cores o L* que representa a luminosidade, o a* representando o eixo vermelho (positivo) e verde (negativo) e o b* sendo o eixo amarelo (positivo) e azul (negativo) (CIE,2004). Nesta métrica de cor, quanto maior o valor, maior e mais perceptível esta diferença ao olho humano (PECHO *et al.*, 2016a).

A métrica de diferença de cor ΔE^*_{ab} atribui igual peso para as três coordenadas de cor (L*, a* e b*), havendo divergência com a percepção dos observadores quanto às diferentes coordenadas de cor (PEREZ *et al.* 2011; PECHO *et al.*, 2016a; DA SILVA *et al.*, 2017). Correções no cálculo da diferença entre a cor computada e cor percebida foram realizadas, desenvolvendo-se a métrica de diferença de cor CIEDE2000 ΔE_{00} . A diferença de cor ΔE_{00} baseia-se nos conceitos de croma e matiz, e está sendo utilizada em estudos recentes de comparação da diferença de cor em odontologia (LAGO *et al.*, 2016; PECHO *et al.*, 2016a, DA SILVA *et al.*, 2017; DELLA BONA *et al.*, 2019; PEREZ *et al.*, 2019a).

Atualmente, podemos contar com um Índice de Brancura para Odontologia (WI_D), baseado no espaço de cor CIELAB (PEREZ *et al.*, 2016), apesar desta fórmula de cor caracterizar bem a sua aparência do clareamento, correlaciona-se insuficientemente com a avaliação visual, falhando com frequência na avaliação de espécimes brancos (PEREZ *et al.*, 2019a). A vantagem deste índice (WI_D) é que valores maiores indicam amostras brancas e valores menores, amostras escuras (PEREZ *et al.*, 2016). O “nível de branco” de um material, é adequadamente retratado por meio de índices de brancura (PEREZ *et al.*, 2019b), já que uma

mensuração correta do procedimento clareador tem importância para pesquisa, fabricação de materiais odontológicos e prática clínica como o monitoramento deste tratamento (PEREZ *et al.*, 2016). Até o momento, o WI_D não foi utilizado em estudos com pacientes, mostrando a importância da sua aplicação clínica (PEREZ *et al.*, 2016, DA SILVA *et al.*, 2018; DELLA BONA *et al.*, 2019; PECHO *et al.*, 2019).

Além disso, considerando a aplicação da avaliação de cor na prática clínica, a comparação entre avaliação por instrumento (objetiva, por CIELAB, CIEDE2000 e WI_D) e por observação pelo olho humano (subjetiva) é importante (JOINER *et al.*, 2017). O limiar de aceitabilidade de alteração de cor (AT- *acceptability threshold*), foi desenvolvido com intuito de comparar essas avaliações na prática clínica, servindo como uma ferramenta de controle de qualidade, devido aumento na demanda estética, tanto por pacientes quanto por profissionais (PARAVINA *et al.*, 2015; JOINER *et al.*, 2017; PEREZ *et al.*, 2019b).

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do tabagismo na mudança de cor após clareamento dental caseiro com peróxido de carbamida a 22 %, utilizando diferentes métricas de cor e um Índice de Brancura para Odontologia, testando a hipótese de que não há diferença no resultado do clareamento entre fumantes e não fumantes.

1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2.1 *Design* do estudo e aspectos éticos

Este é um estudo do analítico observacional prospectivo do tipo coorte. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade de Passo Fundo (CEP/UPF), com parecer número 3.095.118 (ANEXO 1). A pesquisa foi registrada na plataforma REBEC (2x2czx). Os voluntários foram esclarecidos sobre o estudo e, aqueles que autorizaram sua participação, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1-TCLE).

Os riscos foram considerados mínimos. O paciente poderia sentir um pouco de desconforto, como sensibilidade ou irritação gengival durante o clareamento dentário. No caso de sensibilidade intensa, foi oferecido tratamento com dessensibilizante (Dessensibilize KF 2%, FGM, Joinville, SC, Brasil) pelos pesquisadores. Os participantes teriam os seguintes benefícios: dentes mais claros e diagnóstico de células gengivais saudáveis ou alteradas. Foi garantida assistência integral e gratuita pelo tempo que fosse necessário, nos casos de danos que ocorressem direta ou indiretamente da participação no estudo.

1.2.2 Seleção da amostra

O tamanho da amostra foi calculado baseado em um estudo prévio (GEUS *et al.*, 2015b) para um poder de 90% e um nível de significância de 5%. Assim, seria necessário um n amostral de 24 indivíduos em cada grupo (fumantes e não fumantes). Ainda foram acrescentados 25% para perdas e recusas, obtendo-se um total de 30 pacientes por grupo: NF (pacientes não fumantes; n=30) e F (pacientes fumantes; n= 30).

A estratégia de busca pelos voluntários foi realizada pela divulgação em rádio e colocação de cartazes no *Campus* I da UPF, convite verbal em salas de aula e Central de Informação da Universidade de Passo Fundo. O e-mail e telefone do responsável pela pesquisa e da Secretaria de Pós-Graduação em Odontologia foram disponibilizados para que os voluntários entrassem em contato.

Aceitando o convite para participar da pesquisa, consultas foram agendadas e efetuadas na Clínica de Pós-Graduação da FO-UPF. Anamnese e exame clínico (APÊNDICE 2) foram realizadas. Profilaxia com escova Robinson, pasta dental e água foi realizada para remoção de detritos e manchas extrínsecas, os voluntários foram analisados quanto aos critérios de inclusão e exclusão do estudo.

1.2.3 Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de inclusão do estudo:

- não fumante ou fumante de pelo menos 5 cigarros por dia há mais de 1 ano (KNUTSSON *et al.*, 2017);
- idade entre 18 e 54 anos (GEUS *et al.*, 2015c);
- presença dos seis dentes ântero-superiores hígidos com coloração A2 ou mais escuro avaliados por meio da escala de cor Vita Clássica;

Critérios de exclusão:

- ter realizado tratamento clareador prévio há menos de 6 anos;
- presença de restaurações ou perda de vitalidade pulpar em algum dos 6 dentes anteriores;
- presença de aparelho ortodôntico fixo – brackets;
- presença de comorbidades - problemas cardíacos, hipertensão ou diabetes descompensado;
- presença de cárie ativa ou doença periodontal;
- impossibilidade de comparecer às consultas em todos os períodos de avaliação (antes, 1 dia, 15 dias e 1 mês após o término do clareamento);
- gravidez ou lactação;
- presença de hábitos parafuncionais (bruxismo ou apertamento comprovado) (FIRMANI *et al.*,2015);
- lesões cervicais cariosas ou não (erosão, abrasão ou atrição) nos dentes a serem clareados;
- sensibilidade dentinária relatada e provocada por jatos de ar (seringa tríplice);
- alterações patológicas dos dentes que tenham provocado alteração na cor de algum dos seis elementos ântero-superiores ou inferiores (ex.: amelogenese imperfeita; pigmentação dentária por tetraciclina; tratamento endodôntico).
- presença de lesões cancerizáveis ou neoplasias malignas na cavidade oral
- uso de medicamento sistêmico/tópico com potencial de pigmentação dentária.

1.2.4 Procedimento clareador

Para o clareamento dental caseiro, moldagens das arcadas superior e inferior foram efetuadas com Alginato (Avagel®; Dentsply, Milford, DE, EUA) e moldeiras de estoque (Maquira®, Maringá, PR, Brasil). Os moldes foram preenchidos com gesso pedra, tipo III (Asfer®; São Caetano do Sul, SP, Brasil) para obtenção de modelos, as moldeiras foram confeccionadas sem reservatórios (KIRSTEN *et al.*, 2009; MEIRELES *et al.*, 2010; MARAN *et al.*, 2018) para ambas arcadas com placas de 1mm de espessura de EVA (FGM®, Joinville, SC, Brasil), com auxílio de plastificadora (Bio Art ®; São Carlos, SP, Brasil) com objetivo de segurar o gel durante o uso, e posteriormente cortadas a 1mm acima da margem gengival (BERNARDON *et al.*, 2010). As moldeiras foram entregues aos voluntários em (T0), juntamente com duas seringas contendo gel de peróxido de carbamida em concentração de 22% (Whiteness Perfect ®, FGM, Joinville, SC, Brasil). Instruções quanto ao uso do gel clareador foram demonstradas e entregues por escrito (APÊNDICE 3). O protocolo de clareamento seguiu as recomendações do fabricante do produto, padronizando-se o tempo de uso diário do clareador em 1h ao dia, por 14 dias.

1.2.5 Avaliação de cor

Previamente à avaliação de cor, efetuou-se profilaxia com escova Robinson (Preven, Guapirama, PR, Brasil) e pasta dental (Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), nos seis dentes anteriores superiores. A avaliação objetiva de cor foi realizada por um único

operador utilizando um espectrofotômetro digital, Vita Easy Shade (Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemanha), nos diferentes tempos de avaliação (T0-*baseline*), um dia (T15), quinze dias (T30) e um mês após (T45) o término do clareamento. Para padronização do local de análise realizada com o equipamento, guias de silicone (Zetaplus, Zhermack, Badia Polesine, RO, Itália) foram confeccionadas para cada paciente. As guias envolveram a face vestibular e incisal dos seis dentes ântero-superiores, possuindo uma abertura circular de 6mm de diâmetro no terço médio dos dentes, compatível com a ponta ativa do espectrofotômetro. O equipamento foi calibrado anteriormente à avaliação de cada paciente em sistema próprio. Superfície da ponta ativa do equipamento permaneceu paralela e em contato com a superfície vestibular dos dentes durante a avaliação. A cor conforme a escala Vita Clássica e Vita 3D Master foi registrada em tabela do Microsoft Excel, assim como as coordenadas de cor, a serem utilizadas para cálculo WI_D , ΔWI_D , ΔE^*_{ab} e ΔE_{00} .

1.2.6 Avaliação do índice de brancura e das diferenças do índice de brancura

O índice de Brancura para Odontologia (WI_D) é baseado nas coordenadas CIELAB e foi calculado utilizando a Equação 1 (PEREZ *et al.*, 2016). Maiores valores de WI_D (índice de brancura) significam dentes mais claros.

$$WI_D = 0,511L^* - 2,324a^* - 1,100b^* \quad (1)$$

O valor do limiar de aceitabilidade para ΔWI_D (WAT) baseou-se no estudo de Perez *et al.*, (2019b), sendo WAT=2,90 unidades para leigos.

1.2.7 Avaliação das diferenças de cor

ΔE^*_{ab} e ΔE_{00} foram calculados com base nas coordenadas registradas. Os valores de L^* , a^* e b^* (L^* - luminosidade; a^* - eixo verde-vermelho e b^* - eixo amarelo-azul) foram utilizados para calcular ΔE^*_{ab} (CIELAB) pela Equação 2 (CIE,2004).

$$\Delta E_{ab} = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2} \quad (2)$$

A diferença de cor também foi calculada para ΔE_{00} (CIEDE 2000) (Equação 3) (LUO *et al.*, 2001; CIE, 2004).

$$\Delta E_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{K_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C}\right) \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H}\right)} \quad (3)$$

Onde $\Delta L'$ (luminosidade), $\Delta C'$ (croma) e $\Delta H'$ (matiz) são as diferenças de cores em cada parâmetro. As funções ponderadas (S_L , S_C e S_H) ajustam a diferença de cor total para a variação na localização das diferenças de cores das coordenadas L' , a' , b' . Os fatores paramétricos (K_L , K_C e K_H) são fatores de correção para condições experimentais. E a função rotação (R_T) refere-se à interação nas diferenças entre a croma e matiz na região azul (LUO *et al.*, 2001; CIE, 2004).

Para calcular a diferença de cor CIEDE2000, levou-se em conta descontinuidades à computação média do matiz e computação da

diferença do matiz (SHARMA *et al.*, 2005). No presente estudo, os fatores paramétricos $K_L = 1$, $K_C = 1$, e $K_H = 1$ (luminosidade, croma e matiz, respectivamente) foram considerados.

A comparação das diferenças de cores avaliadas foi realizada com 50-50% limiar de aceitabilidade. Os valores dos limiares de aceitabilidade (AT) para ΔE^*_{ab} e ΔE_{00} foram embasados em um estudo de Paravina *et al.* (2015) seguindo ISO/ TR 28642:2016, sendo $AT \Delta^*_{Eab} = 2,7$ unidades e $AT \Delta E_{00} = 1,8$ unidades, respectivamente (PARAVINA *et al.*, 2015).

1.2.8 Diferenças entre tempos de avaliação

Diferentes períodos de avaliação foram considerados para comparar a alteração de cor (ΔE^*_{ab} e ΔE_{00}) e de índice de brancura (ΔWI_D) entre os grupos de fumantes e não fumantes (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Descrição dos períodos de avaliação das diferenças de alteração de cor (ΔE^*_{ab} e ΔE_{00}) e de índice de brancura (ΔWI_D)

Período de avaliação	Descrição
T15 - T0	Diferença entre o momento de finalização e início do tratamento (baseline)
T30 - T0	Diferença de duas semanas após o final e o baseline
T45 - T0	Diferença de um mês após o término do clareamento e o baseline
T30 - T15	Avaliação da estabilidade de resultado após 2 semanas do término do clareamento

1.2.9 Análise estatística dos dados

Análises descritivas foram realizadas. Teste de qui-quadrado e correlação de Pearson foi realizado para detectar diferenças entre as variáveis sócio-demográficas, idade e sexo respectivamente. O teste Shapiro-Wilk, mostrou distribuição não normal dos dados, portanto comparações de ΔWI_D , ΔE^*_{ab} e ΔE_{00} para cada grupamento dentário (IC-Incisivos Centrais, IL-Incisivos Laterais e C-Caninos) em fumantes e não fumantes em diferentes períodos de avaliação, foram realizados pelo teste estatístico Mann-Whitney, considerando ($\alpha=0,05$). O programa STATA 14 ® (Statistes/Data Analysis, College Station, Texas, EUA) foi utilizado para análise estatística.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Amostra

Foram examinados inicialmente 96 voluntários (62 NF e 34 F), de modo a obter 60 participantes. Destes, 30 NF e 6 F foram excluídos por não atender os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Assim a amostra inicial do estudo foi de 32 NF e 28 F.

Durante o período de avaliação (T0, T15, T30 e T45), houve a perda de acompanhamento ou desistência de 8 voluntários do grupo NF e 12 do grupo F. Os participantes desistentes alegaram falta de tempo para comparecer às consultas de retorno ou não responderam às tentativas de contato do grupo de pesquisa. Portanto, a amostra final consistiu em 24NF e 16F (Figura 1.1).

Não houve diferença estatística em idade dos pacientes F e NF, a maioria dos participantes era do sexo feminino para ambos grupos e os participantes fumavam em média 7,6 cigarros ao dia (Tabela 1.2).

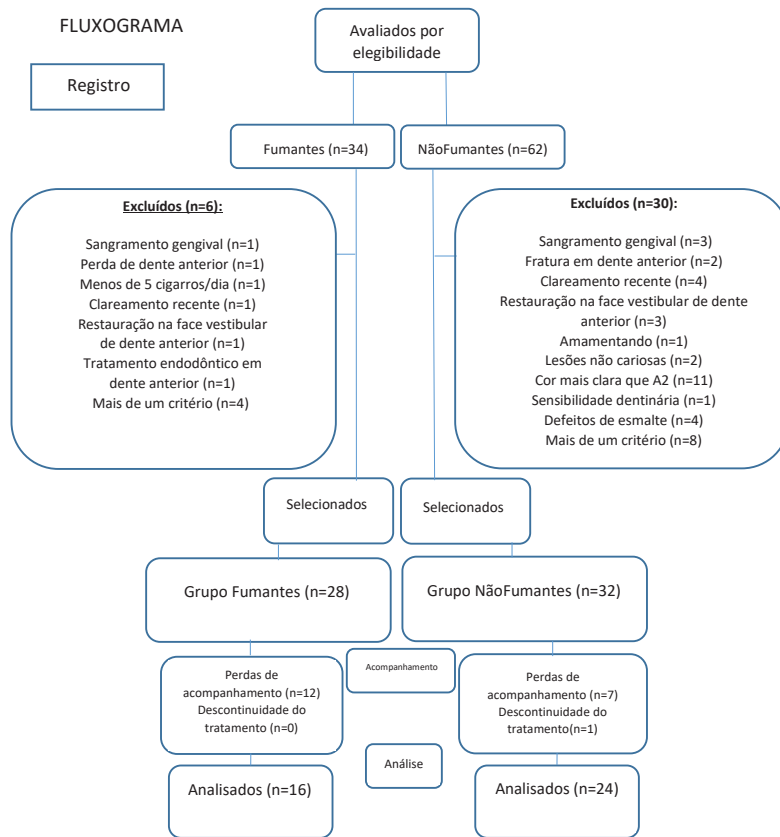


Figura 1.1 Fluxograma do recrutamento e acompanhamento de voluntários da pesquisa.

Tabela 1.2. Caracterização sócio-demográfica dos participantes da pesquisa

Características	Fumantes (N=16)	Não Fumantes (N=24)
Idade (média e desvio padrão)	31,56 (10,55)	23,25 (5,90)
Sexo (feminino)	9 (36%)	16 (64%)
Cigarros por dia (n)	7,6 (5,1)	-

1.3.2 Índice de brancura (ΔWID)

Na Tabela 1.3 é possível observar que o Índice de Brancura (WID) inicial (T0) foi igual entre F e NF, mostrando homogeneidade de brancura entre os grupos antes da realização do tratamento clareador. Após execução do procedimento clareador (T15, T30 e T45), NF mostraram WID significativamente maior que F ($p < 0,05$).

Tabela 1.3 Valores das medianas de WID (Índice de Brancura em Odontologia) entre fumantes e não fumantes para os diferentes grupos de dentes em fumantes e não fumantes nos respectivos tempos de avaliação.

WID	CANINOS					
	Fumantes		Não fumantes		Fumantes	
	Mediana (25%-75%)	Mediana (25%-75%)	Mediana (25%-75%)	Mediana (25%-75%)	Mediana (25%-75%)	Mediana (25%-75%)
T0	13,9 ^a (7,9-21,6)	11,5 ^a (7,8-15,7)	24,7 ^a (20,2-29,0)	26,42 ^a (19,1-30,4)	30,22 ^a (26,2-32,3)	30,29 ^a (26,7-34,0)
T15	24,9 ^a (21,8-28,6)	29,5 ^b (25,0-32,2)	31,3 ^a (29,6-35,2)	34,6 ^b (31,7-37,9)	35,0 ^a (33-36,1)	37,4 ^b (35,6-40,2)
T30	25,3 ^a (21,8-29,3)	30,3 ^b (26,4-33,7)	31,9 ^a (29,3-36,1)	34,7 ^b (32,3-39,1)	35,5 ^a (32,0-36,7)	38 ^b (35,6-40)
T45	25,4 ^a (22,8-29,2)	30,3 ^b (27,5-33,5)	32,2 ^a (28,8-35,3)	34,7 ^b (32,0-37,8)	34,4 ^a (33,0-36,3)	38,5 ^b (36,1-40,5)

*Letras diferentes na mesma linha e no mesmo grupo de dentes correspondem às diferenças estatisticamente significativas entre fumantes e não fumantes em um mesmo período de avaliação

Nos IC e C, a diferença de índice de clareamento (Δ WID) entre os grupos em T0 e os tempos de avaliação após o tratamento (T15, T30 e T45) foi maior para NF (clareou mais) do que F (Figuras 1.2 e 1.4). O Δ WID T30-T15 foi igual para NF e F, mostrando que a recuperação de cor em 15 dias foi igual em ambos grupos. Os F apresentaram escurecimento maior de IC que NF em Δ WID T45-T15, ou seja, em 30 dias após o término do clareamento. Para os IL (Figura 1.3), não foram observadas diferenças em Δ WID entre fumantes e não fumantes.

Utilizando-se o limiar de aceitabilidade para as diferenças do Índice de Brancura em Odontologia, foi observado que a maior parte dos valores permanece acima de WAT entre os tempos (T15-T0), (T30-T0) e (T45-T0) em ambos NF e F nos três grupos de dentes. Porém houve maioria de valores dentro do limiar de aceitabilidade para WAT entre (T30-T15) e (T45-T15) em NF e F nos três grupos de dentes.

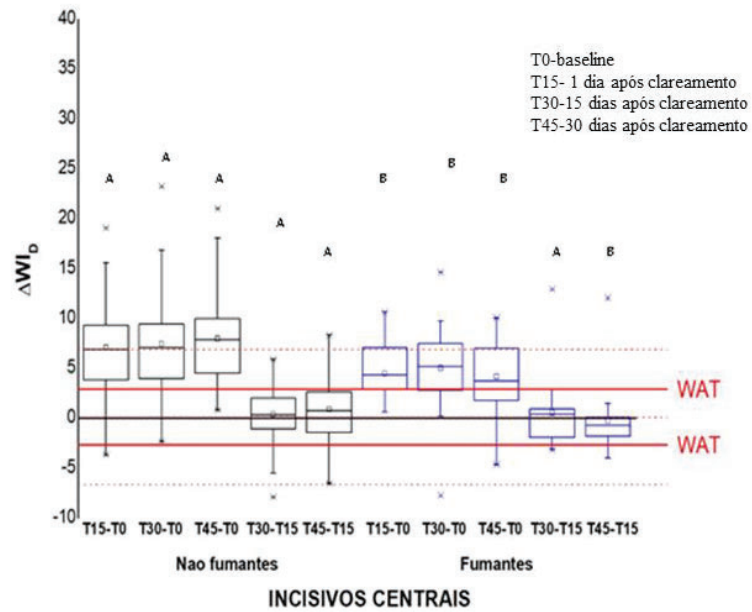


Figura 1.2. Boxplots das diferenças do índice de brancura ΔWI_D entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os incisivos centrais. As linhas vermelhas contínuas representam o limiar de aceitabilidade (WAT) superior e inferior e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança, 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

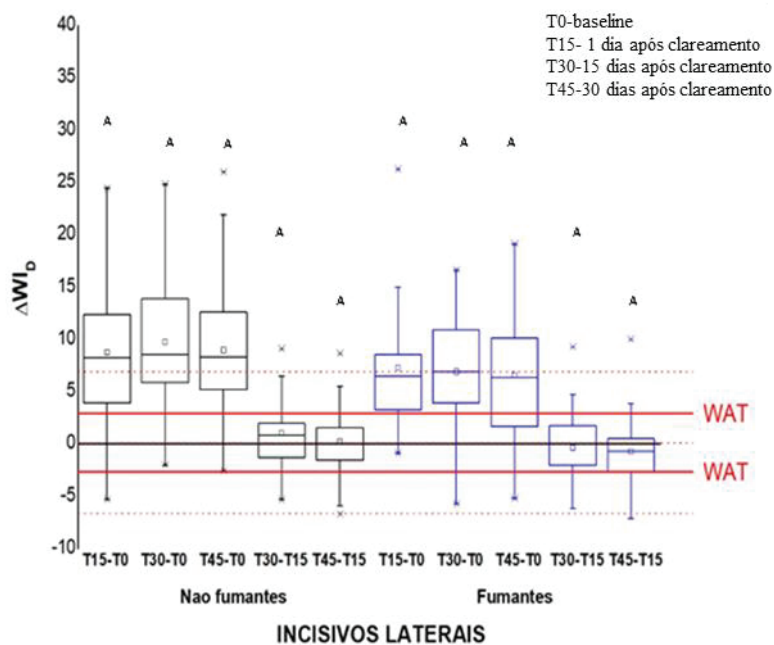


Figura 1.3. Boxplots das diferenças do índice de brancura ΔWI_D entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os incisivos laterais. As linhas vermelhas contínuas representam o limiar de aceitabilidade (WAT) superior e inferior e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

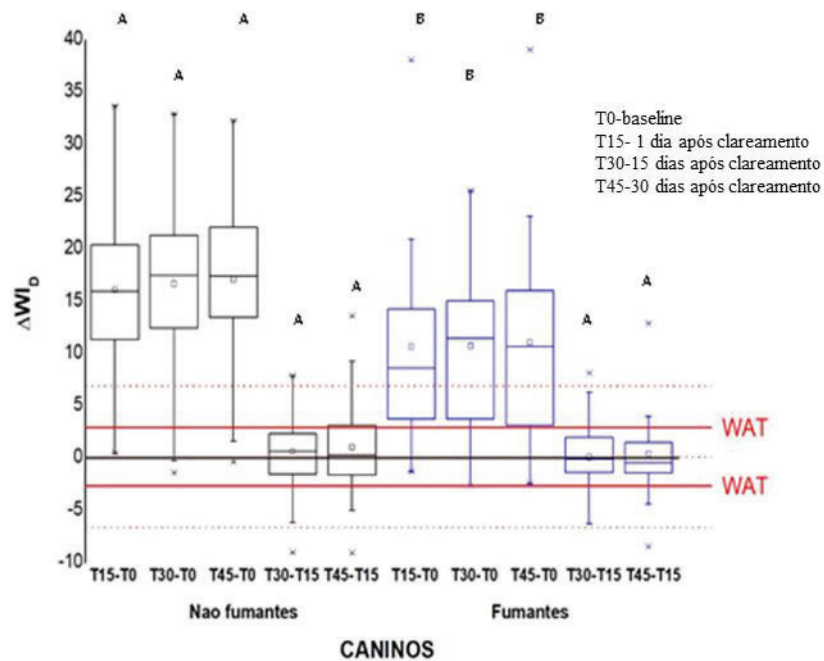


Figura 1.4. Boxplots das diferenças do índice de brancura ΔWI_D entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os caninos. As linhas vermelhas contínuas representam o limiar de aceitabilidade (WAT) superior e inferior e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

1.3.3 Alteração de cor por CIELAB (ΔE^*_{ab})

As diferenças de cor detectadas por ΔE^*_{ab} (Figuras 1.5 a 1.7), para os IC e C comparando NF e F nos períodos de avaliação, mostram alteração estatisticamente significativa em (T15-T0), (T30-T0), (T45-T0) e similaridade na mudança de cor em (T30-T15). A alteração de cor foi similar para os IC entre NF e F em (T45-T15) e para C entre NF e F nestes mesmos períodos. Para o grupo IL (Figura 1.6), não foram observadas diferenças de cor por ΔE^*_{ab} entre os grupos.

Levando em consideração esta métrica para avaliação alteração de cor, ambos os grupos apresentaram a maioria dos valores de alteração de cor acima do limiar de aceitabilidade (AT $\Delta E^*_{ab} = 2,7$ unidades) entre os tempos (T15-T0), (T30-T0) e (T45 e T0) para IC, IL e C, mas o grupo F apresentou maioria das alteração de cor abaixo deste limiar entre (T30-T15) e (T45-T15) nos IC.

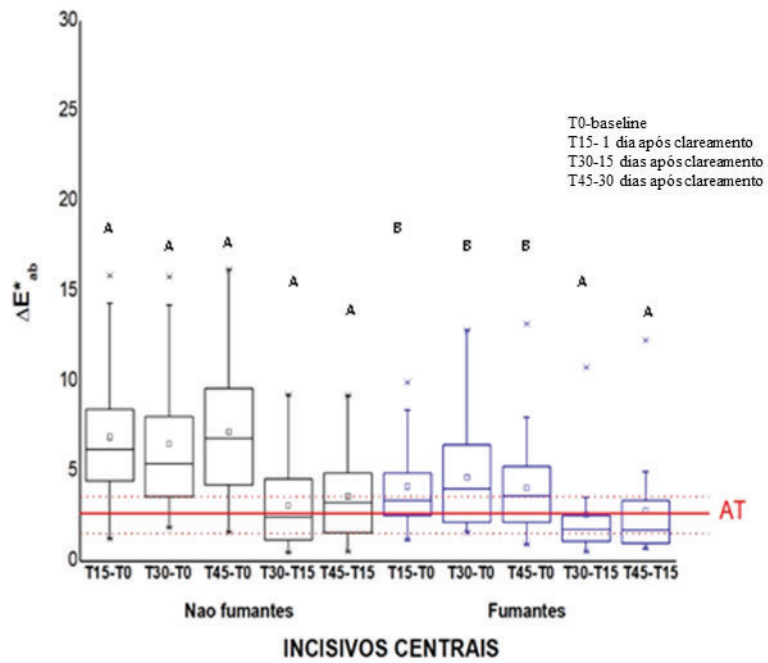


Figura 1.5. Boxplots das diferenças de cor ΔE^*_{ab} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os incisivos centrais. A linha vermelha contínua representa o limiar de aceitabilidade (AT) e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

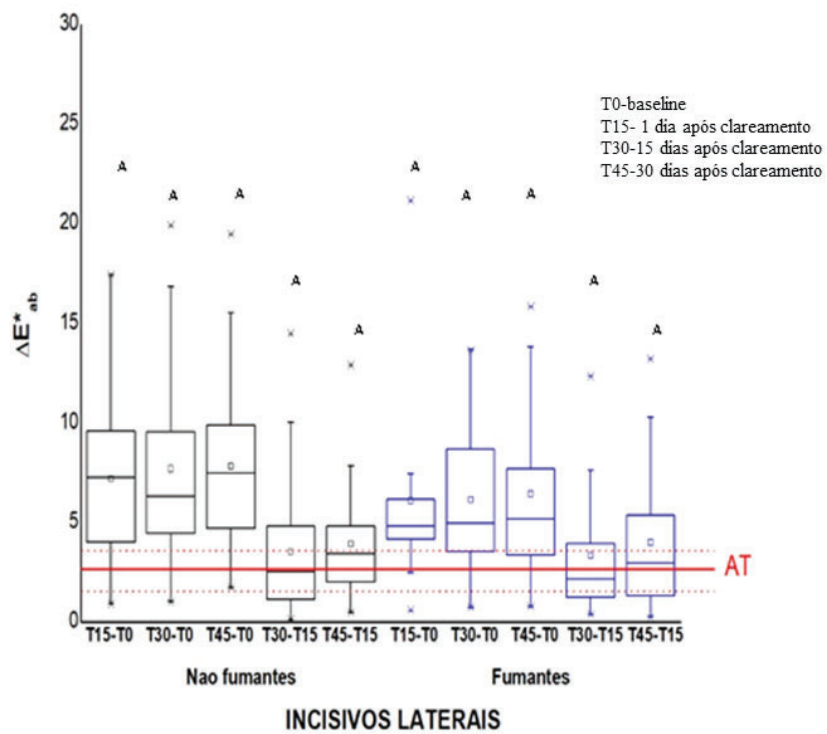


Figura 1.6. Boxplots das diferenças de cor ΔE^*_{ab} entre fumantes e não fumantes nos diferentes períodos de avaliação para os incisivos laterais. A linha vermelha contínua representa o limiar de aceitabilidade (AT) e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

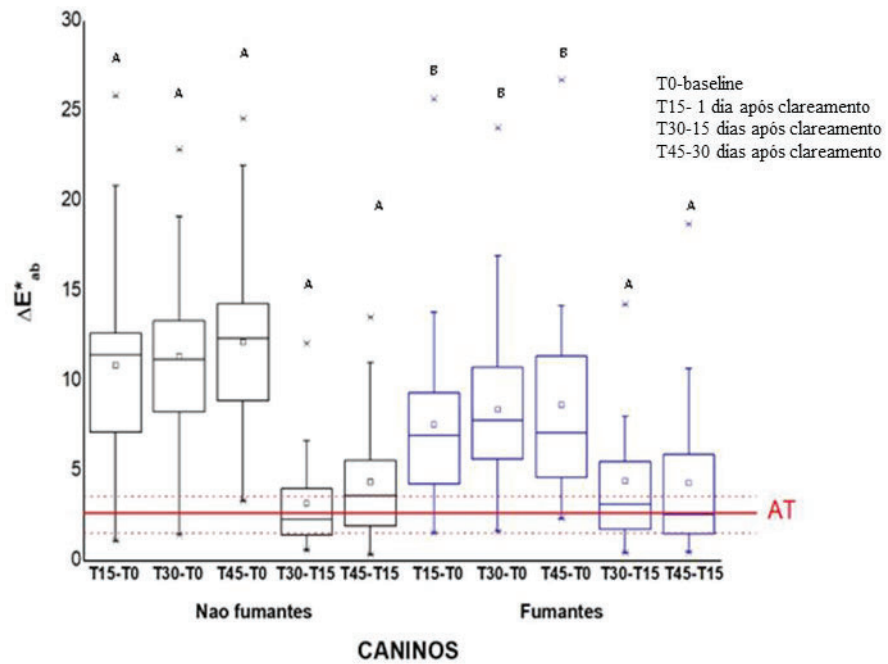


Figura 1.7. Boxplots das diferenças de cor ΔE^*_{ab} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os caninos. A linha vermelha contínua representa o limiar de aceitabilidade (AT) e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

1.3.4 Alteração de cor por CIEDE2000 (ΔE_{00})

As diferenças de cores detectadas para ΔE_{00} (Figuras 1.8 a 1.10), fórmula de mudança de cor mais recente, utilizada neste estudo, mostra significativa diferença de alteração de cor nos IC entre NF e F, nos seguintes períodos; (T15-T0), (T30-T0), (T45-T0) e alteração de cor similar em (T30-T15) e (T45-T15). A diferença de cor para ΔE_{00} entre NF e F nos mesmos tempos avaliados dos IL, mostrou maior alteração de cor estatística apenas em (T30-T0), e similaridade na alteração de cor em todos os outros tempos. E por fim, a alteração de cor avaliada através desta fórmula entre NF e F nos períodos descritos anteriormente para C apresentou diferença estatística em (T30-T0), (T45-T0), (T30-T15), não havendo esta diferença em (T45-T15) e (T15-T0).

A maior parte das alterações de ΔE_{00} encontraram-se acima do limiar de aceitabilidade (AT) em todos os grupos de dentes. O escurecimento dentário detectado por ΔE_{00} em 15 e 30 dias após o clareamento, ficou dentro do limite de aceitabilidade (AT $\Delta E_{00} = 1,8$ unidades).

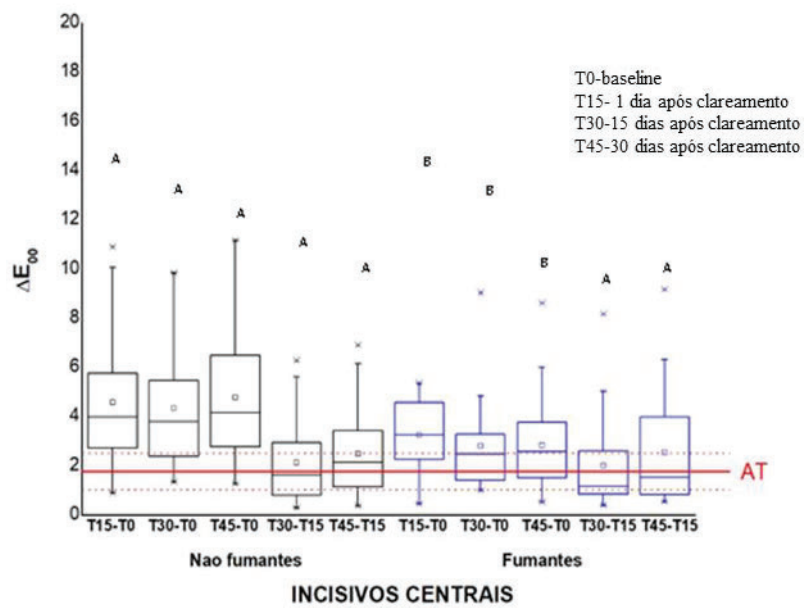


Figura 1.8. Boxplots das diferenças de cor ΔE_{00} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os incisivos centrais. A linha vermelha contínua representa o limiar de aceitabilidade (AT) e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

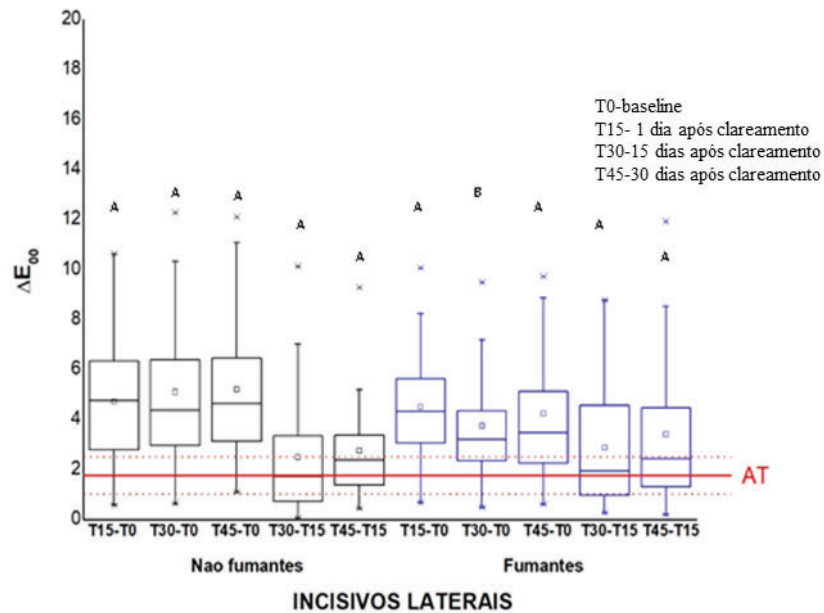


Figura 1.9. Boxplots das diferenças de cor ΔE_{00} entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os incisivos laterais. A linha vermelha contínua representa o limiar de aceitabilidade (AT) e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

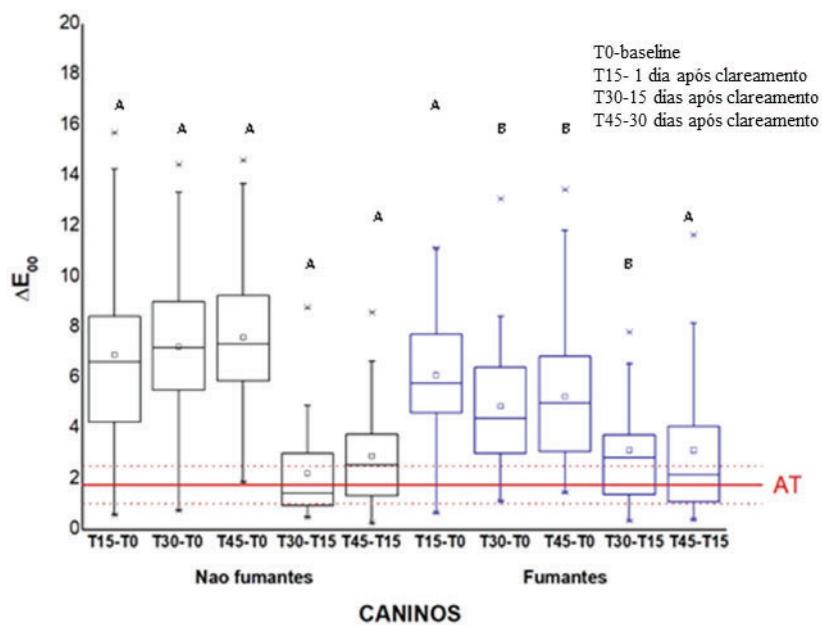


Figura 1.10. Boxplots das diferenças de cor ΔE_{00} do entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação para os caninos. A linha vermelha contínua representa o limiar de aceitabilidade (AT) e as linhas pontilhadas são os intervalos de confiança 95%. Letras diferentes representam diferença estatística entre fumantes e não fumantes nos mesmos períodos de avaliação.

1.4 DISCUSSÃO

Os resultados de clareamento, mostraram diferenças, entre fumantes e não fumantes, rejeitando a hipótese do estudo. Para todos os grupos dentários, foi possível observar, que o índice de brancura inicial (WI_D) (T0) foi igual entre F e NF, mostrando homogeneidade de brancura inicial, entre os grupos, o que auxilia nas análises de comparação subsequentes. Esta brancura semelhante em (T0), pode ser atribuído à profilaxia dental realizada previamente, à avaliação de cor e brancura, que tem o potencial, de remover manchas extrínsecas como àquelas incorporadas na superfície externa do esmalte dental pelo tabagismo. O estudo de GEUS *et al.* (2018) avaliou por meio da fórmula de cor CIELAB e guias de cores, a remoção de manchas promovidas pelo cigarro com clareamento de consultório utilizando PH 35% e profilaxia com escova rotatória e pasta profilática, apesar do clareamento causar uma alteração de cor mais expressiva, a profilaxia foi capaz de remover de forma eficiente as manchas causadas pelo cigarro, mostrando que ambos são eficazes para eliminar este tipo de manchas (TEREZHALMI *et al.*, 2008. BAZZI *et al.*, 2012; GEUS *et al.*, 2015b).

NF mostraram maior WI_D que F nos outros tempos de avaliação, isso significa que os pacientes não fumantes tiveram dentes mais brancos que os F após o clareamento. Uma forte indicação de que o cigarro interferiu de forma negativa no clareamento dental, achados diferentes dos estudos

de GEUS *et al.*, 2015a, GEUS *et al.*, 2015b e GEUS *et al.*, 2015c. A diferença encontrada entre os estudos pode ser atribuída à diferente concentração do agente clareador, que pode ter resultado em alterações da superfície do esmalte dental (CVIKL *et al.*, 2016; GRAZIOLI *et al.*, 2018). O presente estudo também utilizou uma ferramenta de mensuração do grau de branqueamento (WI_D) diferente dos demais estudos (PEREZ *et al.*, 2016; DELLA BONA *et al.*, 2019; PECHO *et al.*, 2019).

Nos IC e C, as diferenças de Índice de Brancura (ΔWI_D) entre T0 e os tempos de avaliação após o tratamento (T15, T30 e T45) foi maior para NF (maior brancura) do que F. Isso não se confirmou para IL, nos quais não foram observadas diferenças significativas de ΔWI_D e ΔE^*_{ab} entre fumantes e não fumantes. Os incisivos centrais estão em contato direto com a fumaça gerada no consumo de cigarro, conseqüentemente com uma quantidade maior de pigmentos corantes da fumaça, o que pode resultar no seu menor clareamento, no entanto não foram encontradas evidências com relação à esta afirmação.

Os C são dentes mais cromatizados que IC e IL (TURGUT *et al.*, 2018), o que pode ter contribuído com sua menor alteração de cor especialmente em pacientes fumantes. La Peña *et al.* (2014) mensuraram a alteração de cor por meio da CIELAB e CIE $L^*c^*h^*$, entre incisivos e caninos submetidos a clareamento dental com diferentes concentrações de PH e PC através de um colorímetro, que resultou em diferença significativa de alteração de cor entre os dois grupos de dentes. Esta diferença de dados de cor entre os dentes, pode ser explicada pela influência do formato, tamanho, superfície anatômica, padrões de reflexão de luz, os quais dependem da espessura da dentina e translucidez do esmalte e relações de

cor entre os dentes, não sendo iguais nos dentes anteriores superiores (DOZIC *et al.*, 2004; TURGUT *et al.*, 2018).

O ΔWI_D T30-T15 foi igual para NF e F, mostrando que a recuperação de brancura foi semelhante para ambos os grupos, 15 dias após o término do tratamento clareador (T30). Contudo, após 30 dias do término do clareamento (T45), os F apresentaram escurecimento maior de IC que NF (ΔWI_D T45-T15), sugerindo que os agentes pigmentantes da fumaça do cigarro se depositaram no esmalte, corroborando com estudos anteriores, os quais afirmam que depois de finalizado o procedimento clareador, pode haver escurecimento dentário por pigmentos extrínsecos (MEIRELES *et al.* 2008; GROBLER *et al.*, 2010; MEIRELES *et al.*, 2010). Este escurecimento dental pode ser atribuído aos componentes do cigarro, visto que a nicotina é responsável pela cor amarela característica nos dentes de fumantes (GEUS *et al.*, 2018).

Em geral, as diferenças de cor detectadas por ΔE^*_{ab} e ΔE_{00} acompanharam as diferenças de branqueamento obtidas por WI_D . Contudo, ΔE^*_{ab} e ΔE_{00} não foram sensíveis para detectar o maior escurecimento dos IC do grupo F em (T45-T15), mostrada somente por WI_D , o que mostra que esta equação com coeficientes corrigidos para detectar branqueamento (WI_D) pode ser mais adequada para avaliação de eficácia nos estudos de clareamento (DA SILVA *et al.*, 2018; DELLA BONA *et al.*, 2019; PECHO *et al.*, 2019).

Não foram encontradas diferença de cor entre fumante e não fumantes de acordo com E_{00} no período (T5-T0), diferente dos resultados obtidos por ΔWI_D e ΔE^*_{ab} . Assim como ΔE_{00} mostrou diferença entre fumantes e não fumantes em 30 dias após término do tratamento clareador (T30-T0) para IL, o que pode significar que não houve manutenção do

branqueamento (WI_D não detectou maior luminosidade), mas houve alteração em coordenadas de cores, alterando a cor deste dente, representando que alteração de cor e brancura variou de acordo com a métrica utilizada. A fórmula de diferença de cor CIEDE2000 foi atribuída, pois melhora a correção entre a cor computada e percebida, além de incorporar correções específicas em decorrência da não uniformidade do espaço de cor CIELAB (PEREZ *et al.*, 2011; LAGO *et al.*, 2016; GOMEZ-POLO *et al.*, 2016; PECHO *et al.*, 2016a; PEREZ *et al.*, 2019a). Isso mostra a importância do uso de mais de uma métrica de cor para sua avaliação completa.

O limiar de aceitabilidade para ΔE^*_{ab} , ΔE_{00} e ΔWI_D foi utilizado nas comparações entre F e NF nos períodos avaliados para todos os grupos de dentes, pois complementa a estatística tradicional em pesquisas de cor (PARAVINA *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2017, DELLA BONA *et al.*, 2019) e especialmente, avaliando clinicamente a efetividade do tratamento clareador (PEREZ *et al.*, 2019b). Della Bona *et al.*, (2019) e Pecho *et al.*, (2019) avaliaram em um recente estudo, através de limiares de perceptibilidade (PT) e aceitabilidade (AT) para ΔE^*_{ab} , ΔE_{00} e WI_D a estabilidade de cor e branqueamento de resinas compostas submetidas ao clareamento, e a influência de um gel clareador nas alterações de cor e branqueamento de resinas compostas, respectivamente. O limiar de aceitabilidade para o índice de brancura pode variar significativamente entre dentistas (WAT=2,20 unidades) e pessoas leigas (WAT=2,90 unidades) (PEREZ *et al.*, 2019b). No presente estudo, utilizamos o limiar de aceitabilidade para pessoas leigas, pois os pacientes são os observadores do tratamento clareador, e devido a influência da população

observadora nos limiares de diferença de cor (PARAVINA *et al.*, 2015; DELLA BONA *et al.*, 2019).

Levando-se em consideração o limiar de aceitabilidade para o Índice de Brancura para Odontologia (WI_D) os valores das diferenças de brancura em relação à (T0) ficaram, em sua maioria, acima do limiar de aceitabilidade reportado na literatura (WAT), portanto são mudanças consideradas satisfatórias pelo paciente. O escurecimento dentário detectado por WI_D em 15 e 30 dias após o clareamento, ficou dentro do limite de aceitabilidade, sendo aceitável pelo paciente F e NF em todos os grupos de dentes.

As diferença de cor em relação a T0 para F e NF foram, na maioria, maiores que o limiar de aceitabilidade para o ΔE^*_{ab} reportado na literatura (AT), sendo portanto, aceitáveis pelo paciente. A alteração de cor dos IC, de F, detectado por ΔE^*_{ab} em 15 e 30 dias após o clareamento, ficou na maior parte abaixo do limite de aceitabilidade, sendo alterações de cor inaceitáveis pela maioria dos paciente fumantes. Para os valores ΔE_{00} , os limiares de aceitabilidade (AT) ficaram em sua maioria acima daquele reportado na literatura, portanto são alterações de cor aceitáveis pela maioria dos pacientes.

Isto significa, que foram detectados diferentes limiares de aceitabilidade de acordo com a métrica utilizada para alteração de cor. Com WI_D foram detectados alguns valores de diferenças de índice de brancura abaixo do limiar de aceitabilidade tanto para F, quanto para NF, em certos períodos para os diferentes grupos de dentes. Sendo alguns destes valores negativos, indicando que os dentes avaliados ficaram escuros (PEREZ *et al.*, 2016), porém este escurecimento é considerado aceitável.

Esta pesquisa apresenta algumas limitações, como por exemplo o tamanho amostral (24 não fumantes e 16 fumantes), inicialmente calculado como 25 pacientes por grupo com adição de 5 paciente para perdas e recusas. Outra limitação é o menor número de cigarros diários dos voluntários fumantes em relação à estudos anteriores, o que pode indicar um consumo menor de cigarros pela população ou uma aceitabilidade maior do tratamento clareador pelas pessoas que fumam menos.

A avaliação objetiva foi realizada com espectrofotômetro, um instrumento que avalia alteração de cor por contato (JOINER *et al.*, 2017). Como os dentes humanos são pequenos e curvos, há a chance de inadequada leitura de cor, pois uma fração de luz que atinge a estrutura dental é perdida, e ainda a avaliação da alteração de cor é dependente da percepção visual (PECHO *et al.*, 2016a).

Estudos futuros podem ser conduzidos comparando avaliação subjetiva com objetiva, especialmente para confirmar os cálculos de aceitabilidade e confiabilidade calculados para CIEDE2000 e WI_D . Além disso, acompanhamentos à longo prazo ou em múltiplas exposições aos agentes clareadores (mais de uma concentração de gel clareador) podem ser realizados.

1.5 CONCLUSÕES

Podemos concluir, que o tratamento clareador com peróxido de carbamida 22 %, apesar de eficaz, pode ser influenciado negativamente pelo tabagismo.

REFERÊNCIAS

BAZZI, J.Z.; BINDO, M.J.; RACHED, R.N.; MAZUR, R.F.; VIEIRA, S.; SOUZA, E.M.; The effect of at-home bleaching and toothbrushing on removal of coffee and cigarette smoke stains and color stability of enamel, *Journal of American Dental Association.*; v.143, n.5, p.1-7, 2012.

BERNARDON, J.K.; SARTORI, N.; BALLARIN, A.; PERDIGÃO, J.; LOPES, G.C.; BARATIERI, L.N.; Clinical performance of vital bleaching techniques, *Operative Dentistry*, v.35, n.1, p.3-10, 2010.

BERNARDON, J.K.; FERRARI, P.; BARATIERI, L.N.; RAUBER, G.B.; Comparison of treatment time versus patient satisfaction in at-home and in-office tooth bleaching therapy, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v.114, n.6, p.826-30, 2015.

CAREY, CM, Tooth Whitening: What We Now Know, *The Journal of Evidence- Based Dental Practice*, v.14, s/n, p. 70-6, 2014.

Commission Internationale de l'Eclairage, CIE Pub No. 15.3CIE technical report: colorimetry. Vienna: CIE Central Bureau; 2004.

CVIKL, B.; LUSSI, A.; MORITZ, A.; FLURY, S.; Enamel surface changes after exposure to bleaching gels containing carbamide peroxide or hydrogen peroxide, *Operative Dentistry*, v. 41, n.1, p.39-47, 2016.

DELLA BONA, PECHO, O.E.; GHINEA, R.; CARDONA, J.C.; PARAVINA, D.R PEREZ, M.M.; Influence of Bleaching and Aging Procedures on Color and Whiteness of Dental Composites, *Operative Dentistry*, v.44, n.6, p.648-658, 2019.

DOZIC, A.; KLEVERLAAN, C. J., AARTMANN, I. H. A.; & FEILZER, A. J.; Relation in color of three regions of vital human incisors. *Dental Materials*, v.20, n.9, 832-838, 2004.

DA SILVA, V. A.; DA SILVA, S. A.; PECHO, O. E.; BACCHI, A.; Influence of composite type and light irradiance on color stability after immersion in different beverages, *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v.30, n.5, p.390-396, 2018.

FIRMANI, M.; REYES, M.; BECERRA, N.; FLORES, G.; WEITZMAN, M.; ESPINOSA, M.; Sleep bruxism in childrens and adolescents, *Revista Chilena de Pediatría*, v.86, n.5, p.373-379, 2015.

GEUS, J. L.; REZENDE, M.; MARGRAF, L. S.; BORTOLUZZI, M. C.; FERNANDÉZ, E.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. D.; KOSSATZ, S.; Evaluation of Genotoxicity and Efficacy of At-home Bleaching in Smokers: A Single-blind Controlled Clinical Trial, *Operative Dentistry*, v.40, n.2, p.47-55, 2015a.

GEUS J. L.; LARA, M. B.; HANZEN, T. A.; FERNANDÉZ, E.; LOGUERCIO, A. D.; KOSSATZ, REIS, A.; One-year follow-up of at-home bleaching in smokers before and after dental prophylaxis, *Journal of Dentistry*, n.43, v.11, p.1346-51, 2015b.

GEUS, J. L. BERSEZIO, Z.; URRUTIA, J.; YAMADA, T.; FERNANDÉZ, E.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A.; KOSSATZ, S.; Effectiveness of and tooth sensitivity with at-home bleaching in smokers, *Journal of the American Dental Association*, ,v.146, n.4, p.233-40, 2015c.

GEUS, J. L.; BELTRAME F. L.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; LOGUERCIO, A. D.; KOSSATZ, S.; REIS, A.; Determination of nicotine content in teeth submitted to prophylaxis and in-office bleaching by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), *Clinical Oral Investigations*, v.22, n.9, p.3043-3051, 2018.

GOMÉZ-POLO, C.; MUÑOZ, M. P.; MUENGO, M. C. L. VICENTE, P.; GALINDO, P.; CASADO, A. M.; Comparison of the CIELAB and CIEDE2000 color difference formulas, *Journal of Prosthetic Dentistry*, v.115, n.1, p.65-70, 2016.

GRAZIOLI, G. VALENTE, L. L.; ISOLAN, C. P.; PINHEIRO, H. A.; DUARTE, C. G.; MUNCHOW, E. A., Bleaching and enamel surface

interactions resulting from the use of highly-concentrated bleaching gels, *Archives of Oral Biology*, 87 p.157-162,2018.

GROBLER, S.R.; HAYWARD, R.; WIESE, S.; MOOLA, M.H.; KOTZE, T. J. W.; Spectrophotometric assessment of the effectiveness of Opalescence PF 10 %: A 14-month clinical study, *Journal of Dentistry*, v.38, n.2, p.113-117, 2010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
ISO/TR 28642: Dentistry - Guidance on color measurement. Geneva; 2016.

JOINER, A.; LUO, W.; Tooth color and whiteness: A review, *Journal of Dentistry*, v.s/v, n.s/n, p.s/p, 2017.

KIRSTEN, G. A.; FREIRE, A.; de LIMA, A. A.; IGNÁCIO, S.A.; SOUZA, E. M.; Effect of reservoirs on gingival inflammation after home dental bleaching, *Quintessence International*, v.40, n.3, p.195-202, 2009.

KNUTSSON, B.; MUKKA, S.; WAHLSTRÖM, J.; JÄRVHOLM, B.; SAYED-NOOR, A. S.; The association between tobacco smoking and surgical intervention for lumbar spinal stenosis: cohort study of 331,941 workers, *The Spine Journal*, v.18, n.8, p.1313-1317, 2017.

LA PEÑA V. A.; RATÓN, M. L.; Randomized clinical trial on the efficacy and safety of four professional at-home tooth whitening gels. *Operative Dentistry*, v. 39, n.2, p.136-143, 2014.

LAGO, M.; MOZZAQUATRO, L. R.; RODRIGUES, C.; KAIZER, M.R.; MALLMANN, A.; JACQUES, L.B.; Influence on bleaching agents on color and translucency of aged and resin composites, *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v.29, n.5, p.368-377, 2017.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P.; Plano de Tratamento, In: Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. Quarta edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p.401-418.

LUO, M. R.; CUI, G.; RIGG, B.; The development of the CIE2000 color difference formula, *Color Research Applied*, v.26, n.s/n, p.340-350, 2001.

MARAN, B. M.; VOCHIKOVSKI. L.; HORTKOFF, D. R. A.; STANIS LAW CZUK, R.; LOGUERCIO, A.; REIS, A.; Tooth sensitivity with a desensitizing-containing at-home bleaching gel – a randomized triple-blind clinical trial, *Journal of Dentistry*, 72, p.64-70, 2018.

MEIRELES, S. S.; HECKMANN, S. S.; LEIDA, F. L.; SANTOS, I. S.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F.; Efficacy and safety of 10% and 16% carbamide peroxide tooth-whitening gels: a randomized clinical trial., *Operative Dentistry*,v.33,n.6,p.606-612, 2008.

MEIRELES, S. S.; SANTOS, I. S.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F. A double-blind randomized clinical trial of two carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up, *Journal of Dentistry*, v.38, n.12, p.956-63, 2010.

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

PARAVINA, D. R.; GHINEA, R.; HERRERA, L. J.; DELLA BONA, A.; IGIEL, C.; LINNINGER, M.; SAKAI, M.; HIDEKAZU, T.; TASHKANDI, E.; PEREZ, M. M.; Color difference thresholds in dentistry, *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v.1, n.27, p.1-9, 2015.

PECHO, O. E.; GHINEA, R.; ALESSANDRETI, R.; PEREZ, M. M.; DELLA BONA, A.; Visual and instrumental shade matching using CIELAB and CIEDE2000 color difference formulas, *Dental Materials*,v.32, n1, p.82-92, 2016a.

PECHO, O. E.; MARTOS, J.; PINTO, K. V. A.; PINTO, K. V. A.; BALDISSERA, R. A.; Effect of hydrogen peroxide on color and whiteness of resin-based composites, *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*,v.31, n.2, p.132-139, 2019.

PEREZ, M. M.; GHINEA, R.; HERRERA, L. J.; IONESCU, A. M.; POMARES, H.; PULGAR, R.; PARAVINA, R. D.; Dental ceramics: A

CIEDE2000 acceptability thresholds for lightness, chroma and hue differences, *Journal of Dentistry*, 39:E, p.37-44, 2011.

PEREZ, M. M.; GHINEA, R.; RIVAS, M. J.; YEBRA, A.; IONESCU, A. M.; PARAVINA, R. D.; HERRERA, L. J.; Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space, *Dental Materials*, v.32, n.3, p.461-467, 2016.

PEREZ, M. M.; PECHO, O. E.; GHINEA, R.; PULGAR, R.; DELLA BONA, A.; Recent advances in color and whiteness evaluation in dentistry. *Current Dentistry* v.1; n.1, p.23-29, 2019a.

PEREZ, M. M.; HERRERA, L. J.; CARRILLO, F.; PECHO, O. E.; DUDEA, D.; GASPARIK, C.; GHINEA, R.; DELLA BONA, A.; Whiteness Difference threshold in Dentistry, *Dental Materials*, v.35, n.2, p.292-297, 2019b.

REZENDE, M.; DE GEUS, J. L.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. KOSSATZ, D.; Clinical Evaluation of Genotoxicity of In-office Bleaching, *Operative Dentistry*, v.41, n.6, p.578-586, 2016.

SHARMA, G.; WU, W.; DALAL, E. N.; The CIEDE2000 color-difference formula: implementation notes, supplementary test data, and mathematical observations. *Color Research Applied*, v.30, n.1, p.21-30, 2005.

TERRY, D. A.; GELLER, W.; Biomodificação da descoloração dentária, In: *Odontologia estética e restauradora*. 2ª ed. São Paulo: Quintessence Editora, 2014. p. 678-710.

TEREZHALMY, G.T.; WALTERS, A. P.; BARTIZEK, R. D.; GRENDER, J. M.; BIESBROCK, A. R.; A clinical evaluation of extrinsic stain removal: A rotation-oscillation power toothbrush versus a dental prophylaxis, *The Journal of Contemporary Dental Practice*, v.9, n.5, p.1-8, 2008.

TURGUT, S.; KILINK, H.; EYUPOGLU, G. B.; BAGIS, B.; Color relationships of natural anterior teeth: An in vivo study, *Nigerian Journal of Clinical Practice*, v.21, n.7, p.925-931, 2018.

CAPÍTULO 2- INFLUÊNCIA DO TABAGISMO NA GENOTOXICIDADE DAS CÉLULAS ORAIS APÓS CLAREAMENTO DENTAL CASEIRO COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA 22%: ESTUDO DE COORTE

Resumo: OBJETIVOS: O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do tabagismo na genotoxicidade das células da mucosa oral de pacientes que realizaram clareamento dental caseiro com peróxido de carbamida a 22%. MÉTODOS: Se trata de um estudo prospectivo observacional analítico do tipo coorte, o qual avaliou 2 grupos (n=40) de pacientes entre 18 e 54 anos: NF- não fumantes (n=24) e; F- fumantes (n=16). Ambos os grupos realizaram tratamento clareador com peróxido de carbamida (PC) em concentração de 22%, aplicado em moldeiras individuais e utilizado durante 1h por dia, por 14 dias. As coletas celulares para análise foram realizadas antes (T0-*baseline*), um dia (T15), 15 dias (T30) e 1 mês (T45) após o término do tratamento clareador. A genotoxicidade foi avaliada pelo teste de micronúcleos, que analisou o raspado superficial da gengiva marginal superior e inferior. Para cada coleta o material foi corado com Giemsa a 10%, e em seguida um observador treinado fez a contagem de micronúcleos (MN) e alterações metanucleares (AM), em 1000 células de cada paciente. A coleta e análise dos dados ocorreram de forma cega. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, Dunn e Mann-Whitney ($\alpha=0,05$). RESULTADOS: Foi encontrado um aumento de alterações metanucleares diretamente proporcional ao tempo de avaliação ($p<0,001$) nos dois grupos, no entanto não foram encontradas diferenças estatísticas sugestivas de genotoxicidade entre NF e F ($p>0,05$), nos períodos avaliados. CONCLUSÃO: O tabagismo associado ao

clareamento dental caseiro com peróxido de carbamida 22% não apresentou potencial genotóxico aos tecidos moles orais, quando MN foram avaliados. Notando-se um aumento significativo de AM em ambos grupos diretamente proporcional aos tempos de avaliação até um mês após o término do clareamento.

Palavras-Chave: Clareamento dental, peróxido de carbamida 22%, genotoxicidade, fumantes.

⁵ Rodrigo Rohenkohl Silva
João Paulo De Carli
Júlia Vanini
Júlia Stephanie Presotto
Jose Eduardo Vargas
Paula Benetti

CHAPTER 2 – INFLUENCE OF SMOKING ON ORAL CELLS GENOTOXICITY AFTER AT-HOME BLEACHING USING 22% CARBAMIDE PEROXIDE: A COHORT STUDY

Abstract: **PURPOSE:** This study evaluated the smoking influence on cells genotoxicity in patients which performed at-home bleaching using 22% carbamide peroxide. **METHODOLOGY:** It was prospective observational analytics cohort study, which evaluated 40 volunteers (N=40) divided in two groups: NF- no smokers (n=24) and; F- smokers (n=16) with age between 18 and 54 years old. The at-home bleaching was performed using 22% carbamide peroxide gel applied in individual trays and used during 1 h for 14 days. The cell collections for analysis were carried out before (T0-*baseline*), 1 day (T15), 15 days (T30) and one month (T45) after the end of bleaching. Genotoxicity was evaluated by Micronucleus Test which analyzed scrapped cells from upper and lower marginal gum. For each collection the material was stained using 10 %Giemsa. A trained observer counted the micronucleus (MN) and metanuclear alterations (AM) in 1000 cells per patient. The collections and data analysis occurred blindly. The data were analyzed by Kruskal-Wallis, Dunn and Mann-Whitney test ($\alpha=0,05$). **RESULTS:** There were an AM increase between T0 and T45 for both groups ($p<0,001$), but no genotoxicity statistical difference comparing NF and F ($p>0,05$), and the evaluated times. **CONCLUSION:** The smoking associated with 22% carbamide peroxide at-home bleaching showed no genotoxic potential for oral soft tissues when MN were evaluated, showing a positive correlation AM increase related to evaluation times in both groups.

Keywords: Tooth bleaching, carbamide peroxide, genotoxicity, smokers

2.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, os tratamentos odontológicos têm primado cada vez mais pela excelência estética (GEUS *et al.*, 2015a) pois dentes brancos e bem alinhados são os desejos de muitos pacientes (AKARSLAN *et al.*, 2009). O clareamento de dentes vitais é um procedimento estético com alta demanda, realizado tanto pela técnica caseira como de consultório relatado como um tratamento eficaz, duradouro e conservador (MEIRELES *et al.*, 2010; GRAZIOLI *et al.*, 2017).

O gel clareador mais comum para clareamento caseiro é o peróxido de carbamida de 10% a 22%, sendo aplicado em uma moldeira customizada, utilizada pelo paciente por um período de tempo (MEIRELES *et al.*, 2008; MEIRELES *et al.*, 2010; BERNARDON *et al.*, 2010). Este agente clareador quebra-se formando ureia e dióxido de carbono e então, dissocia-se em amônia, água e oxigênio (GOLDBERG 2010; ALMEIDA *et al.*, 2015).

Genotoxicidade é a capacidade de um material induzir danos ao conteúdo genético do ser humano (RIBEIRO *et al.*, 2017), podendo ser avaliada pelo aumento da quantidade de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa oral (REZENDE *et al.*, 2016). O teste de micronúcleos é capaz de verificar danos citogenéticos de tecidos-avulsos de carcinomas humanos, como a mucosa oral, língua, alvéolo, gengiva, palato, lábio e assoalho da boca (SUHAS *et al.*, 2004). Existem estudos que concluíram que o oxigênio reativo do agente clareador apresenta potencial genotóxico (GOLDBERG 2010; KLARIC *et al.*, 2013). De outra forma, há estudos que realizaram clareamento com peróxido de

hidrogênio (PH) 10% e PC 10%, 16% e 22% sem encontrar marcadores para genotoxicidade, em número significativo que pudessem confirmar os dados dos estudos anteriores (ALMEIDA *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2018; BONACINA *et al.*, 2020).

Sem evidência científica, participantes fumantes são excluídos de ensaios clínicos nos quais se realiza tratamento clareador (MEIRELES *et al.*, 2008; BERNARDON *et al.*, 2010; MEIRELES *et al.*, 2010), devido ao fato de muitos odontólogos acreditarem que o tabagismo associado ao clareamento possa ter potencial genotóxico (GEUS *et al.*, 2015a). Já que ambos avaliados de modo separado provocaram aumento na quantidade de micronúcleos (SUHAS *et al.*, 2004; BANSAL *et al.*, 2012; NADERI *et al.*, 2012; KLARIC *et al.*, 2013). Sabe-se que o cigarro apresenta 3.800 componentes, sendo que alguns são agentes genotóxicos bem conhecidos (ANGLIERI *et al.*, 2009; NERSESYAN *et al.*, 2011). Em seu estudo GEUS *et al.*, (2015a) avaliaram a genotoxicidade do peróxido de carbamida 10% em fumantes e não fumantes, não encontrando alteração de células significativas em nenhum dos grupos após o procedimento. Entretanto, pouco se sabe em relação ao comportamento deste agente clareador de uso caseiro, quando maiores concentrações são utilizadas e se associado ao tabagismo.

O presente estudo tem como objetivo avaliar, por meio de um estudo de coorte, o efeito do tabagismo na genotoxicidade das células da mucosa oral de pacientes que fetuaram clareamento dental caseiro com peróxido de carbamida a 22%, testando a hipótese de que a quantidade de MN e AM será semelhante entre os grupos.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Desenho do estudo e aspectos éticos

Tratou-se de um estudo analítico observacional prospectivo do tipo coorte. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, envolvendo Seres Humanos da Universidade de Passo Fundo (CEP/UPF), através do número 3.095.118 (ANEXO1), seguindo os princípios da declaração de Helsinki (1996). A pesquisa foi registrada na plataforma REBEC (2x2czx). Os voluntários foram esclarecidos sobre o estudo, e aqueles que autorizaram sua participação, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE 1-TCLE).

2.2.2 Seleção da amostra

O tamanho da amostra foi calculado baseado em estudo prévio (GEUS *et al.*, 2015a) para um poder de 90% e um nível de significância de 5%. Assim, seria necessário um n amostral de 24 indivíduos em cada grupo (fumantes e não fumantes). Ainda, foram acrescentados, mais 25% para perdas e recusas, obtendo-se um total de 30 participantes/grupo. Então seria necessário um total de 60 participantes (N=60), divididos em dois grupos: NF-30 participantes não fumantes e F-30 participantes fumantes (n=30).

A estratégia de busca pelos voluntários, foi realizada pela divulgação em rádio, colocação de cartazes no *Campus* I da UPF, convite verbal em salas de aula e Central de Informações da Universidade de Passo Fundo. O e-mail e telefone do responsável pela pesquisa e da Secretaria da Pós-Graduação em Odontologia, foram disponibilizados para que os voluntários entrassem em contato.

Aceitando o convite para participar da pesquisa, consultas iniciais foram agendadas e efetuadas na Clínica de Pós Graduação da FO-UPF. Anamnese e Exame Clínico (APÊNDICE 2) eram realizados. Os voluntários foram analisados quanto aos critérios de inclusão e exclusão do estudo.

2.2.3 Critérios de inclusão e exclusão do estudo

Critérios de Inclusão

- não fumantes ou fumantes moderados de pelo menos 5 cigarros por dia, há mais de um ano (KNUTSSON *et al.*, 2017)
- idade entre 18 e 54 anos; (GEUS *et al.*, 2015c);
- presença dos seis dentes ântero-superiores hígidos, com coloração A2 (Escala Vita Clássica) ou mais escuro;

Critérios de Exclusão

- ter realizado tratamento clareador prévio, há menos de 6 anos;
- presença de restauração ou perda de vitalidade pulpar dos 6 dentes anteriores;
- presença de aparelho ortodôntico fixo - brackets;

- presença de comorbidades - problemas cardíacos, hipertensão, diabetes descompensado;
- presença de cárie ativa ou doença periodontal;
- impossibilidade de comparecer às consultas em todos os períodos de avaliação (antes, 1 dia, 15 dias e 1 mês após o término do clareamento);
- lesões cervicais cariosas ou não (erosão, abrasão ou atrição);
- gravidez ou lactação;
- presença de hábitos parafuncionais (bruxismo ou apertamento) comprovado (FIRMANI *et al.*, 2015);
- sensibilidade dentinária relatada e provocada por jatos de ar (seringa tríplice);
- alterações patológicas dos dentes que tenham provocado alteração na cor de algum dos seis elementos ântero-superiores ou inferiores (ex: amelogenese imperfeita; pigmentação dentária por tetraciclina; tratamento endodôntico);
- presença de lesões cancerizáveis ou neoplasia maligna na cavidade oral;
- uso de medicamento sistêmico/tópico com potencial de pigmentação dentária;

2.2.4 Avaliação de genotoxicidade

Em todos os voluntários do estudo (NF e F), realizaram-se 4 (quatro) coletas celulares da gengiva marginal livre superior e inferior, local de maior contato com o gel clareador, por meio de raspado superficial. Os tempos de avaliação foram: antes do procedimento clareador (T0-*baseline*), um dia (T15), quinze dias (T30) e um mês após (T45) clareamento (GEUS *et al.*, 2015a).

Previamente às coletas os voluntários foram instruídos, a realizar um bochecho com água durante 1 minuto, para eliminar possíveis detritos da cavidade oral. Após, foi realizado, com espátula de madeira, um raspado superficial em toda gengiva marginal do paciente. O material celular coletado foi imediatamente transferido para um tubo Falcon, realizando-se fixação com solução 3:1 (metanol: ácido acético) (Merck KGaATM, Darmstadt, Alemanha) seguido de centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, descartou-se o sobrenadante, deixando-se apenas o *pallet* branco, efetuando-se nova adição de fixador, para lavagem das células, de modo que o material ficasse incolor e sem presença de resíduos, sendo então o mesmo gotejado sobre lâminas de microscopia. Em seguida, as lâminas foram colocadas para secar à temperatura ambiente, após foram coradas com Giemsa a 10% (RenyLab Química, Barbacena, MG, Brasil).

As avaliações realizaram-se em microscopia com aumento de 1000X. Para cada indivíduo, avaliaram-se 1000 (mil) células da mucosa bucal, identificando-se os micronúcleos além de ser realizado o registro da presença de células binucleadas e alterações nucleares dos tipos 1 (cariorrexe), 2 (picnose), 3 (“broken-egg”), 4 (cariólise), (Figura 2.1). A análise foi efetuada utilizando-se microscópio fotônico (Olympus BX 50[®], Corporation of the Americas, Center Walley, PA, EUA) de acordo com os critérios propostos por Titenko-Holland *et al.*, 1997, a) micronúcleo com menos de um terço ou menor que núcleo principal, b) intensidade de cor semelhante à do núcleo, c) micronúcleo claramente separado do núcleo principal, d) células com formato redondo ou oval com citoplasma intacto, e) núcleo com formato redondo ou oval com membrana intacta e) células que já tivessem realizado ao menos uma divisão celular. A coleta

das células da mucosa oral realizou-se por uma única examinadora (acadêmica de Odontologia) que não tinha conhecimento acerca da inclusão dos voluntários de NF e F, além de que a mesma fazia uso de uma máscara especial hospitalar em formato de concha (3M, Saint Paul, Minnessota, EUA), durante as coletas, com o objetivo de barrar o odor característico do uso de cigarro. A avaliação microscópica de genotoxicidade, foi realizada por uma acadêmica do curso de Ciências Biológicas, da Universidade de Passo Fundo, também isenta quanto à composição dos grupos. Portanto a avaliação de genotoxicidade foi efetuada de forma duplo- cega. Ambos os procedimentos foram efetuados por acadêmicos, sob a supervisão de um aluno de Pós-Graduação e de professores universitários.

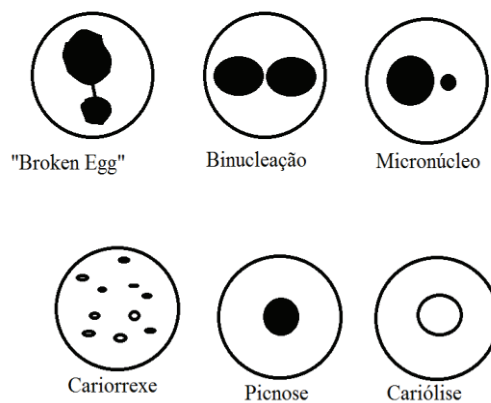


Figura 2.1 - Desenho esquemático destacando o aspecto morfológico das alterações metanucleares, adaptado de CARRARD *et al.* (2007).

2.2.5 PROCEDIMENTO CLAREADOR

O clareamento caseiro iniciou-se com moldagens das arcadas superior e inferior usando alginato (Ava Gel[®], Dentsply, Milford, DE, EUA) e moldeiras de estoque (Maquira[®], Maringá, PR, Brasil), sendo os moldes obtidos preenchidos com gesso pedra tipo III (Asfer[®], São Caetano do Sul, SP, Brasil). Posteriormente, sobre os modelos obtidos, duas moldeiras de EVA, com 1mm de espessura (FGM[®], Joinville, SC, Brasil), foram confeccionadas sem reservatórios (KIRSTEN *et al.*,2009; MEIRELES *et al.*,2010; MARAN *et al.*,2018), em uma plastificadora (Bio Art[®], São Carlos, SP, Brasil) com objetivo de segurar o gel durante o uso, cortadas a 1mm além da margem gengival (BERNARDON *et al.*, 2010). As moldeiras foram entregues em (T0) aos voluntários NF e F, juntamente, com duas seringas contendo gel de peróxido de carbamida em concentração de 22% (Whiteness Perfect[®], FGM, Joinville, SC, Brasil). Demonstração de como fazer uso, instruções verbais e escritas, como uso do clareador sempre no mesmo horário foram dadas a todos voluntários NF e F (APÊNDICE 3). Para a execução do clareamento padronizou-se o tempo de uso diário do clareador, em 1 hora ao dia durante 14 dias (conforme fabricante do produto).

2.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Realizou-se as análises descritivas e a diferença da média de idade entre os grupos foi comparada através do teste Qui-quadrado. Os dados foram inicialmente analisados, para constatar distribuição de normalidade, através do teste Shapiro-Wilk. Após verificada, distribuição não normal dos dados, foi utilizado o teste estatístico Kruskal-Wallis e teste de Dunn ($\alpha=0,05$) para comparação das frequências de MN e AM entre os tempos de avaliação. Realizou-se o teste Mann-Whitney, considerando ($\alpha=0,05$), para comparar as diferenças de MN e AM entre NF e F nos períodos avaliados. Utilizou-se o programa de análise estatística STATA 14 ® (Statistics/Data Analysis, College Station, Texas, EUA).

2.3 RESULTADOS

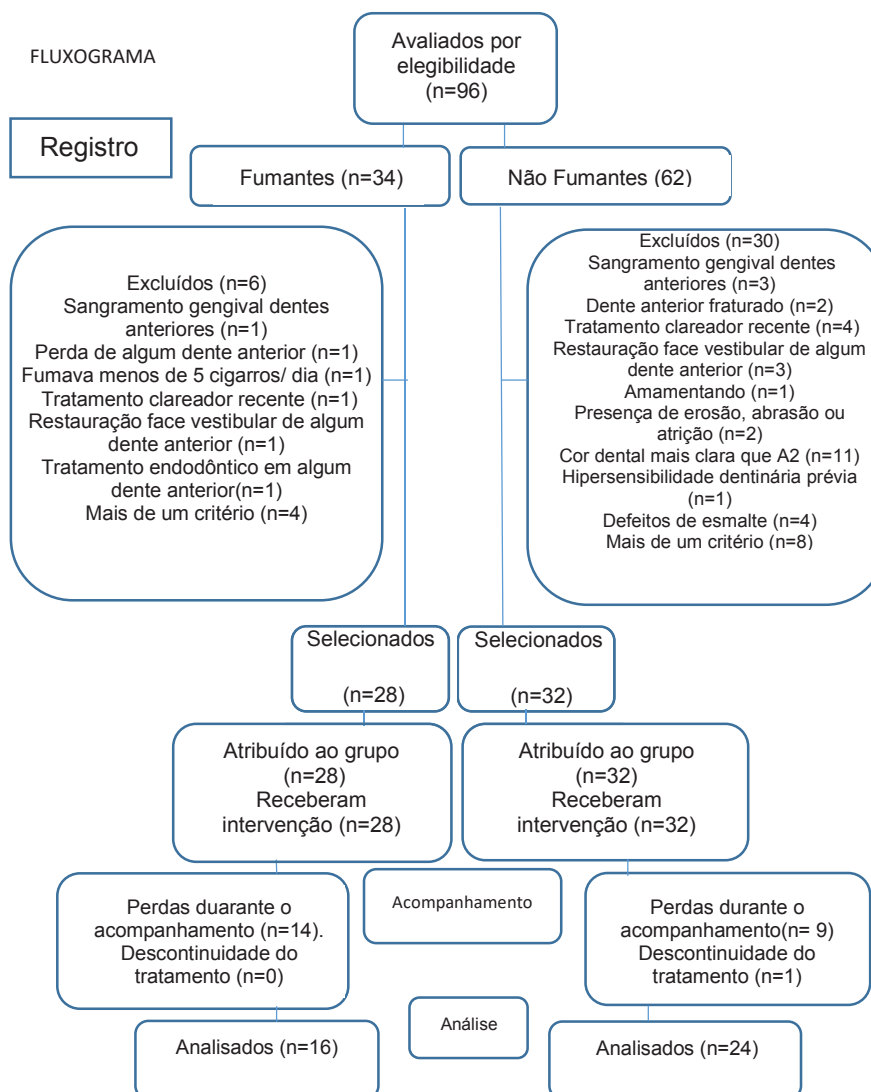
2.3.1 AMOSTRA

Foram examinados inicialmente 96 voluntários (62 NF e 34 F), de modo a obter 60 participantes. Destes, 30 NF e 6 F foram excluídos por não atender os critérios de inclusão e exclusão do estudo, assim a amostra inicial do estudo foi de 32 NF e 28 F.

Durante o período completo do estudo, houve a perda de 8 voluntários no grupo controle (NF) e 12 voluntários no grupo experimental (F), totalizando 24 participantes NF e 16 F. Assim ao todo foram analisados 40 voluntários (66,6%), que foram avaliados em quatro momentos: *baseline* (T0), um dia (T15), 15 dias (T30) e um mês (T45) após clareamento (Fluxograma 2.1). Os participantes desistentes alegaram falta de tempo para comparecerem às consultas de retorno ou não responderam às tentativas de contato do grupo de pesquisa. Durante os períodos de acompanhamento (T0 a T45), houve a perda de um voluntário NF em (T15), e quatro voluntários, dois NF e dois F em (T45) (Fluxograma 2.2).

As características epidemiológicas de ambos os grupos e número diário de cigarros consumidos pelo grupo de fumantes podem ser visualizados na Tabela 2.1. Não houve diferença estatística em idade dos pacientes F e NF, a maioria dos participantes era do sexo feminino, e fumavam em média 7,6 cigarros ao dia.

Fluxograma 2.1: Participantes selecionados para intervenção e que receberam tratamento clareador.



Fluxograma 2.2 Relação da perda de participantes durante os períodos de avaliação

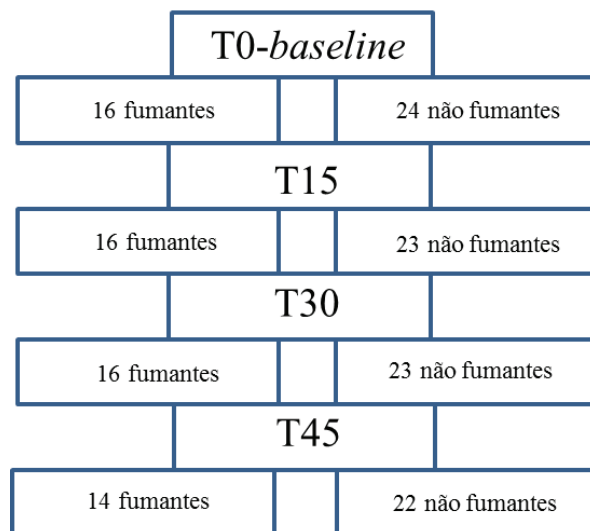


Tabela 2.1: Caracterização sócio demográfica dos participantes da pesquisa

Características	Fumantes (N=16) Média	Não Fumantes (N=24) Média
Idade média (\pm desvio padrão)	31,56 (\pm 10,55)	23,25 (\pm 5,90)
Sexo feminino (%)	9 (36%)	16 (64%)
Sexo masculino (%)	7 (46,67%)	8 (53,33%)
Média de Cigarros por dia (\pm desvio padrão)	7,6 (\pm 5,1)	-

2.3.2 RESULTADOS GENOTOXICIDADE

De acordo com os testes de Kruskal-Wallis e Dunn, a frequência de MN foi similar dentro dos grupos em todos os tempos avaliados ($p > 0,05$) (Tabela 2.3). Já, observando-se a frequência de AM, pode-se afirmar que houve um aumento significativo proporcional ao tempo avaliado ($p < 0,001$), sendo a menor frequência encontrada em (T0) e a maior em (T45) nos dois grupos (Figura 2.2). Ao se comparar a mediana da frequência de alterações celulares entre NF e F, nos períodos, por meio do teste estatístico Mann-Whitney, notou-se não haver diferença estatisticamente significativa na frequência de MN ($p > 0,05$) e AM ($p > 0,05$) entre os grupos de tratamento (Tabela 2.4, Figura 2.3).

Tabela 2.2 Frequência de micronúcleos entre os tempos T0-antes do clareamento (*baseline*) e T45-30 dias após término do clareamento para fumantes e não fumantes.

Frequência de Micronúcleos em Fumantes		
	T0	T45
Mediana	0 ^A	0 ^A
25%	0	0
75%	0	1
Frequência de Micronúcleos em Não Fumantes		
	T0	T45
Mediana	0 ^A	0 ^A
25%	0	0
75%	0	1

*Letras maiúsculas iguais na mesma linha correspondem à similaridade entre os tempos

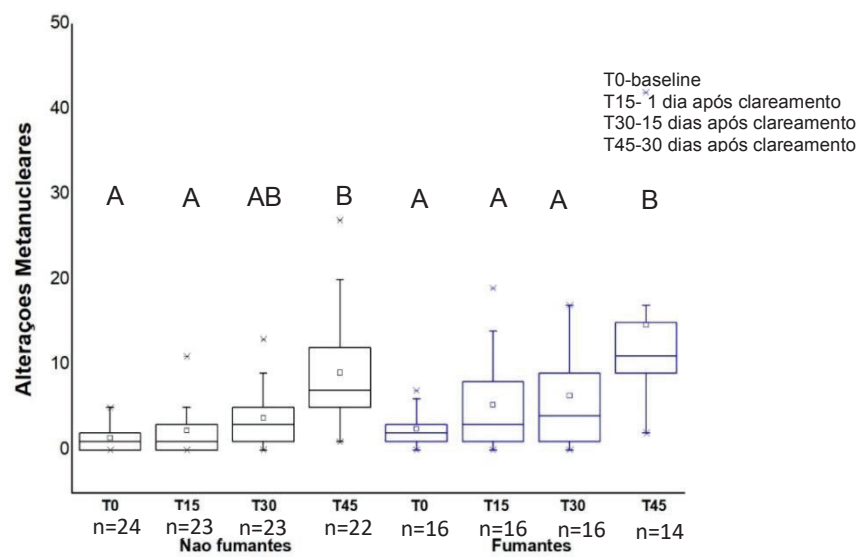


Figura 2.2 Boxplots da frequência de alterações metanucleares* entre os tempos para fumantes e não fumantes.

Alterações Metanucleares incluem: piconose, cariólise, broken-egg, células binucleadas, cariorrexe e botões nucleares. Diferentes letras maiúsculas correspondem a diferenças estatisticamente significativa para o mesmo grupo.

Tabela 2.3 Frequência de micronúcleos e alterações metanucleares entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação.

Micronúcleos			
	FUMANTES	NÃO FUMANTES	Valor de p
	Mediana (25%)-(75%)	Mediana (25%)-(75%)	
T15-T0	0 (0)-(0)	0 (0)-(0)	p=0,75
T30-T0	0 (0)-(0)	0 (0)-(0)	p=0,23
T45-T0	0 (0)-(1)	0(0)-(1)	p=0,82
T30-T15	0 (0)-(0)	0 (0)-(0)	p=0,63
T45-T15	0 (0)-(1)	0(0)-(1)	p=0,90
Alterações Metanucleares			
	FUMANTES	NÃO FUMANTES	Valor de p
	Mediana (25%)-(75%)	Mediana (25%)-(75%)	
T15-T0	2,0 (-1,5)-(6,5)	5,0 (-1,0)-(3,0)	p=0,45
T30-T0	2,5 (0)-(8,0)	1,0 (-1,0)-(5,0)	p=0,41
T45-T0	8,5 (3,0)-(14,0)	6,0 (4,0)-(10,0)	p=0,32
T30-T15	-1,0 (-3,5)-(-5,5)	2,0 (3,0)-(10,0)	p=0,25
T45-T15	6,0 (1,0)-(13,0)	6,0 (3,0)-(10,0)	p=0,25

*Alterações metanucleares incluem: picnose, cariólise, *broken egg*, células binucleadas, cariorrexe e botões nucleares.

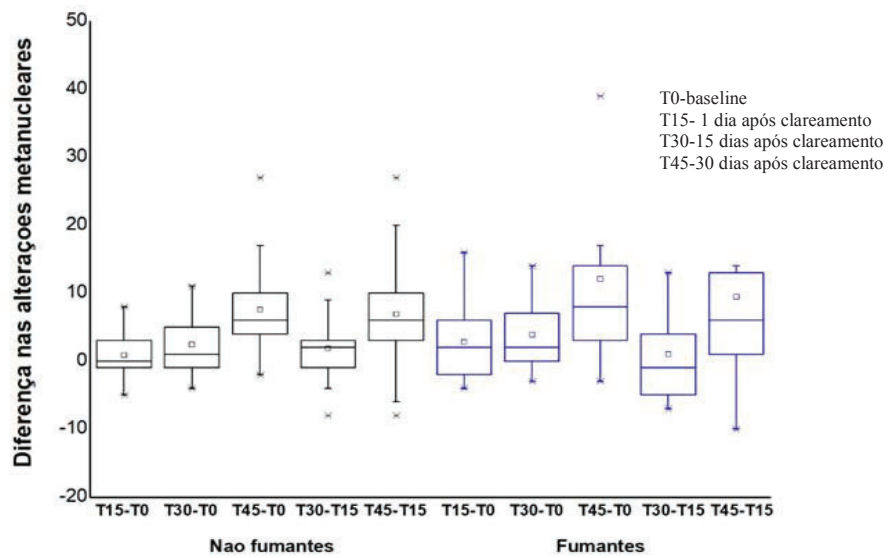


Figura 2.3 Boxplots das diferenças de alterações metanucleares* entre fumantes e não fumantes nos períodos de avaliação.
 Alterações Metanucleares incluem: picnose, cariólise, broken-egg, células binucleadas, cariorrexe e botões nucleares

2.4 DISCUSSÃO

A presente pesquisa foi realizada, tendo-se em vista a ausência de estudos prévios analisando genotoxicidade de células orais em pacientes fumantes que efetuaram clareamento dentário caseiro com peróxido de carbamida a 22%. A partir dos dados aqui apresentados, aceita-se a hipótese nula, já que o tabagismo associado com PC 22% não mostrou maior potencial genotóxico em células da mucosa bucal de F, sendo este efeito provavelmente neutralizado pelas células eucarióticas (RIBEIRO *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que, comparando os dados de genotoxicidade aqui apresentados com os de Almeida *et al.* (2015), Rezende *et al.* (2016) e Monteiro *et al.* (2018), notou-se concordância no sentido de que ambos os experimentos não identificaram maior quantidade de micronúcleos ao estudar agentes clareadores. Deve-se considerar, porém, que Almeida *et al.* (2015) estudaram PC a 10% e 16% e Rezende *et al.* (2016) avaliaram PH a 35%, assim como Monteiro *et al.* (2018) PH a 10% em diferentes apresentações, ambos sem associação com tabagismo.

A maior parte dos estudos que avaliam potencial genotóxico de agentes clareadores foi realizada *in vitro*, através de culturas celulares ou em modelos animais, os quais diferem dos estudos *in vivo*, pois experimentos *in vitro* demandam altas concentrações de peróxido, podendo aumentar indicadores de danos ao DNA de uma maneira dose-dependente (ALBUQUERQUE *et al.*, 2002; PLIGINA *et al.*, 2012). Diante do exposto, e em razão da falta de pesquisas acerca do efeito do peróxido de carbamida a 22% sobre células da mucosa oral de indivíduos tabagistas, o

presente estudo foi conduzido de forma clínica, ou seja, avaliou o efeito do tratamento clareador em seu ambiente natural.

No presente estudo, buscou-se avaliar se o hábito tabagista associado ao tratamento clareador caseiro com PC 22% apresenta potencial genotóxico, uma vez que há relatos na literatura de que ambos avaliados separadamente através do teste de MN podem aumentar a genotoxicidade (SUHAS *et al.*, 2004; BANSAL *et al.*, 2012; NADERI *et al.*, 2012; KLARIC *et al.*, 2013) e até mesmo causar danos genéticos em células da mucosa oral, que dependendo da extensão, provocam consequências como imparidade do ciclo celular, morte celular e formação de neoplasias malignas (LUCIER *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2017). No entanto, baseado nos resultados obtidos com a presente pesquisa, a associação do clareamento caseiro com tabagismo não foi considerada genotóxica, avaliando-se micronúcleos.

A quantidade de MN em células normais da mucosa oral pode chegar até 2,0 MN/1000 células (1,7%) (BONASSI *et al.*, 2011; REZENDE *et al.*, 2016), índice este compatível com as análises celulares sugestivas de ausência de genotoxicidade realizadas no presente estudo, para ambos os grupos avaliados.

Em um estudo conduzido na principal cidade da Turquia, verificou-se que a maior parte dos pacientes estava descontente com a cor de seus dentes e que o tratamento clareador era o mais desejado (AKARSLAN *et al.*, 2009). Isto procede, uma vez que o clareamento dentário é o procedimento estético mais realizado nos consultórios odontológicos. Sabe-se que tal procedimento pode ser realizado através de duas formas: a) em consultório, fazendo o uso de agentes clareadores mais concentrados; e b) caseiro, no qual se utilizam concentrações mais baixas

de agente clareador (MEIRELES *et al.*, 2008; MEIRELES *et al.*, 2010; BERNARDON *et al.*, 2010), sendo seus principais efeitos colaterais a irritação gengival (ALMEIDA *et al.*, 2015 REZENDE *et al.*, 2016), a redução da dureza do esmalte, sendo essa dependente da concentração do produto (GRAZIOLI *et al.*, 2018), e sensibilidade dentinária (KOSSATZ *et al.*, 2012; BERNARDON *et al.*, 2016; MARAN *et al.*, 2018).

A irritação dos tecidos moles pode ocorrer em ambas as técnicas (BERNARDON *et al.*, 2016; REZENDE *et al.*, 2016). Na técnica de clareamento dental caseiro, o desenho anatômico da moldeira, geralmente a 1mm além da margem gengival e ainda a flexibilidade do material de silicone, permitem a extrusão do gel e possível contato do mesmo com tecidos moles orais (KIRSTEN *et al.*, 2009). Este contato acidental do oxigênio reativo e radicais livres com as células potencialmente causa queimaduras e ulcerações, podendo interagir com o DNA celular e provocar danos oxidativos que alteram a capacidade de reparação do conteúdo genético (KAWAMOTO *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2015, GEUS *et al.*, 2015a; REZENDE *et al.*, 2016). Entretanto, no presente estudo, embora tenha sido avaliada a genotoxicidade do gel de peróxido de carbamida a 22%, não foram notadas diferenças estatisticamente significativas de MN e AM entre os grupos estudados e entre os períodos de tempo avaliados ($p > 0,05$). Tais resultados podem ser explicados pelas perdas amostrais que ocorreram no decorrer do experimento, uma vez que foi notado um maior número de AM em indivíduos fumantes e não fumantes, proporcionalmente ao tempo de avaliação.

Os dados encontrados no presente estudo corroboram em partes com os de Bonacina *et al.* (2020), os quais avaliaram a genotoxicidade do PC 22%, uma vez que tais autores também notaram um aumento significativo

na frequência de AM. Porém, ao passo que no estudo anteriormente citado houve uma redução significativa de AM na avaliação realizada um mês após o término do clareamento, no presente estudo o número elevado de AM perdurou na avaliação (T45) ($p < 0,001$) (30 dias após o término do clareamento). Com relação ao número de MN, os resultados do presente estudo corroboram com os de Bonacina *et al.*, (2020), uma vez que não foram notadas alterações de células micronucleadas durante e após o tratamento clareador. Tendo em vista que os estudos com PC 22% ainda são incipientes, sugere-se a realização de mais pesquisas longitudinais a fim de avaliar por um maior período de tempo a manutenção ou não dos níveis elevados de AM.

No presente estudo, comparando-se a frequência de AM entre os grupos de F e NF nos períodos, não foi constatada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), o que indica que o tabagismo não atua como fator agravante da genotoxicidade proporcionada pelo gel clareador.

Existem atualmente poucos estudos clínicos que avaliaram genotoxicidade de clareadores através de AM (KLARIC *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2018; BONACINA *et al.*, 2020). No presente estudo foi notado um aumento de AM do início ao fim das avaliações, em ambos os grupos, o que não ocorreu com a frequência de MN. Esta característica corrobora com os resultados de Nersesyan *et al.* (2011), que relacionaram o impacto do alcatrão e nicotina contidos em diferentes tipos de cigarros com danos cromossômicos nas células da mucosa oral, revelando a importância de avaliar o espectro completo de anormalidades nucleares e citológicas (NERSESYAN *et al.*, 2011).

Bonassi *et al.* (2011) afirmam que a quantidade de cigarros diários consumida por um indivíduo está relacionada com o aumento de MN em

células esfoliadas da mucosa oral. No estudo GEUS *et al.*, (2015) avaliou-se a frequência de MN em F e NF submetidos ao tratamento clareador, os F já apresentaram um maior número significativo de MN em comparação aos NF antes de executarem tratamento clareador, porém essa frequência não foi significativamente maior nos primeiros comparando os períodos antes e depois do procedimento. Na presente pesquisa foi encontrado que F e NF não apresentaram maior número significativo de MN comparando-se os tempos e os grupos, a diferença de resultados explica-se pois no estudo anteriormente citado os participantes consumiam maior quantidade de cigarros diários (13,2) e aqui os fumantes faziam uso de menor quantidade diária de cigarro, portanto corroborando em partes com o segundo estudo anteriormente citado.

As limitações deste estudo foram o tamanho amostral de voluntários tabagistas (16). Outro ponto a ser considerado é que o acompanhamento dos voluntários foi de curto prazo (um mês após o término do tratamento clareador). Assim, futuros estudos com maior número amostral e períodos de acompanhamento mais longos são necessários, de forma a assegurar que o clareamento caseiro com PC 22% associado ao tabagismo não seja considerado genotóxico.

2.5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir, que tabagismo associado ao tratamento clareador caseiro com PC 22%, não apresentou potencial genotóxico quando MN foram avaliados. No entanto, houve um aumento de AM diretamente proporcional ao tempo de avaliação para ambos os grupos.

REFERÊNCIAS

- AKARSLAN, Z. Z.; SADIK, B.; ERTEN, H.; KARABULUT, E.; Dental Esthetic satisfaction received and desired dental treatments for improvement of esthetics, *Indian Journal of Dental Research*, v.20, n.2, p.195-200, 2009.
- ALMEIDA, A. F.,TORRE,E .N., SELAYARAN ,M. S. ,LEITE, F. R. M., DEMARCO, F. F., LOGUERCIO, A. D., ETGES, A., Genotoxic potential of 10% and 16% carbamide peroxide in dental bleaching, *Brazilian Oral Research*, v.29,n.1, 2015.
- ALBUQUERQUE, R. C. GOMEZ, R. S.; DUTRA, R.; VASCONCELOS,W. A.; GOMEZ, R. S. GOMEZ, M.V.; Effects of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on rat oral epithelium proliferation, *Brazilian Dental Journal*, v.13, n.3, p.162-165, 2002.
- ANGELIERI, F. MOLEIRINHO,T. C. G.; CARLIN, V.; OSHIMA, C. T. F.; RIBEIRO, D. A.; Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and no smokers, submitted at panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue, *Clinical Oral Investigations*, v.14, n.6, p.669-674, 2010.
- BANSAL, H.; SANDHU, V. S.; BHANDARI, R.; SHARM, D.; Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population, *Contemporary Clinical Dentistry*, v.3, n.2, p.184-7, 2012.
- BERNARDON, J. K.; SARTORI, N.; BALLARIN, A.; PERDIGÃO, J.; LOPES, G.C.; BARATIERI, L. N.; Clinical performance of vital bleaching techniques, *Operative Dentistry*,v.35, n.1 p.3-10, 2010.
- BERNARDON, J. K.; VIEIRA MARTINS, M.; BRANCO RAUBER, G. MONTEIRO JUNIOR, S.; BARATIERI, L. N.; Clinical evaluation of different desensitizing agents in home-bleaching gels, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v.115, n.6, p.692-6, 2016.
- BONACINA, L.V.; VARGAS,C. A.; VANINI, J.; ZANDONÁ, J.; SILVA,R. R.; BUSIN,C. S.;BENETTI, P.; CARLI, J.P.; Genotoxicity of 22% Carbamide Peroxide Bleaching Agent on Oral Cells using the

Micronucleus Technique, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v.14, n.3, p.14-17, 2020.

BORTOLUZZI, M. C.; CAMPAGNOLLI, E. B.; MILAN, J. R.; REINHEIMER, A.; MASSON, M.; CAPELLA, D. L.; Frequency of micronucleus in oral epithelial cells after exposure to mate-tea in healthy humans, *Oral Medicine and Patology*, v.19, n.4, p.345-349, 2014.

BONASSI, S *et al.* The human MicroNucleus project on exfoliated bucal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status and assay protocol, *Mutation Research*, v.728, n.3, p.88-97, 2011.

CARRARD, V. M.; COSTA, C. H.; FERREIRA, L. C.; LAUXEN, I. S.; RADOS, P. V.; Teste dos Micronúcleos-Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal, *Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre*, v.48, n. 1/3, p.77-81,2007.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; ZEIGER, E.; CHANG, W. P.; BURGAZ, Z.; THOMAS, P.; BONASSI, S.; The HUMN and HUMNXL international coloboration projects on human micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis*, v.26, n.1, p.239-245, 2010.

FIRMANI, M.; REYES, M., BECERRA, N.; FLORES, G., WEITZMAN, M.; ESPINOSA, M.; Sleep bruxism in childrens and adolescents, *Revista Chilena de Pediatria*, v.86,n.5,p.373-379,2015.

GARCIA, J. F. R.; VELASCO-SALDAÑA, F. R. SANCHEZ-DE LA ROSA, S.V.; ORTIZ-GARCÍA, Y. M.; VELAZQUÉZ-MORALES, G.; MEDA-GOMÉZ, B. C.; GONZÁLEZ-ZÚÑIGA, G.M.; PARADA-SANCHEZ, M.G.; ZAMORA-PEREZ, A.L.; In vivo evaluation of the genotoxixcity and oxidative damage on individuals exposed to 10% hydrogen peroxide whitening strips, *Clinical Oral Investigations*, v.23, n.7, p. 3033-3046, 2019.

GEUS, J. L. REZENDE, M.; MARGRAF, L. S.; BORTOLUZZI, M. C.; FERNANDÉZ, E.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. D.; KOSSATZ, S.; Evaluation of Genotoxicity and Efficacy of At-home Bleaching in

Smokers: A Single-blind Controlled Clinical Trial, *Operative Dentistry*, v.40, n.2, p.47-55, 2015a.

GEUS, J. L. BERSEZIO, Z.; URRUTIA, J.; YAMADA, T.; FERNANDÉZ, E.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A.; KOSSATZ, S.; Effectiveness of and tooth sensitivity with at-home bleaching in smokers, *Journal of the American Dental Association*, v.146, n.4, p.233-40, 2015c.

GRAZIOLI, G.; VALENTE, L. L.; ISOLAN, C. P.; PINHEIRO, H. A.; DUARTE, C.G.; MUNCHOW, E. A.; Bleaching and enamel surface interactions resulting from the use of highly-concentrated bleaching gels, *Archives of Oral Biology*, 87 p.157-162, 2018.

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

KAWAMOTO, K.; TSUJIMOTO, Y.; Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching, *Journal of Endodontics*. v.30, n.1, p.45-50, 2004;

KIRSTEN, G. A.; FREIRE, A.; de LIMA, A. A.; IGNÁCIO, S. A.; SOUZA, E. M.; Effect of reservoirs on gingival inflammation after home dental bleaching, *Quintessence International*, v.40, n.3, p.195-202, 2009.

KLARIC, E.; PAR, M.; PROFETA, I.; KOPIJAR, N.; ROZGAJ, R.; KASUBA, V.; ZELJEZIC, D.; TARLE, Z.; Genotoxic effect of two bleaching agents on oral mucosa, *Cancer Genomics & Proteomics*, v.10, n.5, p.209-216, 2013.

KNUTSSON, B.; MUKKA, S.; WAHLSTRÖM, J.; JÄRVHOLM, B.; SAYED-NOOR, A. S.; The association between tobacco smoking and surgical intervention for lumbar spinal stenosis: cohort study of 331,941 workers, *The Spine Journal*, v.18, n.8, p.1313-1317, 2017.

KOSSATZ, S.; MARTINS, G.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A.; Tooth sensitivity and bleaching effectiveness associated with use of a calcium-containing in-office bleaching, *Journal of the American Dental Association*, v.143, n.12, p. 81-7, 2012.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P.; Plano de Tratamento, In: Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. Quarta edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p.401-418.

LUCIER, R.N.; ETIENNE, O.; FERREIRA, S.; GARLICK, J.A.; KUGEL, G.; EGLES, C.; Soft-tissue alterations following exposure to tooth-whitening agents. *Journal of Periodontology*, v.84, n.4, p.513-519, 2013.

MARAN, B. M.; VOCHIKOVSKI, L.; HORTKOFF, D. R. A.; STANISLAWCZUK, R.; LOGUERCIO, A.; REIS, A.; Tooth sensitivity with a desensitizing-containing at-home bleaching gel – a randomized triple-blind clinical trial, *Journal of Dentistry*, 72, p.64-70, 2018.

MEIRELES, S. S.; HECKMANN, S. S.; LEIDA, F. L.; SANTOS, I. S.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F.; Efficacy and safety of 10% and 16% carbamide peroxide tooth-whitening gels: a randomized clinical trial., *Operative Dentistry*, v.33, n.6, p.606-612, 2008.

MEIRELES, S. S.; SANTOS, I. S.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F. A double-blind randomized clinical trial of two carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up, *Journal of Dentistry*, v.38, n.12, p.956-63, 2010.

MONTEIRO M. J. F.; LINDOSO, J. B. C.; CONDE, N. C. O.; SILVA, L. M.; LOGUERCIO, A. D.; PEREIRA, J. V.; Evaluation of the genotoxic potential of different delivery methods of at-home bleaching gels: A single-blind, randomized clinical trial, *Clinical Oral Investigations*, v.23, n.5, p.2199-2206, 2018.

MUNRO, I.C.; WILLIAMS, G.M.; HEYMANN, H.O.; KROES, R.; Use of hydrogen peroxide-based tooth whitening products and its relationship to oral cancer. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v.18, n.3, p.119-125, 2006.

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

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

PLIGINA, K. L. RODINA, I. A.; SCHEVCHENKO, T. V.; BECKCHANOVA, E. S.; TIKHONOV, V. P.; SIROTA, N. P.; DNA-Damaging Effects of Dental Bleaching Agents, *Bulletin of experimental biology and medicine*, v.153, n.1, p.57-60, 2012.

RIBEIRO, D. A.; YUJRA, V. Q.; DE MOURA, C. F. G.; HANDAN, B. A.; DE BARROS VIANA, M.; YAMAUCHI, L. Y.; CASTELO, P. M.; AGUIAR, O. JR.; Genotoxicity Induced by Dental Materials: A Comprehensive Review, *Anticancer Research*, v.37, n.8, p.4017-4024, 2017.

REZENDE, M.; DE GEUS, J. L.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. KOSSATZ, D.; Clinical Evaluation of Genotoxicity of In-office Bleaching, *Operative Dentistry*, v.41, n.6, p.578-586, 2016.


SUHAS, S.; GANAPATHY, K. S.; DEVI, M. G.; RAMESH, C.; Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer, *Mutation Research*, v.561, n.1-2, p.15-21, 2004.

TEREZHALMY, G. T.; WALTERS, A. P.; BARTIZEK, R. D.; GRENDER, J. M.; BIESBROCK, A. R.; A clinical evaluation of extrinsic stain removal: A rotation-oscillation power toothbrush versus a dental prophylaxis, *The Journal of Contemporary Dental Practice*, v.9, n.5, p.1-8, 2008.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M. T.; Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers, *Mutation Research*, v.388, n.1, p.85-95, 1997.

ANEXOS

Anexo 1- Parecer da Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO/ VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: Influência do tabagismo na genotoxicidade, mudança de cor e sensibilidade após clareamento dental caseiro: ensaio clínico controlado	
Pesquisador: Paula Benetti	
Área Temática:	
Versão: 2	
CAAE: 02668618.0.0000.5342	
Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	
DADOS DO PARECER	
Número do Parecer: 3.095.118	
Apresentação do Projeto: O projeto foi apresentado na íntegra pelos pesquisadores.	
Objetivo da Pesquisa: a) Comparar a genotoxicidade de agentes clareadores em pacientes fumantes e não fumantes, testando a hipótese de que o clareamento não influencia o número de micronúcleos e alterações metanucleares;b) Avaliar a alteração de cor dentária em pacientes fumantes e não fumantes após clareamento, testando a hipótese de que o clareamento será efetivo em ambos os grupos;c) Avaliar a sensibilidade dentinária e irritação gengival durante e após o clareamento, testando a hipótese de que o tabagismo não influencia o aparecimento desses efeitos adversos.	
Avaliação dos Riscos e Benefícios: Risco mínimo, que incluem: sensibilidade dentinária, irritação gengival e alteração celular (mucosa gengival) temporária. Benefícios: Clareamento dentário	
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo avaliará o efeito do tabagismo na genotoxicidade, sensibilidade e na mudança de cor após clareamento dental caseiro. É estudo clínico randomizado duplo-cego com 60 pacientes entre 18 e 35 anos de idade, que serão divididos em 2 grupos (n=60): G1- 30 pacientes não fumantes e; G2- 30 pacientes fumantes moderados. Ambos os grupos serão submetidos à	
Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-900 UF: RS Município: PASSO FUNDO E-mail: cep@ufpf.br Telefone: (54)3316-6157	
<small>Página 01 de 03</small>	

Continuação do Parecer: 3.085.118

clareamento caseiro com peróxido de carbamida (PC) em concentração de 22%, aplicado em moldelras individuais 1hora por dia, durante 14 dias. Todas as análises serão realizadas antes (T0-baseline), 1 dia após a finalização do clareamento (TF-final), 7 dias após o término (T7D) do tratamento clareador, 15 dias (T15D) 1 mês (T1M) e 6 meses após o tratamento (T6M). A genotoxicidade será avaliada pela análise de raspado superficial da gengiva e lábio superior. Para cada coleta, o material será corado por Giemsa a 10% e em seguida dois observadores farão a contagem de alterações metanucleares, células binucleadas e micronúcleos em 2.000 células de cada paciente. A sensibilidade durante o tratamento clareador será avaliada pela Escala Visual Analógica (EVA), com escores variando de 0 (nenhum) a 5 (severa). A alteração de cor será avaliada utilizando a escala Vita BleachedGuide 3D MASTER™ (avaliação subjetiva) e um espectrofotômetro Vita Easyshade™ (avaliação objetiva). A coleta e análise dos dados serão realizadas de forma cega. Os dados serão analisados por Mann-Whitney ($\alpha=0,05$).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os direitos fundamentais dos participantes foram garantidos no projeto e no TCLE. O protocolo foi instruído e apresentado de maneira completa e adequada. Os compromissos do pesquisador e das instituições estavam presentes. O projeto foi considerado claro em seus aspectos científicos, metodológicos e éticos.

Recomendações:

Após o término da pesquisa, o CEP UPF solicita:

- A devolução dos resultados do estudo aos sujeitos da pesquisa ou a instituição que forneceu os dados;
- Enviar o relatório final da pesquisa, pela plataforma, utilizando a opção, no final da página, "Enviar Notificação" + relatório final.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto, este Comitê, de acordo com as atribuições definidas na Resolução n. 466/12, do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde, Brasil, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa na forma como foi proposto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I - Centro Administrativo
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-900
UF: RS Município: PASSO FUNDO
Telefone: (54)3315-8157 E-mail: cep@upf.br

UNIVERSIDADE DE PASSO
FUNDO/ VICE-REITORIA DE
PESQUISA E PÓS-



Continuação do Parecer: 3.085.118

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_1254140.pdf	12/12/2018 16:35:06		Aceito
Outros	Respostacep.pdf	12/12/2018 16:34:47	Paula Benetti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEREvisado.pdf	12/12/2018 16:29:46	Paula Benetti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoRodrigoCEPREvisado1212.pdf	12/12/2018 16:29:12	Paula Benetti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizaRodrigo.pdf	10/11/2018 19:53:15	Paula Benetti	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PesquisaN.pdf	10/11/2018 13:00:18	Paula Benetti	Aceito
Outros	instrumentocoleta.pdf	10/11/2018 12:59:43	Paula Benetti	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TCUD.pdf	10/11/2018 12:53:20	Paula Benetti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ORCAMENTO.pdf	10/11/2018 12:53:03	Paula Benetti	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	direcaofo.pdf	10/11/2018 12:47:40	Paula Benetti	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	10/11/2018 12:42:07	Paula Benetti	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	10/11/2018 12:41:56	Paula Benetti	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PASSO FUNDO, 19 de Dezembro de 2018

Assinado por:
Felipe Cittolin Abal
(Coordenador(a))

Endereço: BR 285- Km 292 Campus I- Centro Administrativo
Bairro: Divisão de Pesquisa / São José CEP: 99.052-900
UF: RS Município: PASSO FUNDO E-mail: cep@ufjf.br
Telefone: (54)3316-8157

APÊNDICES

Apêndice 1-Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TCLE)**

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa sobre Influência do tabagismo na genotoxicidade, mudança de cor e sensibilidade após clareamento, de responsabilidade do pesquisador Rodrigo Rohenkohl Silva, orientado pelos Professores Paula Benetti e João Paulo De Carli. Esta pesquisa irá comparar as células da boca, cor dos dentes, irritação gengival e sensibilidade após o clareamento dentário de pacientes que fumam e que não fumam.

Os objetivos desta pesquisa são:

- a) investigar possíveis diferenças de clareamento dentário, sensibilidade dental e irritação gengival entre pacientes fumantes e não fumantes;
- b) averiguar se o clareamento dentário tem capacidade de aumentar a frequência de alterações das células da gengiva, e se esse aumento será maior em fumantes do que em não fumantes;

A sua participação na pesquisa ocorrerá em pelo menos 4 encontros:

- 1- antes do início do procedimento clareador, para limpeza, verificação da cor e moldagem dos dentes;
- 2 – 1 dia após o término do clareamento; para limpeza, verificação da cor e possíveis efeitos adversos;
- 3 – 15 (quinze) dias após o término do clareamento; para limpeza, verificação da cor e possíveis efeitos adversos;
- 4- 1 (um) mês após o término do clareamento; para limpeza, verificação da cor e possíveis efeitos adversos;

Cada sessão terá aproximadamente 30 minutos de duração, na Faculdade de Odontologia da Universidade de Passo Fundo, clínica da Pós-Graduação 2º andar, em horário previamente combinado com você.

O procedimento clareador será realizado por você em casa, utilizando o gel clareador e moldeira fornecida pelos pesquisadores. Uma gota do gel deverá ser colocado na parte interna da moldeira correspondente aos dentes a serem clareados. Você posicionará a moldeira sobre os dentes e manterá por 1 h. Após esse tempo, a moldeira deve ser removida, lavada com água corrente. Você pode remover o gel clareador dos dentes com bochechos com água. Você repetirá este procedimento por 14 dias.

A genotoxicidade será avaliada com o pesquisador raspando através de uma espátula de madeira a sua gengiva superior, é um exame rápido e indolor.

Os riscos são mínimos. Você poderá sentir um pouco de desconforto, como sensibilidade ou irritação gengival durante o clareamento dentário. O procedimento de raspagem da mucosa para verificação da alteração celular poderá gerar desconforto transitório que desaparecerá em alguns segundos. No caso de sensibilidade intensa, será feito tratamento com dessensibilizante (Dessensibilize KF 2%-FGM) pelos pesquisadores. Será solicitado à você que responda um questionário de hábitos alimentares e higiene oral, 1 mês após tratamento clareador. Está garantida assistência integral e gratuita, pelo tempo que for necessário, nos casos de danos que ocorrerem direta ou indiretamente da participação no estudo.

Participando da pesquisa, você terá os seguintes benefícios dentes mais claros e saberá se sua gengiva (no caso dos fumantes) apresenta células alteradas ou saudáveis. Você poderá ter acesso aos resultados da pesquisa, quando finalizada. Você terá a garantia de receber esclarecimentos sobre qualquer dúvida relacionada à pesquisa e poderá ter acesso aos seus dados em qualquer etapa do estudo. Sua participação nessa pesquisa não é obrigatória e você pode desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento. É importante ressaltar a garantia do sigilo sobre sua identidade e da confidencialidade dos dados. As suas informações serão registradas e utilizadas somente para fins acadêmicos (escrita de dissertação de mestrado, artigo científico e apresentação em eventos e congressos). Você não terá qualquer despesa e não receberá pagamento pela sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas sobre qualquer aspecto da pesquisa que não constam no TCLE ou se sinta prejudicado (a) na sua dignidade e autonomia, você pode entrar em contato com o pesquisador Rodrigo Rohenkohl Silva (66) 999275534/ (65) 999082398, ou com o curso (Faculdade de Odontologia da UPF- PPGOdonto – (54) 33168395), ou também pode consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UPF, pelo telefone (54) 3316-8157, no horário das 08h às 12h e das 13h30min às 17h30min, de segunda a sexta-feira.

Dessa forma, se você concorda em participar da pesquisa como consta nas explicações e orientações acima, coloque seu nome no local indicado abaixo.

Desde já, agradecemos a sua colaboração e solicitamos a sua assinatura de autorização neste termo, que será também assinado pelo pesquisador responsável em duas vias, sendo que uma ficará com você e outra com o pesquisador.

Passo Fundo, ____ de ____ de ____.

Nome do (a) participante: _____

Assinatura: _____

Nome do (a) pesquisador (a):

Assinatura: _____

Apêndice 2 – Ficha de Dados Pessoais, Anamnese e Exame Clínico

Ficha de Dados Pessoais, Anamnese e Exame clínico

Nome completo:		
Idade:	Data de Nascimento: ____ / ____ / ____	Sexo: (F) (M)
Profissão:		
Escolaridade (em anos de estudo):		
Endereço residencial:		
Bairro:	Cidade:	
Tel. residencial:	Celular:	Whatsapp:
E-mail:	Instagram/Facebook:	
Nome de um parente ou amigo:		
Telefone deste:		

EXAME ANAMNÉSICO

SIM NÃO

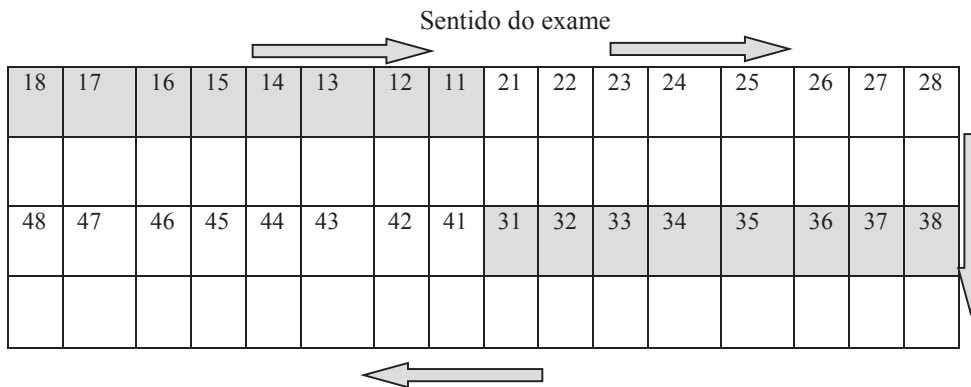
		Está sob tratamento médico?
		Teve ou tem problemas cardíacos?
		Teve ou tem tuberculose ou outro problema pulmonar?
		É diabético?
		É alérgico ou sensível a algum medicamento?
		Tem hemorragia após extrações dentárias?
		Tem ou teve problemas com anestesia?
		Tem tido desmaios ou tonturas?
		Grávida ou lactante?
		Já realizou tratamento clareador alguma vez?
		É fumante?
		Quantos cigarros por dia costuma fumar?
		Há quanto tempo faz o uso de cigarro ?
		Apresenta hábitos parafuncionais (bruxismo, apertamento)?
		Faz uso de algum medicamento? Qual?
		Há possibilidade de voltar para as reavaliações 1 dia, 7 dias, 15 dias, 1 mês, 6 meses, 1 ano e 2 anos após o término do clareamento?
		Suas gengivas sangram? Quando?
		Apresenta ou apresentou alguma neoplasia ou lesão cancerizável na cavidade oral?
		Apresentou alguma patologia que causou alteração na cor dos dentes?

Ficha de Exame Clínico

SIM NÃO

		Possui tratamento endodôntico em algum dos seguintes dentes 15 a 25/35 a 45?
		Apresenta alguma restauração na face vestibular dos dentes anteriores superiores?
		Perda ou fratura de algum dente ântero-superior?
		Presença de dentes com lesões de abrasão, erosão ou abfração?
		Apresenta histórico de hipersensibilidade dentinária prévia?
		Apresenta defeitos estruturais na superfície do esmalte?
		Apresenta dispositivo ortodôntico nos dentes anteriores superiores e inferiores?
		Apresenta alguma lesão cervical cariiosa ou não cariiosa nos dentes anteriores superiores?
		Apresenta algum tipo de prótese nos dentes anteriores superiores?

CONDIÇÕES DA COROA DENTÁRIA



CPOD: ____ C: ____ P: ____ O: ____	OBSERVAÇÕES: _____ _____ _____
---	--------------------------------------

Apresenta hipoplasia, manchas por fluorose ou tetraciclina? Se sim, especificar os dentes:

Como se encontra a saúde gengival do paciente? Gengiva saudável, gengivite (leve, moderada ou severa) ou periodontite?

Exame físico

Higiene Oral:

() Boa () Ruim

Boa Saúde Periodontal, ISG < 25%

() sim () não

Apêndice 3-Instrução do uso do gel clareador
UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Instruções de uso do gel clareador

Você está realizando um tratamento clareador caseiro com peróxido de carbamida a 22%, siga todas as instruções abaixo e lembre-se de que este tratamento deve sempre ser acompanhado por um cirurgião-dentista;

- 1-Pressione o êmbolo da seringa para aplicar o gel nos rebaixes da moldeira, o ideal é uma pequena gota para cobrir o dente.
- 2- Aplique esta pequena gota do gel clareador na região da moldeira que corresponde parte da frente do dente.
- 3-Leve a moldeira até a boca, encaixe-a e faça leve pressão na mesma, para que os dentes fiquem cobertos com o gel.
- 4-O excesso de gel pode ser removido com o dedo ou escova.
- 5-O gel deve ser utilizado durante 1h por dia por 14 dias, qualquer desconforto ou observação mais importante devem ser comunicados à equipe de pesquisa.
- 6-Decorrido 1h do uso da moldeira com o gel, a mesma deve ser lavada com água corrente e seca, o gel deve ser guardado em local seco e protegido da luz, entre 5° e 25°C.
- 7-Para remover o gel da superfície dental, faça bochechos com água corrente e passe a escova levemente sem pasta dental nos dentes.
- 8-É normal sentir durante o clareamento sensibilidade, devido à variações na temperatura, esta pode ser tratada e minimizada com procedimentos prescritos pelo cirurgião-dentista. Em caso de muita sensibilidade, comunique à equipe de pesquisa imediatamente.
- 9-Pode haver durante o tratamento clareador, uma leve irritação na gengiva, lábio, garganta e língua, por provável excesso de gel na moldeira, não faça auto medicação, comunique à equipe de pesquisa caso haja alguma reação maior ou problema.
- 10-Evite a ingestão de bebidas ou alimentos ácidos durante o tratamento clareador (limão, abacaxi) estes podem aumentar a sensibilidade dentinária.
- 11- É importante realizar uma adequada higiene oral durante o tratamento clareador com escova, pasta de dentes e fio dental.
- 12- Não faça a ingestão de alimentos e bebidas durante o tempo que estiver usando a moldeira.

13- Faça corretamente o acompanhamento do tratamento com a equipe de pesquisa, 1 dia após, 1 semana, 15 dias 1 mês e 6 meses após o clareamento.

14- No retorno, a bisnaga e a ficha da sensibilidade dentinária deverão ser trazidas.

15- Não realize nenhum outro tipo de tratamento clareador durante o estudo.

16- Não fazer o uso de dentifrício ou colutório bucal que contenha agente clareador na composição.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi inicialmente desenvolvido para investigar o efeito do tabagismo no clareamento dental caseiro, utilizando o gel clareador peróxido de carbamida a 22%. Esta concentração de PC foi recentemente disponibilizada comercialmente e há pouca literatura sobre branqueamento, alteração de cor e genotoxicidade.

Apesar do hábito de fumar, os fumantes apresentaram cor semelhante aos não-fumantes antes do clareamento. Os não fumantes obtiveram maior clareamento dentário que os fumantes, especialmente nos dentes incisivos centrais (em contato direto com a fumaça do cigarro) e caninos (mais cromatizados). Além disso, os fumantes tiveram escurecimento (recuperação de cor) maior que os não fumantes 30 dias após o término do clareamento dental.

Além disso, estudo mostrou a alteração de cor por diferentes métricas: a mais frequentemente reportada, CIELAB, o CIEDE2000 com seus coeficientes ajustados de cor, além do recentemente introduzido Índice de Clareamento para Odontologia (WID). Neste estudo, o WID foi mais sensível (detecta mais) às alterações de cor resultantes do clareamento, portanto, é indicado para estudos de clareamento.

Quanto à genotoxicidade, o estudo investigou células bucais de locais próximos à aplicação do agente clareador e contou o número de micronúcleos e alterações metanucleares. O número de MN e AM aumentou na mesma proporção entre fumantes e não fumantes, mostrando que o tabagismo não aumentou o potencial genotóxico do clareador.

REFERÊNCIAS

American Dental Association (2006) ADA Acceptance Program Guidelines Dentist-dispensed home-use tooth bleaching products <http://www.ada.org/ada/seal/>

AKARSLAN, Z. Z.; SADIK, B.; ERTEN, H.; KARABULUT, E.; Dental Esthetic satisfaction received and desired dental treatments for improvement of esthetics, *Indian Journal of Dental Research*, v.20, n.2, p.195-200, 2009.

ALMEIDA, A. F.; TORRE, E. N.; SELAYARAN, M. S.; LEITE, F. R. M.; DEMARCO, F. F.; LOGUERCIO, A. D., ETGES, A., Genotoxic potential of 10% and 16% carbamide peroxide in dental bleaching, *Brazilian Oral Research*, v.29, n.1, 2015.

ALBUQUERQUE, R. C. GOMEZ, R. S.; DUTRA, R.; VASCONCELOS, W. A.; GOMEZ, R. S. GOMEZ, M. V.; Effects of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on rat oral epithelium proliferation, *Brazilian Dental Journal*, v.13, n.3, p.162,-165, 2002.

ALANDIA-ROMAN, C. C.; CRUVINEL, D. R.; SOUSA, A. B. S.; PIRES-DE SOUZA, F. C. P.; PANZERI, H.; Effect of cigarette smoke on color stability and surface roughness of dental composites, *Journal of Dentistry*, v.s/v, n.s/n, p.73-79, 2013.

ALKHATIB, Mhd, N.; RUTH, H. D.; BEDI, R.; Smoking and tooth discoloration: Findings from a national cross- Sectional study, *BMC Public Health*, v.5, n.27, p.s/p, 2005.

ANGLIERI, F. MOLEIRINHO, T. C. G.; CARLIN, V.; OSHIMA, C. T. F.; RIBEIRO, D. A.; Biomonitoring of oral epithelial cells in smokers and no smokers, submitted at panoramic X-ray: comparison between buccal mucosa and lateral border of the tongue, *Clinical Oral Investigations* v.14, n.6, p.669-674, 2010.

BANSAL, H.; SANDHU, V. S.; BHANDARI, R., SHARMA, D., Evaluation of micronuclei in tobacco users: A study in Punjabi population, *Contemporary Clinical Dentistry*, v.3, n.2, p.184-7, 2012.

BAZZI, J. Z.; BINDO, M. J.; RACHED, R. N.; MAZUR, R. F.; VIEIRA, S.; SOUZA, E. M.; The effect of at-home bleaching and toothbrushing on removal of coffee and cigarette smoke stains and color stability of enamel, *Journal of American Dental Association*, v.143, n.5, p.1-7, 2012.

BERNARDON, J. K.; SARTORI, N.; BALLARIN, A.; PERDIGÃO, J.; LOPES, G. C.; BARATIERI, L. N.; Clinical performance of vital bleaching techniques, *Operative Dentistry*, v.35, n.1 p.3-10, 2010.

BERNARDON, J. K.; FERRARI, P.; BARATIERI, L. N.; RAUBER, G. B.; Comparison of treatment time versus patient satisfaction in at-home and in-office tooth bleaching therapy, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v.114, n.6, p.826-30,2015.

BERNARDON, J. K.; VIEIRA MARTINS, M.; BRANCO RAUBER, G. MONTEIRO JUNIOR, S.; BARATIERI, L. N.; Clinical evaluation of different desensitizing agents in home-bleaching gels, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v.115, n.6, p.692-696, 2016.

BONACINA, L.V.; VARGAS, C. A.; VANINI, J.; ZANDONÁ, J.; SILVA, R. R.; BUSIN, C. S.; BENETTI, P.; CARLI, J. P.; Genotoxicity of 22% Carbamide Peroxide Bleaching Agent on Oral Cells using the Micronucleus Technique, *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v.14, n.3, p.14-17, 2020.

BORTOLUZZI, M. C.; CAMPAGNOLLI, E.B.; MILAN, J. R.; REINHEIMER, A.; MASSON, M.; CAPELLA, D. L.; Frequency of micronucleus in oral epithelial cells after exposure to mate-tea in healthy humans, *Oral Medicine and Patology*, v.19, n.4, p.345-349, 2014.

BEZERRA, N. V. F.; LEITE, K. L. F.; MEIDEIROS, M. M.V.; MARTINS, M. L.; CARDOSO, A. M. R.; ALVES, M. P.; PADILHA, W. W. N.; CAVALCANTI, Y. W.; Impact of anatomical location, alcoholism and smoking on the prevalence of advanced oral cancer in Brazil, *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirurgia Bucal*, v.23, n.3, p.295-301, 2018.

BONASSI, S.; *et al.* The human MicroNucleus project on exfoliated bucal cells (HUMNXL): The role of life-style, host factors, occupational

exposures, health status and assay protocol, *Mutation Research*, v.728, n.3, p.88-97, 2011.

CAREY, C.M.; Tooth Whitening: What We Now Know, *The Journal of Evidence- Based Dental Practice*, v.14, s/n, p. 70-6, 2014.

CHU, S. J.; TRUSHKOWSKI, R. D.; PARAVINA, R. D.; Dental color matching instruments and systems; Review of clinical and research aspects, *Journal of Dentistry*, v38, n.2, p.2-16, 2010.

Commission Internationale de l'Eclairage, CIE Pub No. 15.3CIE technical report : colorimetry. Vienna: CIE CentralBureau; 2004.

CONSOLARO, A.; *et al*, O clareador dentário atua como co-carcinógeno na mucosa bucal, inclusive quando em dentifrícios e antissépticos. *Dental Press J Orthod*, v. 16, n. 2, p. 28-35, 2011.

CVIKL, B.; LUSSI, A.; MORITZ, A.; FLURY, S.; Enamel surface changes after exposure to bleaching gels containing carbamide peroxide or hydrogen peroxide, *Operative Dentistry*, v. 41, n.1, p.39-47, 2016.

CORRÊA, N. S., BASSAN, J. S.; CUNHA, C. J., FERNÁNDEZ, R. R., BACHETTINI, P. S.; GARCIA, G. L.; MARTINO-ROTH, M. G., Monitoramento da ação genotóxica em trabalhadores de sapatarias através do teste de micronúcleos, *Ciência & Saúde Coletiva*, v.14, n.6, p.2251-2260, 2009.

DELLA BONA, A.; PECHO, O. E.; GHINEA, R.; CARDONA, J. C.; PARAVINA, D. R PEREZ, M. M.; Influence of Bleaching and Aging Procedures on Color and Whiteness of Dental Composites, *Operative Dentistry*, v.44, n.6, p.648-658, 2019.

DOZIC, A.; KLEVERLAAN, C. J.; AARTMANN, I. H. A.; & FEILZER, A. J.; Relation in color of three regions of vital human incisors. *Dental Materials*, v.20, n.9, 832-838, 2004.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; ZEIGER, E.; CHANG, W.P.; BURGAZ, Z.; THOMAS, P.; BONASSI, S.; The HUMN and HUMNXL international collaboration projects on human micronucleus assay in

lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis*, v.26, n.1, p.239-245, 2010.

FIRMANI, M.; REYES, M., BECERRA, N.; FLORES, G., WEITZMAN, M.; ESPINOSA, M.; Sleep bruxism in childrens and adolescents, *Revista Chilena de Pediatría*, v.86, n.5, p.373-379, 2015.

GARCIA, J. F. R.; VELASCO-SALDAÑA, F. R. SANCHEZ-DE LA ROSA, S.V.; ORTIZ-GARCÍA, Y. M.; VELAZQUÉZ-MORALES, G.; MEDA-GOMÉZ, B. C.; GONZÁLEZ-ZÚÑIGA, G.M.; PARADA-SANCHEZ, M.G.; ZAMORA-PEREZ, A.L.; In vivo evaluation of the genotoxicity and oxidative damage on individuals exposed to 10% hydrogen peroxide whitening strips, *Clinical Oral Investigations*, v.23, n.7, p. 3033-3046, 2019.

GEUS, J. L. REZENDE, M.; MARGRAF, L. S.; BORTOLUZZI, M. C.; FERNANDÉZ, E.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. D.; KOSSATZ, S.; Evaluation of Genotoxicity and Efficacy of At-home Bleaching in Smokers: A Single-blind Controlled Clinical Trial, *Operative Dentistry*, v.40, n.2, E47-E55, 2015a.

GEUS J. L.; LARA, M. B.; HANZEN, T. A.; FERNANDÉZ, E.; LOGUERCIO, A. D.; KOSSATZ, S.; REIS, A.; One-year follow-up of at-home bleaching in smokers before and after dental prophylaxis, *Journal of Dentistry*, n.43, v.11, p.1346-51, 2015b.

GEUS, J. L. BERSEZIO, Z.; URRUTIA, J.; YAMADA, T.; FERNANDÉZ, E.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A.; KOSSATZ, S.; Effectiveness of and tooth sensitivity with at-home bleaching in smokers, *Journal of the American Dental Association*, v.146, n.4, p.233-40, 2015c.

GEUS, J. L.; BELTRAME F. L.; WANG, M.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; LOGUERCIO, A. D.; KOSSATZ, S.; REIS, A.; Determination of nicotine content in teeth submitted to prophylaxis and in-office bleaching by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), *Clinical Oral Investigations*, v.22, n.9, p.3043-3051, 2018.

GHINEA, R.; PEREZ, M. M.; HERRERA, L.J.; RIVAS, M.J.; YEBRA, A.; PARAVINA, R. D.; Color difference threshold in dental ceramics, *Journal of Dentistry*, v.38, n.2, p. 57-64, 2010.

GRAZIOLI, G.; VALENTE, L. L.; ISOLAN, C.P.; PINHEIRO, H.A.; DUARTE, C. G.; MUNCHOW, E. A.; Bleaching and enamel surface interactions resulting from the use of highly-concentrated bleaching gels, *Archives of Oral Biology*, 87 p.157-162, 2018.

GROBLER, S. R.; HAYWARD, R.; WIESE, S.; MOOLA, M. H.; KOTZE, T. J. W.; Spectrophotometric assessment of the effectiveness of Opalescence PF 10 %: A 14-month clinical study, *Journal of Dentistry*, v.38, n.2, p.113-117, 2010.

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

HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M.; The HUMN Project Perspective on Current Status and Knowledge Gaps, v.1-2, n.s/n, p.93-108, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
ISO/TR 28642: Dentistry - Guidance on color measurement. Geneva; 2016.

KAWAMOTO, K.; TSUJIMOTO, Y.; Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching, *Journal of Endodontics*. v.30, n.1, p.45-50, 2004.

KIRSTEN, G. A.; FREIRE, A.; de LIMA, A. A.; IGNÁCIO, S.A.; SOUZA, E. M.; Effect of reservoirs on gingival inflammation after home dental bleaching, *Quintessence International*, v.40, n.3, p.195-202, 2009.

KLARIC, E.; PAR, M.; PROFETA, I.; KOPJAR, N.; ROZGAJ, R.; KASUBA, V.; ZELJEZIC, D.; TARLE, Z.; Genotoxic effect of two bleaching agents on oral mucosa, *Cancer Genomics & Proteomics*, v.10, n.5, p.209-216, 2013.

KOSSATZ, S.; MARTINS, G.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A.; Tooth sensitivity and bleaching effectiveness associated with use of a calcium-containing in-office bleaching, *Journal of the American Dental Association*, v.143, n.12, p. 81-87, 2012.

LA PEÑA V. A.; RATÓN, M. L.; Randomized clinical trial on the efficacy and safety of four professional at-home tooth whitening gels. *Operative Dentistry*, v. 39, n.2, p.136-143, 2014.

LAGO, M.; MOZZAQUATRO, L. R.; RODRIGUES, C.; KAIZER, M. R.; MALLMANN, A.; JACQUES, L. B.; Influence on bleaching agents on color and translucency of aged and resin composites, *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v.29, n.5, p.368-377, 2017.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P.; Plano de Tratamento, In: Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. Quarta edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p.401-418.

LUCIER, R. N.; ETIENNE, O.; FERREIRA, S.; GARLICK, J.A.; KUGEL, G.; EGLES, C.; Soft-tissue alterations following exposure to tooth-whitening agents. *Journal of Periodontology*, v.84, n.4, p.513-519, 2013.

LUO, M. R.; CUI, G.; RIGG, B.; The development of the CIE2000 color difference formula, *Color Research Applied*, v.26, n. s/n, p.340-350, 2001.

MAHROSS, Z. H.; MOHAMED, M. D.; HASSAN, A. M.; BAROUDI, K.; Effect of cigarette smoke on surface roughness of different denture base materials, *Journal of Clinical and Diagnostic Research* v.9, n.9, p.39-42, 2015.

MARAN, B. M.; VOCHIKOVSKI, L.; HORTKOFF, D. R. A.; STANISLAWCZUK, R.; LOGUERCIO, A.; REIS, A.; Tooth sensitivity with a desensitizing-containing at-home bleaching gel – a randomized triple-blind clinical trial, *Journal of Dentistry*, 72, p.64-70, 2018.

MATIS, B. A.; WANG, G.; MATIS, J. I.; COOK, N. B.; ECKERT, G. J.; White diet: Is it necessary during tooth whitening? *Operative Dentistry*, v.40, n.33, p.235-240, 2015.

MEIRELES, S. S.; HECKMANN, S. S.; LEIDA, F. L.; SANTOS, I. S.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F.; Efficacy and safety of 10% and 16% carbamide peroxide tooth-whitening gels: a randomized clinical trial., *Operative Dentistry*,v.33,n.6, p.606-612, 2008.

MEIRELES, S. S.; SANTOS, I. S.; DELLA BONA, A.; DEMARCO, F. F. A double-blind randomized clinical trial of two carbamide peroxide tooth bleaching agents: 2-year follow-up, *Journal of Dentistry*, v.38, n.12, p.956-63, 2010.

MONDELLI, R. F. L. ; GARRIDO GABRIEL, T. R.; PIOLA RIZZANTE, F. A.; MAGALHÃES, A. C. SOARES BOMBONATTI, J. F.; ISHIKIRIAMA, S. K.; Do different bleaching protocols affect the enamel microhardness?, *European Journal of Dentistry*, v. 9, n.1, p.25-30, 2015.

MONTEIRO, M. J. F.; LINDOSO, J. B .C.; CONDE, N. C. O.; SILVA, L. M.; LOGUERCIO, A. D.; PEREIRA, J. V.; Evaluation of the genotoxic potential of different delivery methods of at-home bleaching gels: A single-blind, randomized clinical trial, *Clinical Oral Investigations*,v.23, n.5, p.2199-2206, 2018.

MUNRO, I.C.; WILLIAMS, G.M.; HEYMANN, H.O.; KROES, R.; Use of hydrogen peroxide-based tooth whitening products and its relationship to oral cancer. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v.18, n.3, p.119-125, 2006.

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

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

PARAVINA, D. R.; GHINEA, R.; HERRERA, L. J.; DELLA BONA, A.; IGIEL, C.; LINNINGER, M.; SAKAI,M.; HIDEKAZU, T.;

TASHKANDI, E.; PEREZ, M. M.; Color difference thresholds in dentistry, *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, v.1, n.27, p.1-9, 2015.

PECHO, O. E.; GHINEA, R.; ALESSANDRETI, R.; PEREZ, M. M.; DELLA BONA, A.; Visual and instrumental shade matching using CIELAB and CIEDE2000 color difference formulas, v.32, n1, p.82-92, 2016a.

PECHO, O. E.; PEREZ, M. M.; GHINEA, R.; DELLA BONA, A.; Lightness, chroma and hue differences on visual shade matching, *Dental Materials*, v.32, n.11, p.1362-1373, 2016b.

PECHO, O. E.; GHINEA, R.; PEREZ, M. M.; DELLA BONA, A.; Influence on gender on visual shade matching in dentistry, v.29, n.2, p.15-23, 2017.

PEREZ, M. M.; GHINEA, R.; HERRERA, L. J. ; IONESCU, A. M.; POMARES, H.; PULGAR, R.; PARAVINA, R. D.; Dental ceramics: A CIEDE2000 acceptability thresholds for lightness, chroma and hue differences, *Journal of Dentistry*, 39:E, p.37-44, 2011.

PEREZ, M. M.; GHINEA, R.; RIVAS, M. J.; YEBRA, A.; IONESCU, A.M.; PARAVINA, R. D.; HERRERA, L. J.; Development of a customized whiteness index for dentistry based on CIELAB color space, *Dental Materials*, v.32, n.3, p.461-467, 2016.

PEREZ, M. M.; PECHO, O. E.; GHINEA, R.; PULGAR, R.; DELLA BONA, A.; Recent advances in color and whiteness evaluation in dentistry. *Current Dentistry* v.1; n.1, p.23-29, 2019a.

PEREZ, M. M.; HERRERA, L. J.; CARRILLO, F.; PECHO, O. E.; DUDEA, D.; GASPARIK, C.; GHINEA, R.; DELLA BONA, A.; Whiteness Difference threshold in Dentistry, *Dental Materials*, v.35, n.2, p.292-297, 2019b.

PLIGINA, K.L. RODINA, I.A.; SCHEVCHENKO, T.V.; BECKCHANOVA, E. S.; TIKHONOV, V. P.; SIROTA, N. P.; DNA-

Damaging Effects of Dental Bleaching Agents, *Bulletin of experimental biology and medicine*, v.153, n.1, p.57-60, 2012.

RIBEIRO, D. A.; YUJRA, V. Q.; DE MOURA, C. F. G.; HANDAN, B. A.; DE BARROS VIANA, M.; YAMAUCHI, L. Y.; CASTELO, P. M.; AGUIAR, O. JR.; Genotoxicity Induced by Dental Materials: A Comprehensive Review, *Anticancer Research*, v.37, n.8, p.4017-4024, 2017.

RIVERA, C.; Essentials of oral cancer, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v.8, n.9, p.11884-11894, 2015.

REZENDE, M.; DE GEUS, J. L.; LOGUERCIO, A. D.; REIS, A. KOSSATZ, D.; Clinical Evaluation of Genotoxicity of In-office Bleaching, *Operative Dentistry*, v.41, n.6, p.578-586, 2016.

SILVA, F. B.; CHISINI, L. A.; DEMARCO, F. F.; HORTA, B. L.; CORREA, M. B.; Desire for tooth bleaching and treatment performed in Brazilian adults: Findings from a birth cohort, *Brazilian Oral Research*, v.32, n.s/n, p.s/p, 2018.

SUHAS, S.; GANAPATHY, K. S.; DEVI, M. G.; RAMESH, C.; Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer, *Mutation Research*, v.561, n.1-2, p.15-21, 2004.

TERRY, D. A.; GELLER, W.; Biomodificação da descoloração dentária, In: *Odontologia estética e restauradora*. 2^{ed}. São Paulo: Quintessence Editora, 2014. p. 678-710.

THOMAS, P.; HOLLAND, N.; BOLOGNESI, C.; KIRSCH-VOLDERS, M.; BONASSI, S.; ZEIGER, E.; KNASMUELLER, S.; FENECH, M.; Buccal Micronucleus Cytome Assay, *Nature Protocols*, v.4, n.6, p.825-837, 2009.

TURGUT, S.; KILINK, H.; EYUPOGLU, G. B.; BAGIS, B.; Color relationships of natural anterior teeth: An in vivo study, *Nigerian Journal of Clinical Practice* v.21, n.7, p.925-931, 2018.



ARTIGO SUBMETIDO

TÍTULO DO ARTIGO²

Genotoxicity of 22% Carbamide Peroxide Bleaching Agent on Oral Cells using the Micronucleus Technique

Abstract

Introduction: Several bleaching products and methods were introduced over the last years. However, the consequences of 22% carbamide peroxide on the genetic material of oral mucosal cells is uncertain. Aim: This study investigated the genotoxic effect of 22% carbamide peroxide on oral mucosal cells using the Micronucleus (MN) technique. Materials and Methods: Sixteen volunteers participated in the study. At-home bleaching was performed for 2 hours per day for 21 days. Cells were collected by scraping the oral mucosa at four different evaluation times: Baseline (before treatment), 14 days, 21 days, and 52 days after the beginning of bleaching procedure. One thousand cells from each volunteer were examined and the frequencies of MN, binucleated cells, and metanuclear alterations were recorded. After preparing the slides, the microscopic fields were analysed from right to left, until a total of 1,000 cells were analyzed. Data were analyzed statistically using Kruskal Wallis test at 5% significance level. Results: There was a significant increase in

Lais Vargas Bonacina
Carolina do Amaral Vargas
Júlia Vanini
Júlia Zandoná
Rodrigo Rohenkohl Silva
Carmen Sílvia Busin
Paula Benetti
João Paulo De Carli

the number of metanuclear alterations and binucleated cells between the baseline and day 21 ($p < 0,0001$). The frequency of MN between the evaluation times was not significantly different ($p = 0,08$). One month after bleaching, the alterations were similar to the baseline values.

Conclusion: Although at-home bleaching using 22% carbamide peroxide can cause temporary effect on mucosa cells, the alterations disappear one month after finishing the bleaching treatment.

Key words: DNA damage, Human genetics, Micronucleus, Tooth bleaching