

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Ana Rosa De Toni  
Heloisa Dallé

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREADOR CASEIRO  
(peróxido de carbamida a 15%) NA MUCOSA BUCAL UTILIZANDO O TESTE DE  
MICRONÚCLEO.

Porto Alegre  
2009

Ana Rosa De Toni  
Heloisa Dallé

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREADOR CASEIRO  
(peróxido de carbamida a 15%) NA MUCOSA BUCAL UTILIZANDO O TESTE DE  
MICRONÚCLEO.

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito para  
obtenção do grau de Cirurgiã-Dentista  
pela Faculdade de Odontologia da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul.

Orientadora: MARIA CRISTINA MUNERATO

Porto Alegre  
2009

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Maria Cristina Munerato, docente do Departamento de Odontologia Conservadora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela orientação de todas as etapas desta investigação e de nossa formação científica com seriedade e carinho admiráveis. Os verdadeiros mestres são aqueles que se dedicam ao que fazem, porque o fazem com prazer, estando sempre solícitos quando se faz necessário, responsáveis e justos em suas cobranças e, ainda, capazes de serem compreensivos, conselheiros, amigos, enfim... Humanos. Por todas estas virtudes demonstradas durante nosso convívio, muito obrigada.

A esta Universidade, que oportunizou a janela que hoje vislumbramos um horizonte superior, com semelhante confiança no mérito e ética aqui presentes.

Aos nossos pais, Telmo e Solange e Celso e Ema, que nos momentos de ausência dedicados ao estudo, sempre fizeram entender que o futuro é feito a partir de constante dedicação no presente. A eles devemos todo amor, carinho e respeito por tudo o que já fizeram por nós, sem medir esforços, sem deixar de acreditar por uma vez se quer na felicidade de seus filhos. Vocês serão para sempre nosso exemplo.

Aos nossos irmãos, Elisa, Viviane e Maurício, pelo incentivo e compreensão demonstrados ao longo de nossas vidas e pela ajuda nos momentos de dificuldade.

Ao Gibran, agradecimento especial pela companhia, dedicação e confiança ao longo desta caminhada.

Aos nossos amigos, em especial para Gustavo Giacomelli Nascimento, Luisa Schertel Cassiano, Orion Luiz Haas Junior e Gustavo von Diemen Ligocki, que estiveram presentes em todos os momentos de alegrias, comemorações, tensões pré-provas e, principalmente, nas horas de angústias e incertezas, sem os quais esta jornada seria muito mais tortuosa, tornando estes anos acadêmicos os melhores anos de nossas vidas.

*“Dos amigos, nunca nos despedimos, apenas nos afastamos para darmos ao destino o prazer de nos reencontrarmos...”*

Ao Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo empréstimo do microscópio.

Aos professores da disciplina de Dor e Disfunção Têmporo-Mandibular, por cederem seu espaço para a realização deste trabalho.

A todos os pacientes que se dispuseram a colaborar com este estudo.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

Nossos sinceros agradecimentos e gratidão.

*“Non possiamo sapere cosa ci potrà accadere nello strano intreccio della vita. Noi però possiamo decidere cosa deve accadere dentro di noi, come possiamo affrontare le cose, e quale decisione prendere, e in fin dei conti è ciò che veramente conta.”*

*Joseph F. Newton*

## RESUMO

O clareamento de dentes vitais tornou-se um dos principais procedimentos estéticos na Odontologia. O peróxido de carbamida é o princípio ativo mais utilizado em clareamento caseiro e, por ter caráter oxidante, sua segurança biológica ainda não foi bem estabelecida. Este estudo procurou avaliar a indução de dano genético na mucosa gengival normal exposta ao clareador caseiro *Opalescence* com peróxido de carbamida a 15% utilizando o teste de micronúcleo. Trata-se de um estudo clínico composto por 45 indivíduos, sendo 20 do Grupo Controle e 25 do Grupo Experimental (clareamento). Três coletas foram realizadas: no dia zero, no dia 14 e no dia 24 (dez dias após o término do clareamento). 2000 células por paciente foram contadas e analisadas, quanto à presença de micronúcleos, a cada coleta. O material foi obtido com *cytobrush* e corado com May-Grundwald Giemsa. Para análise dos resultados entre os grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney ( $P \leq 0,05$ ), que encontrou diferença estatisticamente significativa entre as medianas do dia 24 ( $P = 0,018$ ). O mesmo não foi constatado nas coletas dos dias 0 ( $P = 0,292$ ) e 14 ( $P = 0,274$ ). Para análise intra-grupos, pré e pós tratamento, foi realizado o teste de Friedman ( $P < 0,05$ ), que encontrou diferença estatisticamente significativa no Grupo Experimental quando comparadas as coletas dos dias 0 e 24 ( $P = 0,002$ ). O mesmo não foi encontrado quando comparados os momentos do Grupo Controle ( $P = 0,736$ ). Concluiu-se que o gel clareador *Opalescence 15%* apresentou atividade genotóxica *in vivo*, mas estudos adicionais, que separem o princípio ativo do gel dos demais componentes, são necessários.

**PALAVRAS-CHAVE:** micronúcleo, genotoxicidade, peróxido de carbamida

## ABSTRACT

The teeth vital bleaching became one of the main esthetic procedures in Dentistry. The carbamide peroxide is the most commonly used active ingredient for at-home whiteners and, for being an oxidizing agent, its biological safety is not well known. This study investigated the induction of a genetic damage in a normal gingival mucosa exposed to a dental bleaching agent, *Opalescence*, composed by 15% carbamide peroxide, through the micronucleus assay. It is a clinical study composed by 45 subjects, 20 of a Control Group and 25 of a Experimental Group (bleaching). There were made three collects: day zero, day 14 and day 24 (ten days after the end of bleaching). In each collect were scored and analyzed, for the micronucleus incidence, 2000 cells per patient, collected with cytobrush and stained with May-Grundwald Giemsa. For statistical analyses between the two groups, the Mann-Whitney test ( $P \leq 0,05$ ) was used, and there was a statistically significant difference between the medians in day 24 ( $P = 0,018$ ). The same results were not observed in the collects on the days zero ( $P = 0,292$ ) and 14 ( $P = 0,274$ ). For analyses intra-group, pre and post treatment, was used the Friedman test ( $P < 0,05$ ), that observed a statistically significant difference on the Experimental Group when compared the collects on the days zero and 14 ( $P = 0,002$ ). This result was not observed when compared the same collect moments in the Control Group ( $P = 0,736$ ). These findings indicated that the *Opalescence* 15% had a genotoxic activity *in vivo*, but more studies are necessary, isolating the carbamide peroxide of the other components.

**Key words:** micronucleus, genotoxicity, carbamide peroxide

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>8</b>
1.1. Peróxido de Carbamida e seus efeitos deletérios .....	9
1.2. Genética Toxicológica .....	11
1.3. A Citologia Esfoliativa de Mucosa Bucal e o Teste de Micronúcleos .....	13
1.4. Incidência Espontânea de Micronúcleos .....	15
<b>2. Objetivo</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Artigo para publicação</b> .....	<b>17</b>
<b>4. Discussão ampliada</b> .....	<b>35</b>
Referências .....	37
Anexos .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os procedimentos de ordem estética em odontologia, o clareamento dos dentes vitais tornou-se um dos mais populares, sendo utilizado, muitas vezes, de forma indiscriminada. A proposta de se utilizar agentes oxidantes para clarear dentes vitais é muito antiga, foi sugerida por Ames, em 1937. Com o passar dos anos houve um aprimoramento dos produtos e da técnica de realização de clareamento, abrindo-se, assim, um grande leque de produtos na indústria cosmética. Em 1989, foi descrita pela primeira vez por Haywood e Heymann a técnica na qual o agente clareador é colocado em uma moldeira personalizada.

Atualmente, o peróxido de carbamida é o princípio ativo mais utilizado em procedimentos de clareamento caseiro. Essa substância é instável, facilmente se dissociando em uréia e peróxido de hidrogênio (HAYWOOD E HEYMANN, 1989; FASANARO, 1992). Neste tipo de técnica, como os dentes não são isolados, os tecidos moles da mucosa oral ficam expostos ao agente clareador por períodos relativamente longos. Por ser um agente oxidante, o peróxido de hidrogênio tem sido associado com fenômenos de carcinogênese, genotoxicidade, citotoxicidade e envelhecimento (LINK, 1988). Essa associação baseia-se na ação de radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o íon hidroxila ( $OH^-$ ), originários da quebra do peróxido de hidrogênio. Esses radicais podem alterar proteínas e DNA, podem interferir negativamente na membrana celular e induzir mutações (IMLAY e LINN, 1988; POWELL e BALLEES, 1991).

Estão disponíveis no mercado duas modalidades de produtos a base de peróxido de carbamida: com ou sem carbopol. Esta substância tem natureza tixotrópica, que é responsável pela maior retenção do produto no interior da moldeira, fazendo com que a liberação de oxigênio seja lenta e, portanto, aumentando o tempo de ação do produto. As apresentações comerciais para uso caseiro tem o peróxido de carbamida na concentração de 10%, 15%, 16% e 21%, enquanto para o uso em consultório a concentração é de 35%.

O mecanismo de ação proposto para o peróxido de carbamida reside na sua atuação como agente oxidante. A sua dissociação em peróxido de hidrogênio e uréia, seguida da liberação de radicais livres de oxigênio, associada à uréia convertida em amônia e dióxido de carbono, confere a esta substância a capacidade

de interagir com os cromóforos, com a formação de subprodutos mais claros, conduzindo, assim, a alteração da cor dos dentes. Este processo químico de clareamento apresenta um ponto de saturação, a partir do qual os danos aos tecidos dentais são maiores do que os benefícios. Estes danos são representados pela fragilidade e pela porosidade do esmalte dental (TAM, 1992; PAIXÃO e HOEPPNER, 1997). A ação das enzimas peroxidase e catalase da saliva são fundamentais na liberação destes metabólitos (TAM, 1992).

É necessário o monitoramento semanal da modificação de coloração dental e das condições bucais e gerais do paciente para identificar lesões gengivais, irritação gástrica por ingestão do produto e hipersensibilidade dentária. O tempo de exposição não deve ultrapassar o período de quatro semanas (PAIXÃO e HOEPPNER, 1997).

Por outro lado, o uso indiscriminado ou abusivo destes produtos pode, hipoteticamente, levar à ocorrência de efeitos adversos locais e/ou sistêmicos. Uma possível ação irritante deste peróxido manifesta-se como ulcerações na gengiva exposta ao produto. Estudos conduzidos em animais proporcionaram alguns subsídios no que se refere à toxicidade desta substância. Sinais de toxicidade aguda, além de ulcerações na mucosa gástrica, foram encontrados em ratos (LI, 1996).

### **1.1. Peróxido de Carbamida e seus efeitos deletérios**

Uma área de permanente interesse é a que se refere à segurança na exposição a produtos químicos. Todas as possibilidades de interação com macromoléculas celulares devem ser investigadas. Por se tratar de um peróxido, existe a possibilidade dos radicais livres de oxigênio liberados causarem lesões às estruturas celulares. Weitzman *et al.* (1986), utilizando hamsters como modelo experimental para carcinogênese oral, demonstraram alguns resultados interessantes. Foram estudados os efeitos das aplicações tópicas de peróxido de hidrogênio, duas vezes por semana, no epitélio bucal de hamsters. Os animais foram tratados com peróxido de hidrogênio, com peróxido de hidrogênio e o cancerígeno 9, 10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), ou com DMBA somente. Nos

animais tratados com 30% de peróxido de hidrogênio, o exame histopatológico, após 22 semanas, revelou hiperkeratose, hiperplasia em todos os animais com células hiperchromáticas e displasia leve; tumores não foram vistos em quatro dos nove roedores. Nos animais tratados apenas com DMBA, três dos sete (43%) desenvolveram carcinoma epidermóide. Seis dos 11 (55%) animais tratados com DMBA mais 3% de peróxido de hidrogênio e cinco de cinco (100%) animais tratados com DMBA mais peróxido de hidrogênio 30% ( $P = 0,054$ ) desenvolveram carcinoma. Assim, o peróxido de hidrogênio pode, por si só, induzir alterações patológicas frequentemente associadas com lesões pré-neoplásicas, podendo também aumentar a carcinogênese quando associado ao DMBA.

Woolverton *et al.* (1993) investigaram dois produtos a base de peróxido de carbamida a 10% (um com Carbopol e outro sem Carbopol) quanto a letalidade e genotoxicidade após administração oral em ratos e quanto a citotoxicidade em fibroblastos de ratos *in vitro*. A genotoxicidade foi medida utilizando-se o teste de micronúcleos e foi negativa para os dois agentes, em comparação com os controles positivos e negativos. Ambos foram considerados seguros para uso em humanos, pois se mostraram menos tóxicos do que outros compostos amplamente utilizados em odontologia.

Quando peróxido de hidrogênio a 35 % foi aplicado na mucosa de ratos Wistar duas vezes por semana durante três meses consecutivos, Gomez *et al.* (2002) encontraram alterações na ciclina D e no antígeno p16 que são, por sua vez, observadas nos períodos iniciais do desenvolvimento de uma lesão cancerosa. Todavia, a comparação com os ratos do grupo controle que receberam apenas água destilada, não demonstrou diferença significativa, possibilitando concluir que o uso crônico de peróxido de hidrogênio, mesmo em altas concentrações, não determinou alterações no ciclo celular normal.

Albuquerque *et al.* (2002) avaliaram a influência da aplicação tópica de peróxido de carbamida na expressão imunohistoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) na mucosa oral da língua de ratos. O tratamento foi feito uma vez por semana por três semanas consecutivas. Água destilada foi aplicada no lado controle. Os animais foram sacrificados nos dias zero, 10, e 20 depois da última aplicação. A porcentagem de células basais epiteliais positivas em cada lado da mucosa da língua foi calculada (experimental e controle). O resultado demonstrou que a aplicação tópica de peróxido de carbamida a 10% aumenta a expressão

imunohistoquímica do PCNA na camada basal do epitélio da mucosa oral de ratos no dia zero depois do tratamento. Concluiu-se que o uso em curto período de peróxido de carbamida a 10% induz proliferação celular epitelial transitória da mucosa oral de ratos.

Estudo *in vitro* realizado por Ribeiro *et al.* (2006) analisou o potencial genotóxico dos agentes clareadores dentais pelo teste do cometa. Este ensaio avaliou a indução do dano genético antes da atuação dos mecanismos de reparo inerentes à célula. Para este estudo foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO) *in vitro*, que foram expostas a seis agentes clareadores dentais comercialmente disponíveis (Clarigel Gold – Dentsply; Whitespeed – Discus Dental; Nite White – Discus Dental; Magic Bleaching– Vigodent, todos com peróxido de hidrogênio a 16% e Whiteness HP – FGM e Lase Peroxide – DMC com peróxido de hidrogênio a 35%). Os resultados encontrados sugerem que os clareadores dentais podem atuar como agente causal de danos no DNA e que os dois produtos com uma concentração de peróxido de hidrogênio mais elevada induziram lesões mais severas no genoma.

## **1.2. Genética Toxicológica**

Como há uma relação causal direta entre fatores etiológicos externos ao organismo e o desenvolvimento do câncer, uma das estratégias de prevenção desta moléstia consiste na identificação de agentes químicos capazes de introduzir lesões no conteúdo informacional da célula, seguida da implementação de medidas de controle do risco genético - visando diminuir a exposição humana a esses compostos. O papel central da Genética Toxicológica refere-se à identificação de agentes capazes de induzir mutações gênicas e aberrações cromossômicas, tanto estruturais como numéricas, bem como de eventos recombinacionais mitóticos. A justificativa para este posicionamento baseia-se no fato de que esses eventos estão envolvidos em diversas desordens da saúde humana, que incluem desde anomalias neurológicas - associadas com o processo gradual e progressivo do envelhecimento - até a indução de tumores malignos.

Na tentativa de traçar o perfil genotóxico e/ou carcinogênico de um determinado produto químico são primeiramente empregados testes de curta duração - que tem como desvantagem maior a obtenção tanto de resultados falso-positivos quanto de falso-negativos. Em função dessas observações, torna-se premente a utilização de diferentes sistemas-teste que permitam acompanhar todos os tipos de lesões possíveis de serem introduzidas no DNA celular (RAMEL, 1988). Sistemas amplamente utilizados em baterias de ensaios de curta duração incluem o teste de Ames e o teste de micronúcleo. Analisando os dados compilados a partir de estudos conduzidos entre 1964 e 1985 - quando esses ensaios foram aplicados na avaliação de 951 agentes químicos - foi possível constatar respostas variáveis, conforme a classe e o mecanismo de ação das substâncias (ISHIDATE, HARNOIS e SOFUNI, 1988). Uma vez que os resultados de genotoxicidade - obtidos em múltiplas abordagens experimentais, tanto *in vitro* como *in vivo* - mostraram respostas muitas vezes incompatíveis, Ashby e Tennant, em 1991, avaliaram as respostas de 300 agentes químicos que haviam sido previamente investigados utilizando teste de Ames e de testes de carcinogenicidade. Esses compostos foram subdivididos em dois grandes grupos, onde o parâmetro foi a presença ou a ausência de um ou mais grupamentos químicos específicos denominados de estruturas de alerta - representadas por um átomo de nitrogênio ligado a um anel aromático e o potencial eletrofílico associado a um átomo halogênio reativo. O conjunto dos resultados acusou uma alta correlação entre a presença destas estruturas químicas e a atividade mutagênica - expressa como 84%, para aqueles compostos previamente diagnosticados como indutores de câncer, e de 66% para os não-carcinogênicos. Entretanto, as estruturas de alerta investigadas demonstraram uma baixa correlação no que se refere à ação carcinogênica desses compostos (ASHBY e TENNANT, 1991; SKIPPER, 2009).

Os produtos comerciais para clareamento dental são misturas de diferentes compostos químicos. Em função desta característica, as interações entre os diferentes componentes podem criar as condições necessárias para a indução de lesões ao nível do DNA ou, ao contrário, anular a ação de alguma substância isoladamente considerada genotóxica. Este comportamento ambíguo é esperado para os compostos fenólicos, pois há relatos de genotoxicidade e de antimutagenicidade para o eugenol - um representante desta classe (MUNERATO,

2005). Adicionalmente, uma citotoxicidade excessiva pode, muitas vezes, conduzir a uma atividade mitogênica, que por sua vez está intimamente associada a promoção tumoral. Torna-se evidente a necessidade de que seja investigado o comportamento destes produtos, procurando caracterizar o seu perfil genotóxico.

### **1.3. A Citologia Esfoliativa de Mucosa Bucal e o Teste de Micronúcleos**

Papanicolaou e Traut (1941) caracterizaram a citologia esfoliativa como um método simples, de baixo custo, confiável e passível de ser utilizado, em âmbito populacional, como forma de prevenção e controle do câncer de colo de útero.

A citopatologia bucal permite a análise morfológica de células esfoliadas ou raspadas da mucosa bucal. Por ser um método indolor, simples e de baixo custo (BANOCZY, 1976), passou a ser utilizada como meio de diagnóstico precoce do câncer bucal. Silverman, Becks e Farber (1958), Sandler e Cahn (1960) e Sandler (1964), comparando os exames histopatológicos e citopatológicos, concluíram que a citopatologia bucal é um método de diagnóstico confiável para a detecção do câncer bucal em estágio precoce.

No entanto, sempre houve a ocorrência de casos falso-negativos e falso-positivos no emprego da técnica de Papanicolaou, quando comparada à histopatologia no diagnóstico do câncer bucal (SILVERMAN; BECKS; FARBER, 1958; SANDLER; CAHN, 1960; SANDLER, 1964).

Em decorrência dos casos falso-negativos e falso-positivos da citopatologia como diagnóstico do câncer bucal, buscou-se analisar as alterações do epitélio da mucosa bucal clinicamente normal. A aplicação de técnicas quantitativas tem aumentado a acurácia e sensibilidade da citopatologia bucal, dentre as quais se destaca a avaliação dos micronúcleos (MN).

Os micronúcleos são formados a partir de fragmentos cromossômicos ou cromatídeos acêntricos e de cromossomos que se atrasaram, em relação aos demais, em sua migração para os pólos do fuso na anáfase sendo, portanto, excluídos do novo núcleo formado na telófase. Estes MN são corpúsculos que contêm DNA no citoplasma, sem qualquer conexão estrutural com o núcleo principal. A sua formação requer, pelo menos, uma divisão celular depois que a quebra

cromossômica ou cromatídica tenha ocorrido. Então, os MN observados nas células da superfície epitelial surgem em populações de células da camada basal em divisão. Estas células migram da camada basal para a superfície do epitélio e, uma vez coletadas por citologia esfoliativa, permitirão a identificação e contagem dos micronúcleos induzidos (RIBEIRO,1991).

A formação de MN em células eucarióticas é um parâmetro importante para a avaliação de danos cromossômicos ou erros de segregação (GEARD e CHEN, 1990). A aplicação do teste do micronúcleo a células esfoliadas de vários tecidos humanos poderá fornecer evidências tanto da exposição a agentes carcinogênicos e clastogênicos, como da medida do grau do dano genético e, ainda, de uma estimativa dos efeitos aditivos ou potencializadores quando vários carcinogênicos ou agentes genotóxicos atuam juntos (RIBEIRO, 1991). A frequência de MN em células esfoliadas humanas pode ser utilizada como um “dosímetro endógeno”, presente em tecidos que são alvos específicos de agentes genotóxicos e carcinogênicos (STICH *et al.*, 1985).

Os MN parecem ser marcadores simples, sua presença aparece aumentada em tecidos expostos a agentes carcinogênicos bem antes que qualquer sintoma clínico seja evidente. Essa elevada frequência pode indicar uma probabilidade aumentada de formação de quebras cromossômicas as quais, por sua vez, através do efeito de tais alterações na expressão de um oncogene, poderão estar associadas à transformação neoplásica (RIBEIRO, 1991).

As análises de MN em células esfoliadas de tecido epitelial e em linfócitos podem ser utilizadas para avaliar os danos citogenéticos induzidos por agentes potencialmente cancerígenos aos quais as populações humanas estão usualmente expostas (CAIRNS, 1981; STICH *et al.*, 1982; LAND *et al.*, 1983; BISHOP, 1987; TOLBERT *et al.*, 1991; PASTOR *et al.*, 2001; HOLLAND, 2008).

As maiores limitações que o teste de micronúcleos apresenta são: a) não diagnostica a natureza do dano nuclear induzido e b) existe uma considerável variação intra e interindividual (BONASSI e AU, 2002). No entanto, essa técnica apresenta algumas vantagens: as células não necessitam ser cultivadas, os MN podem refletir eventos genotóxicos que ocorreram nas células na camada basal nas últimas três semanas, a técnica é rápida, simples e as amostras são de fácil obtenção (TOLBERT *et al.*, 1991).

#### 1.4. Incidência espontânea de micronúcleos

Estudos experimentais indicam que a taxa espontânea de MN, observada nos controles negativos, apresenta variações significativas que são dependentes das populações estudadas. Porém, esses valores estão diretamente relacionados com o número de indivíduos analisados; com amostras pequenas observam-se valores muito próximos de zero. Estes valores apontam para frequências que variam de 0,75% nos egípcios, 0,44% nos hindus, 0,38% nos mexicanos, 0,29% nos canadenses e até 0,16% nos americanos (HEDDLE *et al.*, 1991; TOLBERT *et al.*, 1992, TORRES-BUGARIN *et al.*, 1998, MAJER *et al.*, 2001). Há dois relatos referentes à população brasileira apontando para uma frequência espontânea de 0,27% (DIETZ *et al.*, 2000, MAJER *et al.*, 2001). Segundo Titenko-Holland *et al.* (1994), a média normal da frequência de MN varia consideravelmente de uma população a outra, de 0,03% a 0,47%.

## 2. OBJETIVO

Este estudo tem por:

Objetivo Geral:

- Avaliar a indução de dano genético na mucosa gengival normal exposta ao clareador caseiro *Opalescence* com peróxido de carbamida a 15%.

Objetivos específicos:

- Quantificar a frequência espontânea de MN na mucosa gengival utilizando o Teste de Micronúcleos e a coloração de May-Grunwald e Giemsa (MGG).
- Quantificar a frequência de micronúcleos, após o tratamento clareador caseiro com peróxido de carbamida a 15%, utilizando o Teste de Micronúcleos e a coloração de May-Grunwald e Giemsa (MGG).

### 3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – Genetics and Molecular Research

#### Determinação da genotoxicidade do agente clareador *Opalescence* 15% *in vivo* empregando o teste de micronúcleo

A. R. De Toni<sup>1</sup>, H. Dallé<sup>1</sup>, F. C. Mezzomo<sup>1-2</sup> e M. C. Munerato<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Odontologia, Departamento de Odontologia Conservadora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>2</sup>Doutorando do Programa de Pós Graduação em Clínicas Odontológicas, Área de concentração Materiais Dentários, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Professora adjunta do Departamento de Odontologia Conservadora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Autor correspondente: M.C. Munerato

E-mail: mcmunerato@gmail.com

**RESUMO.** O clareamento de dentes vitais tornou-se um dos principais procedimentos estéticos na Odontologia. O peróxido de carbamida é o princípio ativo mais utilizado em clareamento caseiro e, por ter caráter oxidante, sua segurança biológica ainda não foi bem estabelecida. Este estudo procurou avaliar a indução de dano genético na mucosa gengival normal exposta ao clareador caseiro *Opalescence* com peróxido de carbamida a 15% utilizando teste de micronúcleo. Trata-se de um estudo clínico composto por 45 indivíduos, sendo 20 do Grupo Controle e 25 do Grupo Experimental (clareamento). Três coletas foram realizadas: no dia zero, no dia 14 e no dia 24 (dez dias após o término do clareamento). A cada coleta foram contadas e analisadas, quanto à presença de micronúcleos, 2000 células por paciente, coletadas com *cytobrush* e coradas com

May-Grundwald Giemsa. Para análise dos resultados entre os grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney ( $P \leq 0,05$ ), que encontrou diferença estatisticamente significativa entre as medianas do dia 24 ( $P = 0,018$ ). O mesmo não foi constatado nas coletas dos dias zero ( $P = 0,292$ ) e 14 ( $P = 0,274$ ). Para análise intra-grupos, pré e pós tratamento, foi realizado o teste de Friedman ( $P < 0,05$ ), que encontrou diferença significativa estatisticamente no Grupo Experimental quando comparadas as coletas dos dias zero e 24 ( $P = 0,002$ ). O mesmo não foi encontrado quando comparados os momentos de coleta do Grupo Controle ( $P = 0,736$ ). Concluiu-se que o gel clareador *Opalescence 15%* apresentou atividade genotóxica *in vivo*. Entretanto, estudos adicionais que separem o princípio ativo do gel dos demais componentes, são necessários.

**Palavras-chave:** micronúcleo, genotoxicidade, peróxido de carbamida

## INTRODUÇÃO

Dentre os procedimentos de ordem estética em odontologia, o clareamento dos dentes vitais tornou-se um dos mais populares (MOKHLIS *et al.*, 2000), sendo utilizado, muitas vezes, de forma indiscriminada. Com o passar dos anos houve um aprimoramento dos produtos e da técnica de realização de clareamento, surgindo, assim, um grande leque de produtos na indústria cosmética. Em 1989, foi descrita pela primeira vez por Haywood e Heymann a técnica na qual o agente clareador é colocado em uma moldeira personalizada.

Atualmente, o peróxido de carbamida é o princípio ativo mais utilizado em procedimentos de clareamento caseiro (CABALLERO *et al.*, 2006). Essa substância é instável, facilmente se dissocia em uréia e peróxido de hidrogênio (HAYWOOD E HEYMANN, 1989; FASANARO, 1992). Nessa quebra, a concentração de peróxido de hidrogênio se torna aproximadamente um terço da porcentagem original de peróxido de carbamida (MOKHLIS *et al.*, 2000). Em seguida, esse peróxido de hidrogênio libera radicais livres de oxigênio e a uréia é convertida em amônia e dióxido de carbono, conferindo a esta substância a capacidade de interagir com os

cromóforos, o que leva à formação de subprodutos mais claros determinando, assim, à alteração da cor dos dentes (PAIXÃO e HOEPPNER, 1997).

Por utilizar um composto de caráter oxidante, a segurança biológica na realização do clareamento caseiro ainda não está bem esclarecida na literatura. Neste tipo de técnica, como os dentes não são isolados, os tecidos moles da mucosa oral ficam expostos ao agente clareador por períodos relativamente longos. Como um agente oxidante, o peróxido de hidrogênio foi associado com fenômenos de carcinogênese, genotoxicidade, citotoxicidade e envelhecimento (LINK, 1988). Essa associação baseia-se na ação de radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o íon hidroxila ( $OH^-$ ), originários da quebra do peróxido de hidrogênio. Esses radicais podem alterar proteínas e DNA e interferir negativamente na membrana celular (IMLAY e LINN, 1988; POWELL e BALLE, 1991).

Utilizando hamsters, Weitzman, Weitberg e Stossel, em 1986, demonstraram um aumento na ocorrência de carcinoma epidermóide quando da utilização de altas concentrações de peróxido de hidrogênio associado ao carcinógeno 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA). Quando utilizado sozinho, o peróxido de hidrogênio induziu alterações frequentemente associadas com lesões pré-neoplásicas, como hiperqueratose, hiperplasias, núcleos hiper cromáticos e displasia de média severidade, podendo também aumentar a carcinogênese quando associado ao DMBA.

Quando peróxido de hidrogênio a 35 % foi aplicado na mucosa de ratos Wistar, duas vezes por semana, durante três meses consecutivos, Gomez *et al.* (2002) encontraram alterações na ciclina D e no antígeno p16, que são, por sua vez, observados nos períodos iniciais do desenvolvimento de uma lesão cancerosa. Todavia, a comparação com os ratos do grupo controle que receberam apenas água destilada, não demonstrou diferença significativa, possibilitando concluir que o uso crônico de peróxido de hidrogênio, mesmo em altas concentrações, não determinaria alterações no ciclo celular normal.

Estudo *in vitro* realizado por Ribeiro *et al.* (2006) analisou o potencial genotóxico dos agentes clareadores dentais pelo teste do cometa. Para este estudo foram utilizadas células de ovário de hamster chinês (CHO) *in vitro* que foram expostas a seis agentes clareadores dentais comercialmente disponíveis. Os resultados encontrados sugerem que os agentes clareadores dentais poderiam ser

um agente causal da indução de danos no DNA e uma concentração de peróxido de hidrogênio mais elevada induziria lesões mais severas no genoma.

Munro *et al.* (2006a) afirmaram que o uso de clareadores contendo peróxido de hidrogênio ou peróxido de carbamida não parece representar um risco aumentado de câncer bucal na população em geral, incluindo usuários de álcool e/ou fumantes pesados. Além disso, o uso destes agentes clareadores apresentou segurança até mesmo quando do uso acidental por crianças (Munro *et al.* 2006b).

Embora alguns estudos sobre carcinogenicidade do peróxido de hidrogênio sejam considerados inconclusivos, ainda é sugerida a possibilidade do mesmo atuar como agente co-carcinogênico nas concentrações usualmente empregadas na clínica odontológica e nos clareadores de uso caseiro (WEITZMAN *et al.*, 1986).

Tredwin *et al.* (2006) afirmaram que enquanto não for feita uma investigação clínica quanto à possível carcinogenicidade do peróxido de hidrogênio, recomenda-se que produtos clareadores não devem ser usados sem a proteção gengival e que produtos contendo peróxido de hidrogênio devem ser evitados em pacientes com tecidos moles doentes ou danificados.

Como há uma relação causal direta entre fatores etiológicos externos ao organismo e o desenvolvimento do câncer, uma das estratégias de prevenção desta moléstia consiste na identificação de agentes químicos capazes de introduzir lesões no conteúdo informacional da célula, seguida da implementação de medidas de controle do risco genético - visando diminuir a exposição humana a esses compostos.

Uma das formas de se identificar esses agentes genotóxicos é utilizando o teste de micronúcleo (MN). A frequência de micronúcleos em células esfoliadas humanas pode ser utilizada como um “dosímetro endógeno”, presente em tecidos que são alvos específicos de agentes genotóxicos e carcinogênicos (STICH *et al.*, 1985).

Os MN parecem ser marcadores simples e diretos e sua presença aparece aumentada em indivíduos expostos a agentes carcinogênicos (GATTÁS *et al.*, 2001). Essa elevada frequência pode indicar uma probabilidade aumentada de formação de quebras cromossômicas as quais, por sua vez, poderão estar associadas à transformação neoplásica devido à interferência na expressão de um oncogene (RIBEIRO, 1991, HOLLAND, 2008).

As análises de MN em células esfoliadas de tecido epitelial e em linfócitos podem ser utilizadas para avaliar os danos citogenéticos induzidos por agentes potencialmente cancerígenos, aos quais as populações humanas estão usualmente expostas (CAIRNS, 1981; STICH *et al.*, 1982; LAND *et al.*, 1983; BISHOP, 1987; TOLBERT *et al.*, 1991; HOLLAND *et al.*, 2008).

Considerando a controvérsia existente na literatura e a falta de estudos clínicos em humanos, este trabalho tem o propósito de avaliar a indução de dano genético na mucosa gengival normal exposta ao clareador caseiro *Opalescence* com peróxido de carbamida a 15%.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Nº 02/09.

### **Sujeitos**

Foram selecionados 25 pacientes para o Grupo Controle e 25 pacientes para o grupo de clareamento, cinco pacientes do grupo controle não compareceram à segunda ou à terceira coleta e foram excluídos da amostra. Os critérios de exclusão da amostra foram: a) indivíduos do gênero feminino; b) que não tenham entre 18 e 35 anos; c) com hipersensibilidade dentinária; d) que tenham realizado algum tipo de clareamento dental nos últimos dois anos; e) com periodontite ou que tenham realizado tratamento periodontal nos últimos seis meses; f) com problemas gástricos (úlceras pépticas, por exemplo); g) com alergias e respostas idiossincráticas a algum componente do agente clareador; h) dentes com amelogênese ou dentinogênese imperfeita; i) dentes com grau severo de fluorose; j) que tenham sido submetidos a cirurgias orais no último mês; k) diabéticos; l) com história prévia ou atual de neoplasia; m) com lesões bucais clinicamente visíveis em tecidos moles; n) alcoolistas; o) com infecções virais e/ou bacterianas; p) irradiação de face e pescoço; q) uso de drogas ilegais e r) fumantes. Após a assinatura do consentimento pós-informado, todos os pacientes responderam a um questionário

de saúde e estilo de vida. A amostra foi de conveniência e selecionada a partir de estudantes universitários.

### **Grupo Experimental e Grupo Controle**

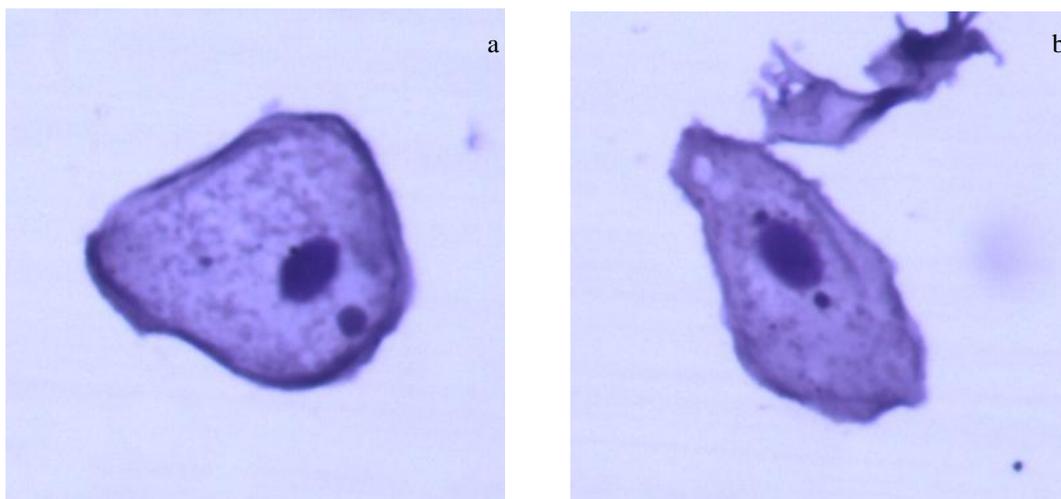
A técnica de clareamento utilizada foi a do clareamento caseiro com moldeira individualizada e foi utilizado o *Opalescence 15%*. Todos os pacientes foram orientados a utilizar a moldeira durante a noite, por um período mínimo de quatro horas, durante 14 dias. A coleta de células da mucosa bucal foi realizada em três momentos: a coleta pré-tratamento no dia da entrega do agente clareador e duas coletas pós tratamento (14 dias após o início do clareamento e 10 dias após o encerramento do tratamento). O sítio da coleta de células foi gengiva inserida da arcada superior na região de premolar a premolar, utilizando um *cytobrush* para raspar.

Para o Grupo Controle, a coleta de células foi realizada nos mesmos tempos do Grupo Experimental, porém sem exposição a nenhum tipo de tratamento clareador.

### **Análise citogenética**

Após a coleta, o *cytobrush* foi agitado em 20 ml de solução tampão colocada em tubos Falcon de 50 ml e centrifugada, duas vezes, a 1500 rpm, por 10 minutos - para obtenção de um precipitado com alta concentração de células esfoliadas. Foram obtidas quatro lâminas por indivíduo a cada coleta, que foram coradas por May-Grunwald Giemsa (MGG) (WILTGEN, 2007). Foi analisado um total de 2.000 células, bem distendidas e isoladas entre si, por indivíduo. As células que apresentaram alterações degenerativas foram descartadas (cariólise, cariorrexe, picnose ou fragmentação nuclear).

A avaliação das lâminas ocorreu em teste cego e o observador foi calibrado. Os núcleos foram avaliados em aumento de 400X (Figura 1), segundo critérios de Tolbert *et al.* (1992) e Sarto (1987), e no aumento de 1000X quando a célula apresentava micronúcleo.



**Figura 1.** Teste de micronúcleos. Células do epitélio oral com micronúcleos (aumento de 400X) (a,b).

### **Análise estatística**

Para verificar a influência do fator idade nos resultados, foi utilizado o teste T. Inicialmente, foram empregados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para verificar se a amostra preenchia os requisitos para a normalidade. Para fins de comparação entre os dois grupos foi empregado o teste Mann-Whitney. O teste de Friedman foi utilizado para comparar os resultados intra-grupos.

### **RESULTADOS**

A distribuição das idades, assim como as frequências de MN por 2000 células por indivíduo nos 25 sujeitos do Grupo Experimental e nos 20 sujeitos do Grupo Controle, está descrita na Tabela 1.

A média entre as idades do Grupo Experimental e do Grupo Controle foi comparada utilizando o teste T (Tabela 2). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Ao serem realizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk constatou-se que os resultados não satisfizeram os requisitos para a normalidade em nenhum dos grupos. Na Tabela 3 podem ser observadas as medianas (Md) e intervalos inter-quartis para as frequências de MN em cada momento nos dois Grupos.

Tabela 1. Distribuição das idades e das frequências de MN por 2000 células por indivíduo em 25 sujeitos do Grupo Experimental e em 20 sujeitos do Grupo Controle.

Indivíduos	Experimental					Controle			
	Idade	FMN*			Idade	FMN*			
		Dia 0	Dia 14	Dia 24		Dia 0	Dia 14	Dia 24	
1	20	0	0	0	23	0	0	2	
2	22	0	0	1	22	1	2	2	
3	22	2	2	3	23	2	2	0	
4	22	0	0	2	26	0	2	0	
5	23	0	1	9	23	0	1	0	
6	22	0	2	4	22	3	2	1	
7	19	1	0	4	21	0	2	1	
8	21	2	2	0	22	2	0	2	
9	21	0	2	3	19	2	0	2	
10	23	0	1	7	19	0	1	0	
11	25	0	0	1	21	1	0	2	
12	22	1	1	6	22	1	0	0	
13	23	1	1	1	22	0	1	0	
14	28	1	1	0	22	2	0	1	
15	24	0	0	0	23	0	0	0	
16	26	0	1	0	23	2	0	2	
17	23	0	1	2	25	1	2	0	
18	21	0	0	2	24	0	0	1	
19	22	1	4	1	22	0	1	0	
20	23	0	0	1	23	0	1	0	
21	22	2	3	2					
22	25	1	2	0					
23	34	1	2	1					
24	23	0	3	3					
25	23	0	2	4					

\*FMN=frequência de MN por 2000 células por indivíduo.

Tabela 2. Idade dos pacientes dos Grupos Experimental e Controle comparada utilizando o teste T.

Grupos	N	Idade (M±DP)
Experimental	25	23,16 ± 2,939
Controle	20	22,35 ± 1,663
P		0,242

\*P = nível mínimo de significância do teste paramétrico T (P<0,05).

Para a comparação das frequências de MN entre os Grupos Experimental e Controle, bem como a sua distribuição relativa, foi empregado o teste de Mann-Whitney. A diferença na frequência de MN observada no dia 24 (P = 0,018) entre os dois grupos foi estatisticamente significativa. O mesmo não foi constatado nas coletas dos dias zero (P = 0,292) e 14 (P = 0,274).

Tabela 3. Comparação entre os valores (mediana) dos grupos experimental e controle nos dias zero, 14 e 24

Dia	Grupos		P
	Experimental	Controle	
	Md (intervalo inter-quartis)	Md (intervalo inter-quartis)	
zero	0,0 (0,0 ; 1,0)	0,5 (0,0 ; 2,0)	0,292
14	1,0 (0,0 ; 2,0)	1,0 (0,0 ; 2,0)	0,274
24	2,0 (0,5 ; 3,5)	0,5 (0,0 ; 2,0)	0,018*

\*P = nível mínimo de significância do teste não-paramétrico Mann-Whitney (P<0,05).

A diferença entre a frequência de MN pré e pós tratamento neste estudo é mostrada na Tabela 4. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa (P<0,05) no Grupo Experimental quando comparadas as coletas dos dias zero e 24 (P = 0,002). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quando comparados os momentos do Grupo Controle (P = 0,736).

Tabela 4. Comparação entre os momentos de coleta dos Grupos Experimental e Controle.

Dia	Grupos	
	Experimental	Controle
	Md (intervalo inter-quartis)	Md (intervalo inter-quartis)
Zero	0,0 (0,0 ; 1,0)	0,5 (0,0 ; 2,0)
14	1,0 (0,0 ; 2,0)	1,0 (0,0 ; 2,0)
24	2,0 (0,5 ; 3,5)	0,5 (0,0 ; 2,0)
P	0,002*	0,736

\*P = nível mínimo de significância do teste não-paramétrico Friedman (P<0,05)

## DISCUSSÃO

A cavidade bucal é exposta diariamente a diversos compostos químicos, presentes na alimentação, higiene, relacionados ao estilo de vida e em decorrência de tratamentos odontológicos. Entre os tratamentos amplamente procurados pelos pacientes, destaca-se o clareamento dentário caseiro. As substâncias envolvidas nessa terapêutica tem propriedades de interagir com as superfícies dentárias para promover a alteração de cor desejada e entram em contato com a mucosa gengival adjacente aos dentes. Não havendo proteção dessa mucosa, pode haver uma exposição ao produto em maior quantidade do que o preconizado. Todavia, ainda não foi estabelecido o dano, em longo prazo, no material genético das células expostas diariamente ao clareamento caseiro.

A coleta foi realizada com *cytobrush* e, de acordo com Holland *et al.* (2008), este parece ser o meio mais efetivo para a coleta de um grande número de células da mucosa bucal. Métodos não invasivos para a obtenção de células por citologia esfoliativa a partir da mucosa exposta aos produtos odontológicos são preferíveis para a investigação das suas potencialidades genotóxicas.

A frequência de micronúcleo em células esfoliadas humanas pode ser utilizada como um “dosímetro endógeno”, presente em tecidos que são alvos específicos de agentes genotóxicos e carcinogênicos (STICH *et al.*, 1985). Além disso, o teste de Micronúcleos em células bucais esfoliadas é de fácil e rápida execução (MAJER, 2001).

A coloração MGG não é específica para o material genético, havendo o risco de ocorrer resultados falso-positivos devido à semelhança dos MN com bactérias e

grânulos de ceratohialina (HOLLAND *et al.*, 2008). A identificação dos MN utilizando os critérios de Tolbert *et al.* (1992) e Sarto *et al.* (1987), com aumento 1000X, permitiu o diagnóstico diferencial.

Os critérios de exclusão para a seleção da amostra foram feitos de maneira a reduzir as variáveis. Entre esses critérios destaca-se a escolha da faixa etária de 18 a 35 anos (Tabela 1). Gattás e Saldanha (1997) relataram que houve um aumento discreto, mas significativo, na frequência de aberrações cromossômicas estruturais com o processo de envelhecimento. Este viés não foi observado no presente estudo, pois os dois grupos eram compostos por indivíduos da mesma faixa etária e as frequências de MN observadas não podem ser atribuídas à idade dos pacientes (Tabela 2).

As coletas foram realizadas em três momentos, sendo que a última ocorreu dez dias após o término do tratamento clareador, data em que se observa o maior efeito indutor de MN, conforme descrito por Wiltgen (2007). Isso se deve à estrutura estratificada da mucosa bucal e do *turnover* das células, já que a formação do micronúcleo ocorre na camada basal (HOLLAND *et al.*, 2008). Portanto, a coleta de células feita no dia 14, ao final do tratamento clareador, representou o dano genético induzido nos primeiros dias de tratamento, e a coleta feita no dia 24 representou os danos acumulados durante todo o tratamento. No presente estudo, também foi observado o incremento na frequência de MN no décimo dia após o término do tratamento (Tabelas 3 e 4), o que é indicativo do potencial genotóxico do agente clareador *Opalescence*, representado por eventos relacionados com quebras cromossômicas (eventos clastogênicos e/ou aneugênicos).

A frequência de MN encontrada na última coleta foi estatisticamente significativa em relação à primeira coleta e ao Grupo Controle (Tabelas 3 e 4), o que demonstra a genotoxicidade do gel clareador *Opalescence 15%*, cujo princípio ativo é peróxido de carbamida, que é o mais utilizado em clareadores dentais caseiros. Por tratar-se de um peróxido, existe a possibilidade dos radicais livres de oxigênio liberados durante o processo de clareamento dentário interagir com estruturas celulares induzindo genotoxicidade e citotoxicidade (NAIK *et al.*, 2005; LI, 1996). Entretanto, esses aspectos ainda não foram bem esclarecidos na literatura.

Dahl (2006) realizou um estudo sobre a avaliação de risco do uso de agentes clareadores. Constatou que um nível de segurança suficiente não foi atingido em determinadas situações clínicas, tais como o clareamento de um arco com peróxido

de carbamida a 35%, o uso de peróxido de carbamida a 22% em várias aplicações por dia e o clareamento de ambos os arcos com peróxido de carbamida a 22%. Sua recomendação é evitar o uso de concentrações mais elevadas de peróxido de carbamida do que 10% quando se executa um clareamento externo.

Woolverton *et al.* (1993) investigaram dois produtos a base de peróxido de carbamida a 10% (um com Carbopol e outro sem Carbopol) quanto a letalidade e genotoxicidade após administração oral em ratos e quanto a citotoxicidade nos fibroblastos de ratos *in vitro*. A genotoxicidade foi medida utilizando o teste de micronúcleos e foi negativa para os dois agentes, em comparação com os controles positivos e negativos. A coleta foi realizada após a morte dos ratos. Ambos foram considerados seguros para uso em humanos, pois se mostraram menos tóxicos do que outros compostos amplamente utilizados em odontologia. Entretanto, este resultado negativo para genotoxicidade pode ser atribuído ao dia escolhido para a coleta de células, visto que a maior incidência de MN é observada dez dias após o término do tratamento, como no presente estudo.

Em outro estudo *in vitro* realizado por Ribeiro *et al.* (2006), que analisou o potencial genotóxico dos agentes clareadores dentais pelo teste do cometa, os resultados encontrados sugeriram que os agentes clareadores dentais podem ser responsáveis pelo aumento de danos no DNA. Além disso, os autores observaram que uma concentração de peróxido de hidrogênio mais elevada induziu lesões mais severas no genoma. O teste do cometa quantifica o dano genético prévio à ação dos mecanismos de reparo do DNA, o que significa que as lesões ainda não foram fixadas. Já o teste de micronúcleos quantifica as lesões fixadas, sendo uma ferramenta mais indicada para a investigação das potencialidades genotóxicas de materiais dentários já liberados para uso em humanos, como os agentes clareadores.

Apesar de o presente estudo empregar coleta do material biológico pré e pós tratamento com o agente clareador, onde o sujeito foi o seu próprio controle, optou-se por ter um Grupo Controle com os três momentos de coleta. As frequências observadas nos três momentos do Grupo Controle, que não tiveram diferenças estatísticas entre si, associadas ao aumento da frequência de MN no dia 24 do Grupo Experimental, sugerem que a atividade genotóxica encontrada se deve ao agente clareador e que nenhuma outra variável interferiu nos resultados, tais como faixa etária, gênero, álcool, tabaco, condições de saúde bucal e doenças sistêmicas

(Tabela 4). Estudos experimentais indicam que a taxa espontânea de MN, observada nos controles negativos, apresenta variações significativas, que são dependentes das populações estudadas. Porém, esses valores estão diretamente relacionados com o número de indivíduos analisados (RAMIREZ, 2002); com amostras pequenas observam-se valores muito próximos de zero, em conformidade com os resultados encontrados no Grupo Controle.

A compra dos clareadores dentários pode ser feita livremente nas casas de materiais dentários, nas farmácias de manipulação e em sites eletrônicos especializados, sem a supervisão de um cirurgião-dentista. Esta facilidade aumenta o risco do uso indiscriminado desses produtos. Há a necessidade da avaliação do cirurgião-dentista quanto à indicação do seu uso, levando em conta as condições de saúde bucal e sistêmica, bem como a relação risco/benefício dessa terapêutica. Esta conduta é corroborada por Basting *et al.*(2003) também relataram a necessidade de supervisão profissional na utilização de clareadores caseiros para garantir a correta aplicação dos agentes clareadores, o uso da quantidade recomendada de gel ou pasta, a duração adequada do tratamento e medidas a tomar para evitar reações adversas. A decisão de administrar ou não produtos clareadores e o controle dos efeitos do clareamento devem ficar nas mãos de cirurgiões-dentistas e, certamente, não como acontece no presente, quando são vendidos como cosméticos, sem qualquer restrição, apesar dos riscos potenciais para a saúde que os peróxidos oferecem (GOLDBERG, 2009).

O papel central da genética toxicológica se refere à identificação de agentes capazes de induzir mutações gênicas e aberrações cromossômicas, tanto estruturais como numéricas, que são eventos envolvidos em diversas desordens da saúde humana, desde anomalias neurológicas - associadas com o processo gradual e progressivo do envelhecimento - até a indução de tumores malignos. Torna-se premente a investigação de todos os produtos de uso odontológico, tanto os de uso exclusivo em consultórios quanto os de venda livre, no que se refere às suas potencialidades genotóxicas. O emprego de ensaios genéticos com células humanas obtidas por citologia esfoliativa, principalmente aqueles de fácil e rápida execução e de baixo custo como o teste de MN com coloração por MGG, pode ser o ponto de partida para esta investigação. A partir dos resultados obtidos nessa primeira avaliação, uma bateria de testes mais sensíveis poderia ser utilizada visando qualificar a atividade genotóxica (ações mutagênica e recombinogênica, bem como

aneugênese e clastogênese). Além disso, essas pesquisas fornecerão subsídios à indústria para o aprimoramento das fórmulas de materiais dentários com o propósito de minimizar o seu risco genético.

## **CONCLUSÕES**

A partir dos resultados pode-se concluir que:

1. O uso do agente clareador *Opalescence* 15% mostrou que houve aumento na frequência de MN no décimo dia após o término do tratamento.
2. O *Opalescence* 15% apresentou atividade genotóxica, sendo necessários estudos adicionais, separando o princípio ativo (peróxido de carbamida a 15%) dos demais componentes da fórmula do clareador para estabelecer o perfil genotóxico do produto.
3. Incluir um Grupo Controle com os mesmos momentos de coleta que o Grupo Experimental auxilia na detecção de qualquer fator que possa interferir nos resultados.

## **AGRADECIMENTOS**

Nós somos gratos às seguintes instituições de fomento à pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Pró-reitoria de pesquisa da UFRGS (PROPESQ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); somos gratos também pela contribuição do Laboratório de Patologia da UFRGS.

## **REFERÊNCIAS**

Basting RT, Rodrigues Jr AL, Serra MC (2003). The effects of seven carbamide peroxide bleaching agents on enamel microhardness over time. *J Am Dent Assoc.* 134: 1335-1342.

Caballero AB, Navarro LF, Lorenzo JA (2006). At-home vital bleaching: a comparison of hydrogen peroxide and carbamide peroxide treatments. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 11: 94-9.

Cairns J (1981). The origin of human cancers. *Nature*. 289: 353-57.

Dahl JE, Pallesen U (2003). Tooth bleaching – a critical review of the biological aspects. *Crit Rev Oral Biol Med*. 14(4): 292-304.

Fasanaro TS (1992). Bleaching teeth: history, chemical, and methods used for common tooth discolorations. *J Esthet Dent*. 4(3): 71-8.

Gattás GJ, Saldanha PH. (1997) Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of abstinent alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res*. 21(2): 238-243.

Gattás GJF, Cardoso LA, Medrado-Faria MA, Saldanha PH (2001). Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occup Med*. 51(2): 107-113.

Goldberg M, Grootveld M, Lynch E (2009). Undesirable and adverse effects of tooth-whitening products: a review. *Clin Oral Investig*. Jun 20.

Gomez RS, De Castro RA, Dutra RA, Vasconcellos WA, *et al.* (2002). Effects of a bleaching agent containing 35% carbamide peroxide on the immunolocalization of cyclin D and p16. *J.Oral Rehabil*. 29(9): 906-9.

Haywood VB, Heymann HO (1989). Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int*. 20(3): 173-6.

Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E *et al.* (2008). The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage:

The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* doi: 10.1016/j.mrrev.2008.03.007.

Imlay JA, Linn S (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 240: 1302-9.

Ito Y, *et al.* (1981). Improved 4-aminantipyrine colorimetry for detection of residual hydrogen peroxide in noodles, fish paste, dried fish, and herring roe. [\*J Assoc Off Anal Chem\*](#). 64(6):1448-52.

Land H, Parada L, Weinberg R (1983). Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*. 222, 771-8.

Li Y (1996). Biological Properties of Peroxid-containing Tooth Whiteners. *Food Chem. Toxicol.* 34: 887-904.

Link EM (1988). The mechanism of pH-dependent hydrogen peroxide cytotoxicity in vitro. *Arch Biochem Biophys* 265, 362-72.

Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F (2001). Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res.* 489: 147-172.

Mokhlis GR, Matis BA, Cochran MA, Eckert GJ (2000) A clinical evaluation of carbamide peroxide and hydrogen peroxide whitening agents during daytime use. *J Am Dent Assoc*. 131: 1269-1277.

Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R (2006a). Use of hydrogen peroxide-based tooth whitening products and its relationship to oral cancer. *J Esthet Restor Dent*. 18(3): 119-25.

Munro IC, Williams GM, Heymann HO, Kroes R (2006b). Tooth whitening products and the risk of oral cancer. *Food Chem Toxicol.* 44(3): 301-15.

Naik S, Tredwin CJ, Scully C (2005). Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching): Review of safety in relation to possible carcinogenesis. *Oral. Oncol.* 42: 668-674.

Paixão RF, Hoepfner MG (1997). Clareamento de dentes vitais e microabrasão do esmalte dental. In: A.L.S. Busato. (Org.). *Dentística. Restaurações em Dentes Anteriores.* Artes Médicas: São Paulo. 1: 297-339.

Powell LV, Bales DJ (1991). Tooth bleaching: its effects on oral tissues. *J Amer Dent Assoc, Chicago.* 122 (11).

Ramirez A, Saldanha PH (2002). Micronucleus investigations of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet. Mol. Res.*1(3): 246-260.

Ribeiro LR (1991). Teste de micronúcleo em células esfoliadas. In: Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone-Neto R. *Metagênese, Teratogênese e Carcinogênese. Brasil, Sociedade Brasileira de Genética.* 91-96.

Ribeiro DA, Marques MEA, Salvadori DMF (2006). Study of DNA damage induced by dental bleaching agents *in vitro.* *Braz Oral Res.* 20(1): 47-51.

Sarto F *et al.* (1987). The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis.* 2: 11-17.

Stich HF, Curtis R, Parida BB (1982). Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int. J. Cancer, New York.* 30: 553-559.

Stich HF, Stich W, Rosin MP (1985). The micronucleus test on exfoliated human cells. In: A Muhammed A, Von Borstel(ed) RC: *Basic and Applied Mutagenesis*. Plenum Press, New York and London. 337-342.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW (1991). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am J Epidemiol*. 134: 840-850.

Tolbert PE, Shy CM, Allen JW (1992). Micronuclei and other anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res. Amsderdan*. 271: 60-77.

Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C (2006). Hydrogen peroxide tooth whitening (bleaching) products: review of adverse effects and safety issues. *Br Dental J*. 200(7): 371-6.

Weitzman SA, Weitberg AB, Stossel TP (1986). Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. *J. Periodontol*. 57: 685-8.

Wiltgen A (2007). Investigação do potencial genotóxico de anti-sépticos bucais – *in situ*. *Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular), Universidade Luterana do Brasil*. 45f.

Woolverton CJ, Haywood VB, Heymann HO (1993). Toxicity of two carbamide peroxide products used in nightguard vital bleaching. *Am. J. Dent*. 6: 310-314.

#### 4. DISCUSSÃO AMPLIADA

O teste de micronúcleos é, atualmente, um dos ensaios genéticos amplamente utilizados na pesquisa das potencialidades genotóxicas de agentes químicos. A citologia esfoliativa de mucosa bucal fornece material biológico em grande quantidade para a sua realização. Todavia, é preciso estabelecer critérios de exclusão e inclusão na seleção dos indivíduos componentes da amostra que minimizem o risco de fatores de confusão nos resultados. Alguns trabalhos orientaram os critérios de exclusão e inclusão da amostra deste estudo.

A radiação ionizante tem papel importante no tratamento de neoplasias malignas, mas também produz danos genéticos. Estudo de Sarto *et al.* (1987) verificou que os raios gama induziram apenas micronúcleos resultantes da quebra cromossômica, cuja frequência aumentou linearmente com a dose aplicada, e foi rebaixada para o nível inicial de 7-12 dias após o término da radioterapia. Em função desta variável, foram excluídos pacientes que tivessem passado por tratamentos de radioterapia e radiografia odontológica nos últimos seis meses.

Quanto à idade e ao gênero, como fatores passíveis de alterar a frequência de MN, Holland *et al.* (2008) relataram que muitos estudos investigaram estas variáveis sem, no entanto, comprovar uma relação causal direta. Desta forma, optou-se por estabelecer o intervalo etário de 18 a 35 anos para os Grupos Controle e Experimental, bem como limitar a amostra a indivíduos do gênero masculino, o que contribuiu para a redução de variáveis que poderiam interferir no resultado do nosso estudo.

Quando Reis *et al.* (2006) avaliaram as frequências de micronúcleo, relação núcleo/citoplasma anormal, picnose, cariorrexe e cariólise em células esfoliadas da mucosa jugal e da borda lateral da língua de indivíduos não fumantes, sendo 36 alcoólatras e 18 abstêmios, concluiu que o consumo crônico de etanol pode estar associado a alterações citológicas carcinogênicas na mucosa bucal, mesmo na ausência de exposição ao fumo. Assim, os sujeitos da nossa pesquisa foram orientados a não ingerir bebidas alcoólicas durante o experimento.

Em relação aos fumantes, Proia *et al.* (2006) constataram que, apesar de existirem alguns resultados conflitantes, nota-se que a predominância de artigos relatou correlação positiva das alterações de células bucais com o tabagismo. Esta

conclusão é concordante com as revisões publicadas anteriormente, que demonstraram associação positiva de mudanças em linfócitos humanos com o tabaco. Esta variável também foi considerada um critério de exclusão da amostra.

A identificação de fatores de confusão que afetam a frequência de MN em células da mucosa bucal não tem sido adequadamente reconhecida e quantificada. O valor preditivo da frequência de MN em células bucais em relação ao potencial carcinogênico ainda não está estabelecido, diferentemente do teste de micronúcleos em linfócitos. Embora o teste de MN em células bucais ainda não seja considerado um biomarcador de risco de câncer, pode ser reconhecido como um biomarcador de genotoxicidade.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R. C. *et al.* Effects of a 10% carbamide peroxide bleaching agent on rat oral epithelium proliferation. **Braz. Dent. J.**, v.13, n.3, Ribeirão Preto. 2002.

AMES, J. W. Removing stains from mottled enamel. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.24(10), p.1674-7. 1937.

ASHBY, J.; TENNANT, R.W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. **Mutat. Res.**, v.257(3), p.229-306. 1991.

BANOCZY, J. Exfoliative cytologic examinations in the early diagnosis of oral cancer. **Int. Dent. J.**, v.26(4), p.398-404. 1976.

BONASSI, S.; AU, W. W. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. **Mutat. Res.**, v.511(1), p.73-86. 2002.

DIETZ, J.; DIEHL, A. S.; PROLLA, J. C. Pesquisa de micronúcleos na mucosa esofágica e sua relação com fatores de risco ao câncer de esôfago. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v.46, n.3, p.207-211. 2000.

GATTÁS, G. J. *et al.* Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. **Occup. Med.**, v.51, n.2, p.107-113. 2001.

GEARD, C.R., CHEN, C.Y. Micronuclei and clonogenicity following low and high dose rate  $\alpha$  irradiation of normal human fibroblasts. **Radiat. Res.**, v.124, p. S56-S61, 1990.

HEDDLE, J.A. *et al.* Micronucleus as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environ. Mol. Mutagen**, 18:277-291, 1991.

ISHIDATE, M. JR.; HARNOIS, M. C.; SOFUNI, T. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. **Mutat. Res.**, v.195(2), p.151-213. 1988.

MAJER, B.J. *et al.* Use of the micronucleous assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. **Mut. Res.**, v.489, p.147-172. 2001.

MUNERATO, M. C. *et al.* Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrol in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. **Mut. Res.**, v.582, n.1-2, p.87-94. 2005.

PAPANICOLAOU, G. N. ; TRAUT, H. F. The Diagnostic Value of Vaginal Smears in Carcinoma of the Uterus. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.42, n.2, p.193-206. Aug. 1941.

PASTOR, S. *et al.* Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**. v.16, n.6, p.539-545. 2001.

PROIA, N. K. *et al.* Smoking and Smokeless Tobacco-Associated Human Buccal Cell Mutations and Their Association with Oral Cancer – A Review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers**, v.15(6), p.1061-1077. 2006.

RAMEL, C. Short-term testing: are we looking at wrong endpoints? **Mutat. Res.**, v.205(1-4), p.13-24. 1988.

RAMIREZ, A. (2000). Análise em Células Metanucleadas em Alcoólicos Portadores de Carcinoma Oral. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade de São Paulo**. 182f.

REIS S. R. A. *et al.* Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. **Braz. Oral Res.**, v.20(2), p.97-102. 2006.

SANDLER, H. C. *et al.* Oral exfoliative cytology for detection of early mouth cancer. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.**, St Louis, v.13, n.8, p.994-1009. Aug. 1960.

SANDLER, H. C. Reability of oral exfoliative cytology for detection of oral cancer. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.68, p.489- 499. Apr. 1964.

SARAN, R. *et al.* Risk assessment of oral cancer in patients with oral pre-cancerous states of the oral cavity using micronucleous test and challenge assay. **Oral Oncology** . v.44, p.354– 360. 2008.

SKIPPER, P. L. *et al.* Monocyclic Aromatic Amines as Potential Human Carcinogens: Old is New Again.

SILVERMAN Jr. S.; BECKS, H.; FARBER, S. M.; The diagnostic value of introral cytology. **J. Dent. Res.**, Washington, v.37, n.2, p.195-205, Apr. 1958.

TAM, L. Vital tooth bleaching: review and current status. **J. Can. Dent. Assoc.**, v.58(8), p.654-5, 659-60, 663. 1992.

TITENKO-HOLLAND, N.; MOORE, L. E.; SMITH, M. T. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. **Mutat. Res.**, v.312(1), p.39-50. 1994.

TITENKO-HOLLAND, N. *et al.* Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. **Mutat. Res.**, v.417, p. 101-104. 1998.

TORRES-BUGARIN, O. *et al.* Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. **Mutat. Res.**, v.413, p.277-281. 1998.

ANEXO A – Informação e consentimento pós-informação para realização de um estudo clínico.

As informações contidas neste foram fornecidas pelas alunas Ana Rosa De Toni e Heloisa Dallé e pelo doutorando Fabrício Mezzomo Collares, sob a orientação da professora Maria Cristina Munerato, objetivando firmar acordo por escrito, mediante o qual o paciente envolvido no estudo, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação. Mediante alguma necessidade, durante o procedimento clareador, o paciente poderá entrar em contato pelos telefones: (54) 91573742 (Ana Rosa De Toni) ou (51) 93112787 (Heloisa Dallé).

**01 - TÍTULO DO PROJETO: INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO CLAREADOR CASEIRO COM PERÓXIDO DE CARBAMIDA A 15% NA MUCOSA BUCAL UTILIZANDO TESTE DE MICRONÚCLEO.**

- **02 - OBJETIVO PRINCIPAL:** Avaliar a indução de dano genético na mucosa gengival normal exposta ao clareador caseiro *Opalescence* com peróxido de carbamida a 15%.

**03 - JUSTIFICATIVA:** O clareamento dental vem sendo cada vez mais realizado por pessoas que desejam melhorar a estética de seu sorriso. Os produtos para tal fim sofreram muitas mudanças e melhorias, que tornam hoje o clareamento uma técnica eficaz, que na maioria das pessoas é satisfatório, atendendo suas expectativas. No entanto, apesar de funcionar e serem realizados por um grande número de pessoas, pouco se sabe sobre o potencial desse procedimento em contribuir no desenvolvimento de lesões cancerígenas e alterações mutagênicas.

**04 - PROCEDIMENTOS:** Voluntários com interesse em realizar clareamento caseiro para dentes vitais participarão do estudo. Serão confeccionadas moldeiras individualizadas e será fornecida ao paciente uma bisnaga contendo agente clareador suficiente para uma semana de tratamento. Serão repassadas ao paciente instruções do modo de utilização do produto. O tratamento terá duração de quatro semanas, sendo que serão necessárias sete consultas de avaliação, onde serão observadas as condições da mucosa, possíveis efeitos adversos decorrentes do tratamento e coleta de células da gengiva inserida (próximo ao dente) utilizando citologia esfoliativa (raspagem da mucosa com *cytobrush* que é uma escova bem

macia para remover o material da gengiva sem machucar). Este material será devidamente fixado e posteriormente submetido à avaliação das alterações celulares.

**05 – POSSÍVEIS EFEITOS ADVERSOS:** O principal desconforto esperado é a ocorrência de sensibilidade transitória durante o período de tratamento. Na intolerância dessa sensibilidade e se for de interesse do paciente, esse poderá se retirar do estudo interrompendo o tratamento. Para casos de sensibilidade de maior importância poderão ser realizadas aplicações tópicas de fluoreto de sódio, com o objetivo de reduzir a gravidade do caso. Existe a possibilidade da ocorrência de lesões nos tecidos periodontais. Essas lesões são reversíveis após o término do tratamento. Se for de desejo do paciente, e/ou os avaliadores assim decidirem, o tratamento poderá ser interrompido. Há um compromisso de parte do responsável pelo projeto do pronto atendimento em caso de ocorrência de dor ou desconforto por parte dos pacientes.

**06 - BENEFÍCIOS PARA OS VOLUNTÁRIOS:** O benefício para os voluntários nesse estudo é o clareamento de seus dentes, levando a uma melhoria estética sem qualquer tipo de investimento financeiro.

**07 - OBRIGAÇÕES DO VOLUNTÁRIO:** Os voluntários deverão se comprometer em comparecer às consultadas marcadas e a utilizar o produto conforme as instruções previamente estabelecidas, salvo a ocorrência de algum evento previsto ou não no item cinco que impossibilite a continuação do tratamento. A fidelidade dos resultados obtidos neste estudo depende da correta utilização do produto, portanto, a colaboração dos voluntários é fundamental. Em caso de quaisquer dúvidas durante o tratamento, o voluntário poderá entrar em contato com os autores.

**08 - INFORMAÇÕES ADICIONAIS:** Os pacientes tem a garantia de que receberão respostas a suas perguntas e esclarecimentos das dúvidas sobre o estudo sempre que for preciso ou solicitado ao pesquisador. Os voluntários não serão identificados na publicação do trabalho.

**09 - RETIRADA DO CONSENTIMENTO:** Os voluntários tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, mesmo que isso acarrete perdas irreparáveis para o pesquisador. O tratamento clareador será concluído mesmo que o voluntário deixe de participar do estudo.

## **10 - CONSENTIMENTO APÓS INFORMAÇÃO**

Eu, \_\_\_\_\_, certifico que, tendo lido as informações prévias, contidas no **Anexo A** (“Informação e consentimento pós-informação para realização de um estudo clínico.”) e tendo sido suficientemente esclarecido pelas alunas Ana Rosa De Toni e Heloisa Dallé sobre os itens, estou plenamente de acordo com a realização deste estudo, autorizando que eu possa receber as aplicações dos produtos especificados acima pelo tempo descrito.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
(nome legível do paciente)

\_\_\_\_\_  
(assinatura do paciente)

\_\_\_\_\_  
(número do R.G.)

\_\_\_\_\_  
(nome legível da testemunha)

\_\_\_\_\_  
(assinatura da testemunha)

\_\_\_\_\_  
(número do R.G.)

\* Elaborado com base na resolução 01/88 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, publicada no Diário Oficial, 14/06/1988, Brasília, p. 10713-8.

Obs.: os pacientes terão idade entre 18 e 30 anos.

ANEXO B – Questionário - Ficha para registro anamnésico aplicado aos pacientes dos grupos controle e teste

Registro do paciente no estudo.....

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**I - Identificação**

1. Nome:.....
2. RG: .....
3. Genero: [M] Masculino [F] Feminino .....[\_\_\_]
4. Etnia: [B] Branco [A] Amarelo [M] Mulato [N] Negro [O] Outro .....[\_\_\_]
5. Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
6. Idade: .....[\_\_\_]
7. Nacionalidade: ..... Descendência: .....
8. Endereço: .....
9. Telefone: .....
10. Escolaridade: ..... Profissão: .....
11. Há quanto tempo exerce a profissão? .....
12. Estado Civil: ..... Filhos: .....
13. Cônjuge: ..... Idade: .....
14. Consanguinidade: .....
15. Parentesco com outros indivíduos da pesquisa: .....
16. Nível sócio econômico: Classe [1] Baixa [2] Média [3] Alta.....[\_\_\_]

**II - Antecedentes Pessoais**

17. Fuma? [S] Sim [N] Não .....[\_\_\_]
18. Já fumou? [S] Sim [N] Não .....[\_\_\_]
19. Bebe? [S] Sim [N] Não .....[\_\_\_]
20. Há quanto tempo (meses)? .....[\_\_\_]
21. Tipo: [1] Cachaça [2] Whisky [3] Vodka [4] Vinho [5] Outras ..... [\_\_|\_\_|\_\_]
22. Quantidade/dia - nº copos/dia .....[\_\_\_]
23. Já bebeu? [S] Sim [N] Não .....[\_\_\_]
24. Tipo: [1] Cachaça [2] Whisky [3] Vodka [4] Vinho [5] Outras ..... [\_\_|\_\_|\_\_]
25. Quantidade/dia - nº copos/dia .....[\_\_\_]

26. Há quanto tempo (meses) deixou? .....[\_\_\_]
27. Por quanto tempo (meses) bebeu .....[\_\_\_]
28. Contato com substâncias tóxicas? [S] Sim [N] Não .....[\_\_\_]
29. Quais? .....[\_\_\_]
30. Por quanto tempo (meses)? .....[\_\_\_]
31. Período (meses) sem contato com a(s) substância(s) .....[\_\_\_]
32. Toma café? [\_\_\_] Sim [\_\_\_] Não  
 Frequencia: [\_\_\_] 1x ao dia [\_\_\_] 3x ao dia [\_\_\_] várias
33. Toma chimarrão? [\_\_\_] Sim [\_\_\_] Não  
 Frequencia: [\_\_\_] 1x ao dia [\_\_\_] 3x ao dia [\_\_\_] várias
34. História de exposição à radiação: [S] Sim [N] Não .....[\_\_\_]
35. Número de RX .....[\_\_\_]

### III - História Médica

36. Usa habitualmente algum tipo de medicamento? [S] Sim [N] Não .....[\_\_\_]
37. Quais? [A] Antibiótico [V] Vitamina [I] Antiinflamatório [X] Xarope [O] Outros.....[\_\_\_]
38. Frequência/dia: .....[\_\_\_]
39. Tipo: .....
40. Já usou algum tipo de medicamento? [S] Sim [N] Não .....[\_\_\_]
41. Quais? [A] Antibiótico [V] Vitamina [I] Antiinflamatório [X] Xarope [O] Outros.....[\_\_\_]
42. Frequência/dia: .....[\_\_\_]
43. Tipo: .....
44. Há quanto tempo (meses) deixou? .....[\_\_\_]

Observações .....

.....

.....

Fonte: Adaptação RAMIREZ, 2000.

### ANEXO C – Coloração May-Grunwald Giemsa

#### Preparo das lâminas:

- (A) Preparar uma suspensão celular e colocá-la sobre a lâmina;

#### Lavagens:

(B) Após a coleta do material são realizadas duas lavagens com a solução buffer. Esta lavagem é feita utilizando centrifugação a 1500 rpm durante 10 min cada.

(C) Depois da última lavagem, é retirada de 50-100µl ( $1,5 \times 10^{-6}$  –  $2 \times 10^{-6}$  ml) de suspensão celular e colocada sobre as lâminas em forma de gotas. Esta quantidade equivale a 3000 – 5000 células por lâmina.

**Lâminas:**

(D) As lâminas devem estar pré-aquecidas (37 °C).

**Secagem do material:**

(E) As lâminas devem ser secas por 15 min em placa quente.

**Fixação do material:**

(F) A fixação é feita em metanol 80% (gelado) por 30 min. Após deixar secando overnight em temperatura ambiente.

**Coloração do Material (May-Grunwald Giemsa):**

(G) Preparar a solução de coloração May-Grunwald (0.25g/100ml de metanol);

(H) Fazer a coloração destas lâminas durante 3 minutos;

(I) Colocar as lâminas em água destilada por 1 minuto;

(J) Após colorir com Giemsa 10% (solução estoque diluída em 1:10 de PBS) por 7 minutos;

(K) Lavar as lâminas duas vezes em água destilada – 3 minutos cada lavagem;

(L) Secar à temperatura ambiente.

**Solução de Buffer (pH 7):**

0.01 M Tris-HCl

0.1 M EDTA

0.02 M NaCl