**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL**

**EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS EM PACIENTES COM APARELHO
ORTODÔNTICO CORRETIVO AVALIADOS POR FREQUÊNCIA DE
MICRONÚCLEOS**

María Gabriela Flores Bracho

**Ribeirão Preto
2015**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL**

**EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS EM PACIENTES COM APARELHO
ORTODÔNTICO CORRETIVO AVALIADOS POR FREQUÊNCIA DE
MICRONÚCLEOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, área de Concentração em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aluna: María Gabriela Flores Bracho.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E
PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Flores Bracho, María Gabriela.

Efeitos citotóxicos e genotóxicos em pacientes com aparelho ortodôntico corretivo avaliados por frequência de micronúcleos, Ribeirão Preto, 2015.

89p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Programa de Pós-graduação em Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano

1. Ortodontia corretiva 2. Genética 3. Citogenética 4. Teste para micronúcleos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flores-Bracho, MG. **Efeitos citotóxicos e genotóxicos em pacientes com aparelho ortodôntico corretivo avaliados por frequência de micronúcleos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria, área de Concentração em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Ciências.

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr.

Instituição:

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

Prof. Dr.

Instituição

Julgamento: _____ **Assinatura:** _____

DADOS CURRICULARES

MARIA GABRIELA FLORES BRACHO

Nascimento	09 de Julho de 1987- Quito/Equador
Filiação	Oscar Rubén Flores Jaudeli del Carmen Bracho
2005-2010	Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia da Universidade Central do Equador- UCE.
2012-2015	Especialização em Ortodontia Associação Paulista de Cirurgões Dentistas de Ribeirão Preto- APCD.
2013-2014	Curso de Aperfeiçoamento no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2013-2014	Curso de Aperfeiçoamento Dor Orofacial e Disfunção Têmporo Mandibular. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2014-2015	Curso de Aperfeiçoamento de Preparo de Pacientes para Cirurgias Ortognáticas Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP
2013-2015	Aluna do Mestrado em Ciências Área de concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP Orientador: Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano Bolsa: Cnpq

“O sucesso não vem do reconhecimento alheio. Ele é o resultado daquilo que
você plantou com amor.”

Manuscrito encontrado em Acra

Paulo Coelho.

Dedicatória

DEDICATÓRIA

A **Dios**, por ser mi guardián y protector, por estar de mi lado siempre. En los momentos más felices yo te alabo y siento tu presencia. En los momentos de dificultad, rezo y tú me escuchas. Siempre has estado presente en mi vida y sé que todo lo que tengo y todas las experiencias vividas tú las has permitido. Gracias infinitas por tu misericordia y amor infinito.

A mi mamita **Jaudeli**, por el amor incondicional, por ayudarme a cumplir mis sueños, porque a pesar de la distancia y las dificultades, nunca me dejaste sola, siempre siento tu respaldo, tu amor y tu protección. Gracias por tus palabras de aliento, por tu dedicación y esfuerzo para que nunca nos falte nada, gracias por que tus actitudes siempre fueron más importantes que tus palabras. Te Amo mamita.

A mi **Mapuchito**, por ser mi mejor amigo, por creer siempre en mí, por tus palabras de fortaleza en los momentos de angustia, por alentarme a luchar siempre por mis sueños, a nunca desistir y creer que lo puedo conseguir, por tu amor, por escucharme en silencio y respetar cada una de mis decisiones. Gracias Mapuchito.

Por ustedes y para ustedes yo me esfuerzo cada día para conseguir mis objetivos, verlos sonreír y que sientan orgullo de mis conquistas, hace que todo esfuerzo y todo sacrificio valga la pena y tenga sentido. Ustedes son mi fortaleza y mi inspiración. Gracias por todo lo que significan en mi vida, pido a Dios me permita recompensar todo lo que hacen por mí. Los Amo.

“Sólo se puede decir que estamos vivos en esos momentos cuando nuestros corazones están conscientes de nuestros tesoros”.

Thornton Wilder

Agradecimento Especial

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador. **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, a quem agradeço infinitamente, por sem me conhecer, me dar a oportunidade de começar um projeto juntos, obrigada por acreditar na minha capacidade e me receber como aluna. Admiro ao senhor, não só como professor e pesquisador, se não também como pessoa, seu carisma para ensinar, sua organização e dedicação em todos seus projetos, me inspiram a seguir seus passos. Obrigada por sempre estar disposto a me ajudar e me orientar com palavras sábias durante todo meu processo de aprendizado. Muito Obrigada de coração e que Deus sempre cuide de você e sua família.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.”

(Paulo Freire)

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

À **Universidade de São Paulo**, na pessoa do atual diretor, **Prof. Dr. Marco Antonio Zago** e do vice-diretor, **Prof. Dr. Vahan Agopyan**.

À **Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Valdemar Mallet da Rocha Barros** e a Vice – Diretora **Prof. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva** e da vice-coordenadora, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**.

À **Cnpq** pela bolsa concedida.

Aos professores da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Profa. Dra. Lea Assed Bezerra da Silva**, **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, **Profa. Dra. Adelvina Campos de Freitas**, **Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz**, **Profa. Dra. Andiará de Rossi Daldegan**, **Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, **Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto**, **Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva**, **Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho**, por repassarem seus conhecimentos e por sua colaboração e incentivo durante minha formação acadêmica, sendo meu exemplo de excelência e dedicação.

Aos Professores do Laboratório Citogenético e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, **Profa. Dra. Catarina Satie Takahashi** e **Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto Hojo**, por sua disposição e ajuda ao me permitir realizar meu projeto no seu Laboratório.

À **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, pelas suas palavras de motivação e carinho, por sua disposição e amizade. Muito obrigada.

À **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, exemplo de profissional e professor, obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, você é uma inspiração para mim.

À **Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano**, por sua amizade e preocupação, por ser um orgulho e exemplo para todos os estrangeiros que saímos de nosso país em procura de um sonho. Obrigada pela sua amizade e por todos os conhecimentos transmitidos durante o curso de bruxismo em crianças.

À **Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva** pela disponibilidade e orientação nas análises estatísticas dos resultados.

Aos professores da disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto, Prof. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuari, Prof. Dr. Adilson Tomasin, Prof. Dr. Marcelo Antônio Mestriner**, pela sua colaboração e disposição durante o desenvolvimento do meu Projeto.

Aos funcionários do Departamento da Clínica Infantil, **Dr. Francisco Wanderlei Garcia de Paula e Silva, Dra. Carolina Torres Mantovani, Dra. Marília Pacífico Lucisano, Nilza Leticia Magalhães, Marco Antonio do Santos, Fatima Aparecida Jacinto Daniel, Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanela, Ditinha Rodrigues, Rosemary Alves**, pelo carinho e disposição. Muito Obrigada!

À secretária da pós-graduação **Micheli Cristina Leite Rovanholo**, pelo seu carinho e amizade, pelos abraços fortes e sua ajuda incondicional. Sempre disposta a nos ajudar em qualquer situação. Muito Obrigada!

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, **Isabel Cristina Galino Solá, Regiane Cristina Moi Sacilotto, Renata Aparecida Fernandes, Vera Scandelai, José Aparecido Neves do Nascimento, Karina Dadalt, Fernando, José Carlos, Júlio Cesar**, por todo o carinho e atenção e sobre tudo pelo apoio durante as minhas atividades nas Clínicas da Faculdade.

Aos funcionários e pós-graduandos do Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Luiz Augusto da Costa Júnior, Sueli Aparecida Neves, Danilo, Paulo, Giovanna, Ana Paula, Leonardo, Andrés, William, João, Verônica, Ana Clara**, por me fazer sentir parte do laboratório, por sua disposição e carinho, durante o desenvolvimento do meu projeto.

Aos pós-graduandos em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial: **Lidia Regina da Costa Hidalgo, Késsia Suênia Fidélis de Mesquita, Danielly Cunha Araújo, Driely Barreiros, Fernanda Regina Ribeiro, Ana Carolina Fumes, Daniela Silva Barroso de Oliveira, Denise de Souza Matos, Karharina Morant Holanda de Oliveira, Priscilla Coutinho Romualdo**, pela experiência compartilhada e parceria nos estudos.

Às minhas colegas da turma do Mestrado, **Juliana Arid, Mariana de Oliveira Daltoé, Francine Lorencetti da Silva, Marina Moscardini Vilela, Carolina Maschietto Pucinelli, Paula Regina Ávila Silvano, Sofia Sampaio Meireles de Souza, Sara Silva de Oliveira, Claudia Maria Carpio Bonilla**, pela maravilhosa companhia, pelo intercambio cultural e troca de experiências.

À meus pais, **Jaudeli** e **Oscar**, por serem minha fortaleza, por todo o apoio e respaldo durante todo meu tempo no Brasil. Por não medir esforços, para eu conseguir meus objetivos. Obrigada por todo o que fazem por mim.

À meus irmãos, **Patricio Javier, Oscar Daniel** e **Cindy**, por que mesmo não estando sempre presente, sinto seu carinho e sei que estão comigo no meu caminhar.

À minha avó, **Mamita Rosi**, eu quero te agradecer pelas tuas orações, por teu amor incondicional, ainda que ficasse longe por muito tempo, você esteve sempre comigo, te ver feliz com minhas conquistas me inspira para continuar. Espero que meu Deus me permita mais tempo do teu lado, para te dar mais alegrias e todos os beijos e abraços que não consegue te dar. Te amo vovó.

À toda minha linda família, **Carmi, Adeli, Mony, Ligui, Roberth, Raul, Esipion, Ferchis, Alejo, Luis, Danny, Gabu, Jotita, Liss** por sempre torcer por mim, por suas palavras positivas, suas alegrias e carinho incondicional. Vocês família, meu porto seguro onde sempre quero voltar.

À minha Tia **Linda** e meu Tio **Hugo**, porque desde o começo da minha formação como Dentista, vocês cuidaram de mim, como se fossem meus pais. Tia Linda, Muito Obrigada por tua confiança, por acreditar nos meus sonhos e me ajudar incondicionalmente. Que Deus te abençoe sempre por esse coração e generosidade que você tem.

Aos meus tios, **Rocio, Porfirio, Clemencia, Juanito, Lili**, a meus primos, **Monica, Verito, Alex, Claudio, Carlitos Alberto, Manuel Alejandro, David, Belen, Juanquita, Paito, Henry, Dany, Alejandrita, Josue**. Sem Deus não há vida, sem família não há base.

À minha mãe Brasileira **Evinha**, por aparecer na minha vida, como um milagre de Deus, por suas palavras de alívio nos momentos de angústia. Obrigada por tudo o que você tem feito por mim durante todo este tempo, me acolheu como uma filha, me deu seu carinho e com sua generosidade fez que nunca me faltasse nada. Que Deus sempre cuide de você e dê em dobro todo o que você fez pela gente. Lembre-se que sempre será minha mãe e que no Equador sempre existirá um lugar para você.

À minha família Brasileira, **Soninha, Dudu, Beatriz, Balu, Bruce, Eduardinho**, que me receberam como um membro da família, pelos lindos momentos compartilhados. Dudu, meu paizinho, obrigada pelas palavras de Força, pelos abraços apertados e pelo carinho recebido.

Às minhas queridas amigas: **Clau, Sofy, Sara, Lidia**, por fazerem toda a diferença durante meu tempo no mestrado, por serem o motivo dos meus sorrisos, por serem minha fortaleza nos momentos difíceis, vocês são parte do melhor que tenho aqui no Brasil. Obrigada sempre por seus carinhos, parceria e amizade sincera.

A minha família de estrangeiros e amigos: **Clau, Diana, Tia Lú, Ceci, Vanessa, Karencita, Carlita Alandia, Karlita Carpio, Federico, Fabian, Diego, Jenny, Davi, Erick, Elius, Jorgue, Brayan, Andres, Vivi, Rodrigo Flores, Rodrigo Restrepo, Mario, Harry, Marco, Marquinhos** obrigada por fazerem parte do meu tempo no Brasil, por me trazerem as melhores lembranças, por todo esse intercâmbio cultural e pelos laços de amizade eternos. Amigos são a família que escolhemos e agradeço a Deus por ter conhecido cada um de vocês, aprendi muitas coisas e sei que nossa amizade perdurará e vencerá distâncias.

À **Clau (Pulguita)**, por me presentear com tua presença, não sei o que seria sem você, você marcou mesmo, nunca vou esquecer todos os momentos que compartilhamos, tudo que aprendemos juntas, pelas alegrias, pelas viagens, pelas noites de café, pelas comidas guatemaltecas, por sempre me escutar, cuidar, por ser tão especial, você fica com uma parte do meu coração. Brasil foi o motivo para a gente se conhecer e conviver e sei que Deus tem muitas coisas mais para compartilharmos, as palavras já ficam curtas quando quero falar do meu carinho por você. Amo você minha irmã.

"Enfócate en tu sueño, haz lo que sea necesario para continuar en la persecución, Tú tienes el poder de cambiar tus circunstancias, persigue aquello que más desees. Mi vida es una aventura que todavía se está escribiendo y lo mismo sucede con la tuya. Comienza a escribir el primer capítulo ¡Ahora! Llévalo de aventura, amor y felicidad. Vive la historia que escribas"

Nick Vujicic.

Resumo

Flores-Bracho, MG. **Efeitos Citotóxicos e Genotóxicos em Pacientes Com Aparelho Ortodôntico Corretivo Avaliados por Frequência de Micronúcleos.** [dissertação].
Ribeirão Preto: FORP-USP, 2015.

Resumo

A corrosão dos aparelhos ortodônticos pode induzir uma resposta inflamatória e causar alterações nos tecidos bucais de pacientes em tratamento. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos citogenéticos causados em células epiteliais bucais de pacientes submetidos a tratamento ortodôntico corretivo e compará-los a um grupo controle sem tratamento. Setenta e quatro (74) pacientes em tratamento ortodôntico corretivo e vinte e um (21) pacientes controle com idades entre 11 e 35 anos participaram da pesquisa, de ambos os gêneros e que estavam em atendimento na clínica de pós-graduação em Ortodontia da Faculdade de Odontologia, Ribeirão Preto-USP. Os pacientes em tratamento foram divididos em quatro grupos que se diferenciaram pelo tempo de tratamento G1, n= 21 (1 mês a 12 meses de tratamento), G2, n= 21 (13 a 24 meses), G3, n= 23 (25 a 48 meses de tratamento) e G4, n=9 (acima de 48 meses de tratamento). As células foram coletadas por raspagem leve da parte interna da bochecha, com escova de dente e posteriormente colocadas em tubos de polietileno contendo soro fisiológico. Imediatamente após a obtenção da amostra foi realizada a avaliação dos danos citogenéticos por meio do teste de micronúcleos (MNT). Análises bivariadas foram realizadas nos dados obtidos utilizando testes paramétricos (Teste t, ANOVA) e testes não paramétricos quando necessário (teste do qui-quadrado ou exato e teste Kruskal Wallis seguido do teste de pós-teste de Dunn). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para nenhuma das anomalias citogenéticas, exceto para a “cariolíticas” que foi maior no grupo controle. Concluiu-se que não foram encontrados danos estatisticamente significantes, sendo o tratamento ortodôntico seguro em pacientes saudáveis com capacidade de reparo normal.

Palavras-chave: Ortodontia corretiva, Genética, Citogenética, Teste para Micronúcleos.

Abstract

Flores-Bracho, MG. **Cytotoxic and Genotoxic Effects in Patients with Orthodontic Appliances Evaluated for Frequency of Micronuclei.** [dissertation]. Ribeirão Preto: FORP-USP, 2015.

Abstract

The corrosion of orthodontic appliances can induce an inflammatory response and cause changes in bucal tissues from patients undergoing treatment. Therefore, the aim of this study was to evaluate the cytogenetic damage in bucal epithelial cells of patients undergoing corrective orthodontic treatment and compare them to a control group without orthodontic treatment. Seventy-four (74) patients in orthodontic treatment and twenty-one (21) control individuals aged between 11 and 35 years participated in the research, of both genders and who were attending at the clinic graduate in Orthodontics at Faculty of Dentistry, Ribeirão Preto-USP. The patients were divided into four treatment groups by treatment time; G1, n= 21 (1 month to 12 months of treatment), G2, n = 21 (13 to 24 months), G3, n = 23 (25 to 48 months of treatment) and G4, n = 9 (over 48 months of treatment). The cells were collected by gentle scraping with a toothbrush of the inside of the cheek and later placed in polyethylene tubes containing Physiological saline. Immediately after, the samples were evaluated for cytogenetic damage through the micronucleus test (MNT). Bivariate analyzes were performed using parametric tests (t test, ANOVA) and nonparametric tests when necessary (chi-square test or Kruskal Wallis test accurate and followed by Dunn test post-test). Thus, there wasn't significant differences for any of the cytogenetic abnormalities except for karyolysis which was higher in the control group. It was concluded that statistically significant damage were not found, and orthodontic treatment is safe in healthy patients with repair capacity.

Keywords: Appliances Orthodontic, Genétic, Citogenetic, Test of micronucleus.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Ciclo de uma célula animal. Este ciclo é de 24 horas de duração. A duração do ciclo varia entre diferentes tipos de células eucarióticas (Snustad e Simmons, 2012).....	33
Figura 2-	Mitose em células sanguíneas (Snustad e Simmons, 2012).....	34
Figura 3-	Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de: [A] fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro, [B] formação de ponte citoplasmática e de micronúcleo a partir de fragmento cromossômico acêntrico (Fenech, 1992).....	35
Figura 4-	Secção transversal da mucosa bucal normal que ilustra os diferentes estratos epiteliais (Thomas et al., 2007).....	36
Figura 5-	Estrutura e diferenciação do epitélio bucal. (A) Fotomicrografia de um corte através da mucosa bucal saudável que mostra as várias camadas de células do epitélio bucal: (i) camada queratinizada na superfície, (ii) camada de células espinhosas (ou camada espinhosa), (iii) camada basal (ou estrato basal), (iv) <i>Pegs-rete</i> , (v) lâmina própria (tecido conjuntivo) (B) Esquema de camadas de células da mucosa bucal e turnover (Holland et al., 2008).....	37
Figura 6-	Diagrama ilustrando as relações mais realistas entre os vários tipos de células observadas e marcados no MNT (Thomas et al., 2007).....	38
Figura 7-	Imagens que mostram células basais com diferentes tipos de alterações nucleares marcados no ensaio de micronúcleos.....	39
Figura 8-	A. Paciente realizando bochechos com soro fisiológico 0,9%. B. Solução de Cloreto de Sódio 0,9% (Arboreto, Poço Rico, Juiz de Fora, MG, Brasil).....	47
Figura 9-	Escova de dente utilizada para realizar a coleta das amostras.....	48
Figura 10-	Raspagem das bochechas com escova de dente. A. Lado Esquerdo, B. Lado Direito.....	48
Figura 11-	A. Tubos de polietileno de 15ml tipo FALCON. B. Tubos de polietileno contendo 5ml de soro fisiológico contendo a escova de dente com amostra do paciente.....	49
Figura 12-	Caixa de isopor com gelo contendo amostras de pacientes.....	49
Figura 13-	Amostras colocadas na centrifuga.....	50
Figura 14-	Pipeta usada para retirar o sobrenadante.....	50
Figura 15-	A. Amostra após ser centrifugada. B. Sobrenadante que foi eliminado com ajuda da pipeta.....	51

Figura 16-	Soluções fixadoras; A. Acido Acético Glacial (J.T. Backer, Xalostoc, México); B. Metanol (J.T. Backer, Xalostoc, México); C. Dimetil Sulfóxido P.A.- A.CS (Synth, LABSYNTH, Diadema, SP, Brasil).....	51
Figura 17-	Suspensão resultante gotejada na lâmina.....	52
Figura 18-	Lâminas para secar em porta lâminas por 24 horas à temperatura ambiente.....	52
Figura 19-	A. Ácido Clorídrico. B. Cuba de vidro. C. Cronômetro marcando 20 minutos.....	53
Figura 20-	A. Reativo de Schiff. B. Cuba de vidro coberta com papel alumínio. C. cronômetro marcando 90 minutos.....	53
Figura 21-	A. Cuba contendo água destilada para lavar as lâminas por 10 minutos. B. cronômetro marcando 10 minutos.....	54
Figura 22-	Lâminas colocadas em porta lâminas e deixadas para secar à temperatura ambiente.....	54
Figura 23-	A. Fast Green à 3%. B. Cuba contendo Fast Green à 3%. C. Cuba contendo Metanol à 100%. D. Metanol.....	55
Figura 24-	Lâminas após serem contra coradas e secas à temperatura ambiente.....	55
Figura 25-	A. Microscópio óptico. B. Contador eletrônico de células sanguíneas CCS-01 (Kacil, Ltda, São Paulo, SP, Brasil) utilizado para avaliar a frequência de micronúcleos.....	56
Figura 26-	Células basais (setas).....	57
Figura 27-	Células com um micronúcleo (setas).....	57
Figura 28-	Células com dois micronúcleos (setas).....	58
Figura 29-	Células binucleadas (setas).....	58
Figura 30-	Células tetranucleadas (setas)	59
Figura 31-	Células com brotos nucleares (setas).....	59
Figura 32-	Células com pontes nucleares (setas).....	59
Figura 33-	Células picnóticas (setas)	60
Figura 34-	Células cariolíticas (setas).....	60
Figura 35-	Fluxograma dos procedimentos metodológicos.....	61
Figura 36-	Gráfico da distribuição de sexo entre os grupos.....	64
Figura 37-	Gráfico da distribuição entre idade e sexo (1=Masculino; 2= Femenino).....	64
Figura 38-	Gráfico de distribuição de idade entre sexo masculino e feminino.....	65

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Análise descritiva dos grupos de indivíduos (n=95).....	63
Tabela 2-	Distribuição da idade entre sexo e grupos.....	65
Tabela 3-	Análise descritiva das alterações citogenéticas.....	66
Tabela 4-	Análise descritiva da presença de células com alterações citogenéticas.....	67
Tabela 5-	Análise bivariada de anomalias citogenéticas de acordo com o sexo.....	67
Tabela 6-	Distribuição de células com anomalias citogenéticas para sexo masculino (n= 34) e sexo feminino (n= 61).....	67
Tabela 7-	Correlação de Spearman entre as alterações citogenéticas.....	68

Sumário

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. COMPOSIÇÃO DOS BRÁQUETES E CORROSÃO DOS APARELHOS ORTODÔNTICOS.....	30
1.2. BIOMARCADORES PARA AVALIAR DANOS CITOTÓXICOS CAUSADOS PELOS APARELHOS ORTODÔNTICOS.....	32
1.2.1. TESTE DE MICRONÚCLEOS EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL.....	35
1.3. ESTUDOS REALIZADOS.....	40
2. PROPOSIÇÃO.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1. SELEÇÃO DE PACIENTES.....	46
3.2. TÉCNICA DE COLETA DE CÉLULAS EPITELIAIS PARA MNT.....	47
3.3. ANÁLISES DAS LAMINAS.....	55
4. RESULTADOS.....	62
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS.....	80
ANEXOS.....	86
1. APROVAÇÃO DO COMITÊ EM PESQUISA PARA SERES HUMANOS.....	87
2. IDENTIFICAÇÃO DOS MATERIAIS DE AÇO INOXIDÁVEL UTILIZADOS NOS PACIENTES.....	89

Introdução

---

1. INTRODUÇÃO

1.1. COMPOSIÇÃO DOS BRÁQUETES E CORROSÃO DOS APARELHOS ORTODÔNTICOS

Cirurgiões-Dentistas e Ortodontistas têm a sua disposição diferentes materiais que oferecem múltiplas opções de tratamento. Os dispositivos ortodônticos como bráquetes, bandas e arcos, são constituídos por diferentes ligas metálicas. As mais usadas na Ortodontia são ligas de aço inoxidável, cromo-cobalto, níquel-titânio e beta-titânio, apresentando o níquel como um dos seus principais componentes. As ligas de aço inoxidável oferecem alta resistência à corrosão por sua elevada concentração de cromo (15 a 22 %), níquel (6 a 12%) e ferro (73%) (Wataha 2000; Eliades et al., 2004; Oh e Kim, 2005; House et al., 2008; Ortiz et al., 2011). Porém, fatores relacionados à fabricação da liga, microestrutura, condições bucais (microrganismos, pH da saliva menor que 4), dieta rica em cloreto de sódio, bebidas com gases ácidos e tempo de permanência dos metais na boca, são características que frequentemente aumentam a liberação de íons, incrementando os efeitos corrosivos da liga (Eliades et al., 2004; Setcos et al., 2006; Kao et al., 2007; House et al., 2008; Fernandez-Minano et al., 2011; Ristic et al., 2014).

A corrosão dos metais na cavidade bucal pode gerar efeitos adversos para a saúde do indivíduo, porém vai depender da quantidade do material liberado e da duração de exposição no tecido para que eles provoquem resposta biológica no organismo (Bass et al., 1993; Janson et al., 1998; Wataha 2000; Hwang et al., 2001; Westphalen et al., 2008; Ortiz et al., 2011). Assim, podem causar alterações nos tecidos bucais como: descamação labial, eritema multiforme, queilite angular, gengivite, periodontite e hiperplasia gengival. Estudos recentes confirmam a maior chance de indivíduos apresentarem reações alérgicas aos materiais ortodônticos. Uma estimativa da população geral sensível ao níquel gira em torno de 20 a 30 %, ao cobalto 8% e ao cromo também 8% (Lindsten e Kurol, 1997; Wataha 2000; Genelhu et al., 2005; Zalacain et al., 2005; Levrini et al., 2006; Kao et al., 2007; Amini et al., 2008; Bloching et al., 2008).

O níquel é um metal sólido, branco-prateado, maleável, resistente à corrosão, mesmo em altas temperaturas, além de ser o elemento constituinte de bráquetes, bandas e fios ortodônticos, sendo considerado como potente sensibilizador e alergênico (Genelhu et al., 2005; Setcos et al., 2006). A hipersensibilidade ao níquel ocorre com mais frequência em idades mais jovens entre 10 a 20 anos e com maior incidência em mulheres (11%) em comparação aos homens (6%). Esta maior incidência nas mulheres acontece por estarem em maior contato com detergentes, jóias, brincos e outros objetos metálicos (Nielsen e Klaschka, 1971; Magnusson et al., 1982; Van Hoogstraten et al., 1991; Bass et al., 1993; Janson et al., 1998; Hwang et al., 2001; Genelhu et al., 2005; Petoumeno et al., 2008).

Na literatura existem vários trabalhos que avaliam a hipersensibilidade aos aparelhos ortodônticos. De acordo com Faccioni et al. (2003) a sensibilidade ao níquel é baixa em sujeitos que receberam tratamento ortodôntico, desenvolvendo tolerância imunológica devido ao longo tratamento. Porém, não descartam a possibilidade que concentrações não tóxicas podem ser suficientes para produzir mudanças biológicas na mucosa bucal. Genelhu et al. (2005) relataram que alergia prévia ao níquel foram relacionadas com pacientes que apresentaram maior sensibilidade ao usar os aparelhos ortodônticos, independente do momento em que o indivíduo foi exposto ao aparelho, além de se apresentar mais em pessoas jovens. No estudo de Fernandez-Miñano et al. (2011) foi observado que o níquel pode ingressar no metabolismo mitocondrial, reduzindo as funções celulares, inibindo os processos enzimáticos envolvidos na síntese de proteínas, diminuindo a replicação celular e atuando como mediador imunológico provocando reações de hipersensibilidade.

Outras evidências relatam que tratamentos ortodônticos não estão associados a um incremento da hipersensibilidade ao níquel, sendo bem tolerado inclusive em indivíduos sensíveis, pois a quantidade de metais liberada pelos aparelhos ortodônticos (4,2ug por dia e 22ug por dia em situações de estresse) é mínima em comparação com as quantidades liberadas pelos alimentos diariamente (Kerosuo et al., 1995; Lindsten e Kurol, 1997; Janson et al., 1998; Hwang et al., 2001; House et al., 2008; Petoumeno et al., 2008). O cromo também está relacionado a reações de hipersensibilidade, sendo a segunda causa mais

frequente de dermatites de contato. Apresenta uma prevalência de 10% em homens e 3% em mulheres (Norseth, 1981; Park e Shearer, 1983). No entanto, ainda existem controvérsias sobre o grau de hipersensibilidade causado por esses metais nos tecidos bucais, quando eles estão em contato com a mucosa por longos períodos de tempo (Albertini et al., 2000).

1.2. BIOMARCADORES PARA AVALIAR DANOS CITOTÓXICOS CAUSADOS PELOS APARELHOS ORTODÔNTICOS.

Os efeitos causados pelos aparelhos ortodônticos numa população exposta podem ser avaliados por biomarcadores bem estabelecidos, como o Teste de Micronúcleos (MNT) e ensaio cometa (CA). Em 1999, o MNT foi validado mundialmente e considerado como um biomarcador efetivo de dano no DNA ou de risco de câncer em humanos, podendo ser aplicado tanto em estudos *in vivo* ou *in vitro*, em linfócitos ou em células epiteliais (Kirsch-Volders et al., 1997; Miller et al., 1998; Martino-Roth et al., 2003; Zalacain et al., 2005; Fenech, 2007; Bloching et al., 2008; Westphalen et al., 2008; Thomas et al., 2009; Toy et al., 2014).

O MNT é um marcador efetivo que mostra o dano produzido por agentes clastogênicos (quebras nos cromossomos) ou aneugênicos (danos no fuso mitótico), sendo uma medida quantitativa das lesões cromossômicas, as quais podem ser correlacionadas à incidência de doenças crônicas em populações expostas (Tolbert et al., 1992; Kirsch-Volders et al., 1997; Miller et al., 1998; Albertini et al., 2000; Zalacain et al., 2005; Thomas et al., 2007). Além de apresentar grandes vantagens sobre outras técnicas, por não ser invasiva e apresentar baixo custo (Titenko-Holland et al., 1994). Portanto, o MNT é efetivo já que permite avaliar danos genotóxicos, citotóxicos e citostáticos dentro de um mesmo ensaio (Fenech 2007; Kashyap e Reddy, 2012).

Como conceito básico o ciclo celular representa o crescimento e a divisão da célula, de forma contínua e repetitiva. Formada por duas fases a interfase e a fase mitótica.

A **INTERFASE** é o período entre o fim da divisão celular e o início da seguinte. Apresentando as fases G₁, S e G₂, fases onde a célula cresce, sintetiza proteínas, enzimas, RNA, replica as moléculas do DNA e duplica os cromossomos (Figura 1). Por outro lado, na **FASE MITÓTICA**, existe a divisão do núcleo (cariocinese) e divisão do citoplasma (citocinese). Dentro da cariocinese existe; a *Prófase*, onde as cromatinas se tornam mais curtas e grossas e os dois pares de centríolos começam a se afastar criando o fuso mitótico; na *Metáfase*, os pares de centríolos estão nos polos, o fuso acromático completa o seu desenvolvimento, os cromossomos e os centrômeros estão no plano equatorial, formando a placa equatorial; na *Anáfase*, ocorre a clivagem dos centrômeros, separando-se em cromátide que constituem assim dois cromossomos independentes; na *Telófase*, a membrana nuclear se organiza de novo à volta dos cromossomos de cada polo, os nucléolos reaparecem, o fuso mitótico é dissolvido, os cromossomos se descondensam, e a célula fica constituída por dois núcleos. Após a cariocinese, se dá a citocinese que é, resumidamente, a divisão do citoplasma e, logo, à individualização das duas células-filhas (Figura 2, página 35) (Snustad e Simmons, 2012).

Figura 1. Ciclo de uma célula animal. Este ciclo é de 24 horas de duração. A duração do ciclo varia entre diferentes tipos de células eucarióticas. (Snustad e Simmons, 2012).

Figura 2. Mitose em células sanguíneas (Snustad e Simmons, 2012).

Dentro desse processo de ciclo celular podem ser gerados os micronúcleos (MNs), os quais são corpos citoplasmáticos de origem nuclear correspondente ao material genético não corretamente incorporado durante a divisão celular, mostrando erros durante a replicação cromossômica e posterior divisão do DNA. Os fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos inteiros que não são incluídos nos núcleos das células em divisão ficam perdidos no citoplasma, originando os micronúcleos detectados em células interfásicas, como pequenos corpos, arredondados de cromatina, separados do núcleo principal (Figura 3, página 35) (Tolbert et al. 1992; Zalacain et al. 2005; Fenech, 2007).

Figura 3. Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de: [a] fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro, [b] formação de ponte citoplasmática e de micronúcleo a partir de fragmento cromossômico acêntrico (Fenech, 1992)

1.2.1. TESTE DE MICRÔNÚCLEOS EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA BUCAL

O MNT foi adaptado para células epiteliais da mucosa bucal por Stich & Rosin em 1982 e foi aplicado em estudos relacionados a hábitos de vida (consumo de tabaco, álcool, drogas, estresse, deficiência de micronutrientes, etc), exposição a ambientes poluentes (pesticidas, arsênico, formaldeído) e processos médicos (quimioterapia e radioterapia). São utilizados para avaliar defeitos genéticos como aberrações cromossômicas ou problemas de reparo do DNA que ocorreram nas últimas duas a três semanas (Nersesyan et al., 2006; Saran et al., 2008).

A mucosa bucal é um epitélio escamoso estratificado que está formado por quatro camadas distintas que contém diversas células em divisão ativa para manter sua integridade (Figura 4, página 36). Esse mecanismo de homeostase, por meio da diferenciação celular e eliminação das células da superfície epitelial (*turnover*) serve como mecanismo de proteção contra microrganismos ou agentes tóxicos, que podem alterar este equilíbrio (Thomas et al., 2007; Squier e Kremer, 2001; Natarajan et al., 2011; Heravi et al., 2013).

Figura 4. Secção transversal da mucosa bucal normal que ilustra os diferentes estratos epiteliais (Thomas et al., 2007).

Os MNs em células esfoliadas são formados durante a mitose da camada basal do epitélio, que durante os processos de proliferação e divisão celular, as células filhas, podem ou não conter micronúcleos, se diferenciar, atravessar a camada espinhosa e granular até chegar na camada superficial queratinizada para ser esfoliadas dentro da cavidade bucal. Algumas dessas células podem se degenerar em células com cromatina condensada, núcleos fragmentados (cariorréxes), núcleos picnóticos, ou perder completamente o seu material nuclear (cariolíticas). Em casos raros, algumas células podem ser bloqueadas em um estágio e formar células binucleadas ou pode apresentar brotos nucleares (*nuclear buds*) e pontes nucleares (*broken eggs*) (Figura 5, página 37) (Tolbert et al., 1992; Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009).

Figura 5. Estrutura e diferenciação do epitélio bucal. **(A)** Fotomicrografia de um corte através da mucosa bucal saudável que mostra as várias camadas de células do epitélio bucal. (i) camada b queratinizada na superfície, (ii) camada de células espinhosas (ou camada espinhosa), (iii) camada basal (ou estrato basal), (iv) *Pegs rete*, (v) lâmina própria (tecido conjuntivo) **(B)** Esquema de camadas de células da mucosa bucal e turnover (Holland et al., 2008).

Entre as vantagens do MNT estão o fácil armazenamento, antes e depois do processamento, em solução fixadora ou em lâminas fixadas à temperatura ambiente (Sarto et al., 1987; Tolbert et al., 1992; Titenko-Holland et al., 1994; Ramirez e Saldanha, 2002; Nersesyan et al., 2006; Bonassi et al., 2011). Também podem ser usados em diferentes tipos celulares como células bucais e sanguíneas mostrando bons resultados. Existe forte correlação entre a frequência de MN em células bucais com a frequência de MN em linfócitos, mostrando que os efeitos genotóxicos sistêmicos dentro do fluxo de sangue também podem ser detectáveis em células bucais, permitindo associação de MN com o risco de câncer (Zalacain et al., 2005; Bonassi et al., 2007; Holland et al., 2008; Angelieri et al., 2011; Fenech et al., 2011).

Portanto, dentro dos tipos celulares que podem ser avaliados no MNT se encontram células normais como (basais e diferenciadas), células com defeitos durante a divisão ou citocineses (binucleadas, brotos nucleares e pontes nucleares), células com quebras ou perdas cromossômicas (micronúcleos), células com morte celular ou apoptoses (picnóticas, cariorréxes, kariolíticas, cromatina condensada) (Figura 6, Figura 7, página 39) (Tolbert et al., 1992; Fenech et al., 2007; Holland et al., 2008; Thomas et al., 2009; Bonassi et al., 2011; Gonçalves et al., 2014).

Figura 6. Diagrama ilustrando as relações mais realistas entre os vários tipos de células observadas e marcadas no MNT (Thomas et al., 2007)

Figura 7. Imagens que mostram células basais com diferentes tipos de alterações nucleares marcadas no ensaio de micronúcleos (Thomas et al., 2007).

A frequência de MN em células bucais pode ser usada como um "dosímetro endógeno" de tecidos que são alvos específicos de agentes genotóxicos e carcinogênicos, sendo influenciadas pela idade, gênero, estilos de vida, doenças sistêmicas e dieta (Migliore et al., 1991; Xue et al., 1992; Fenech 1993; Landi et al., 2000; Bukvic et al., 2001; Martino-Roth et al., 2003; Lee et al., 2004; Bonassi et al., 2007; Thomas et al., 2009). Assim, um aumento da frequência de micronúcleos nos tecidos avaliados é um biomarcador desses efeitos genotóxicos que reflete a exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos, refletindo instabilidade genômica (Albertini et al., 2000). Vários estudos foram realizados para determinar a frequência normal de micronúcleos numa população saudável, para servir como parâmetro de comparação com populações expostas. Tais valores variam de 1,9 a 4 micronúcleos por 1000 células com um desvio padrão de 0.99 ou com média de 0,32–1,70%

na população geral. Estes valores aumentam com a idade em ambos os sexos, sendo maior no sexo feminino. Com relação ao estilo de vida a frequência de MN é maior em fumantes e pessoas com doenças sistêmicas como diabetes e câncer (Konopacka 2003; Holland et al., 2008; Bloching et al., 2008; Bonassi et al., 2011; Fenech et al., 2011; Katarkar et al., 2014).

1.3. ESTUDOS REALIZADOS

Estudos genotóxicos *in vitro* e *in vivo* avaliando os efeitos do uso de aparelhos ortodônticos foram realizados por meio de ensaio cometa (CA) e MNT. Amini et al. (2008), realizaram estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar os efeitos da indução de estresse na saliva que contém íons metálicos liberados pelos aparelhos ortodônticos, usando amostra 30 pacientes. As coletas da saliva foram realizadas em 4 tempos diferentes; antes da instalação do aparelho, três meses depois da instalação do aparelho, 15 minutos após a indução de estresse na saliva por *Trier Social Stress Test* e 30 minutos após a indução. Logo após, as concentrações dos íons metálicos foram mesuradas por espectrometria de absorção. Como resultados, os autores encontraram um aumento das concentrações de níquel na saliva apresentando diferenças estatísticas quando comparadas com o tempo 1. As concentrações de crômio não mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao tempo 1. Os autores concluíram que a indução de estresse na saliva permitiu um incremento da liberação de níquel dos aparelhos ortodônticos, mostrando que estas condições podem alterar o ambiente bucal por meio da redução do pH.

Gonçalves et al. (2014) realizaram estudo para avaliar os efeitos citotóxicos e genotóxicos das bandas ortodônticas de aço inoxidável com tubos soldados e não soldados em células da mucosa bucal, usando como meio de avaliação a espectrometria, o MNT e o CA. Como resultados encontraram que as bandas soldadas apresentaram maior citotoxicidade do que as bandas não soldadas, apresentando maior liberação de ferro, níquel, cobre, crômio, zinco e prata provocando alterações no metabolismo celular. O estudo também confirmou que os dois tipos de bandas induziram dano do DNA quando avaliados pelo CA. Observou-se também níveis altos de brotos nucleares nas células dos pacientes

que tinham bandas soldadas, os quais estão relacionados com problemas de reparo do DNA. Portanto, concluíram que as bandas soldadas por suas altas concentrações de cádmio estão relacionadas com maiores efeitos citotóxicos e citogenéticos quando são colocadas nos pacientes durante o tratamento ortodôntico.

Com relação a estudos em pacientes com aparelho ortodôntico corretivo, Faccioni et al. (2003) realizaram estudo visando determinar a liberação de metais por meio de espectrometria e avaliar sua citotoxicidade ou efeitos genotóxicos pelo CA, usando amostra de 55 pacientes e 30 controles. Os autores encontraram diferenças de viabilidade celular nos dois grupos, além que as concentrações de íons liberados de níquel e cobalto mostraram diferenças quando comparadas ao grupo controle nos primeiros 4 a 5 meses do tratamento ortodôntico. Porém, essa liberação foi significativamente inferior ao consumo alimentar diário, sem atingir concentrações tóxicas. Nos testes de citotoxicidade por ensaio cometa observaram que os dois metais (níquel e cromo) induziram danos no DNA. Concluíram que o potencial toxicológico do níquel e do cobalto pode produzir quebras no DNA em células da mucosa bucal, porém as células normais presentes na mucosa podem reparar os tecidos. A perda da capacidade desse reparo por tempos de exposição prolongada poderia dar início a efeitos biológicos adversos.

Westphalen et al. (2008), realizaram estudo para avaliar os efeitos genotóxicos causados pelo uso dos aparelhos ortodônticos usando MNT e CA. Amostra foi composta de 20 pacientes em tratamento ortodôntico. As coletas foram realizadas antes da instalação dos aparelhos (grupo controle) e 30 dias após a instalação para o MNT. Com relação ao CA foi realizada a coleta antes da instalação e depois de 10 dias de tratamento. Detectaram baixos níveis de dano no DNA pelo CA, sem alcançar níveis significantes, porém os resultados com teste de micronúcleos mostraram aumento da frequência de micronúcleos após 30 dias de tratamento.

Hafez et al. (2011) avaliaram os efeitos citotóxicos, genotóxicos e a liberação de metais em 46 pacientes com e sem aparelhos ortodônticos, cujas coletas foram realizadas antes, aos três e 6 meses de tratamento. Encontraram aumento nas concentrações de

níquel e de cromo. Com relação ao dano no DNA, observaram diferenças significativas aos três meses, porém essas diferenças não foram evidentes aos 6 meses de tratamento. Concluíram que esses resultados podem estar relacionados com a capacidade individual de reparo e de adaptabilidade dos indivíduos durante o tratamento ortodôntico.

Natarajan et al. (2011) usando 40 pacientes e realizando coletas até 30 dias após da instalação do aparelho ortodôntico, encontraram aumento da frequência de micronúcleos em pacientes experimentais quando comparados ao grupo controle. Essas diferenças foram pequenas e não significantes quando avaliados após 30 dias de tratamento. Com relação às concentrações de metais na saliva não observaram diferenças significativas entre os grupos, não estabelecendo, assim correlação entre a frequência de micronúcleos e conteúdo de íons metálicos na saliva. Concluíram que as concentrações de íons liberados pelos aparelhos ortodônticos podem induzir efeitos genotóxicos locais, porém esses efeitos são revertidos com a remoção do aparelho.

Em um estudo realizado por Angelieri et al. (2011), com o objetivo de biomonitorar os efeitos mutagênicos e citotóxicos em pacientes com aparelhos ortodônticos, avaliando a presença de micronúcleos e células mortas como picnóticas, cariolíticas e cariorréxes em células epiteliais da mucosa bucal, utilizaram amostra de 23 pacientes em tratamento. Diferenças significativas não foram encontradas, concluindo que o tratamento ortodôntico não provoca danos no DNA, nem promove citotoxicidade.

Estudos recentes concluíram que os aparelhos ortodônticos não incrementam o risco de dano no DNA nas células da mucosa bucal, por sua capacidade de renovação e regeneração em um tempo curto de 7 a 14 dias, sem que os efeitos deletérios permaneçam ao final do estudo (Heravi et al., 2013; Toy et al., 2014). Porém, todos esses estudos foram realizados num tempo de avaliação menor que nove meses de tratamento, existindo a necessidade de realizar estudos que avaliem pacientes com tempos prolongados de tratamento. Isto se faz necessário para dirimir controvérsias sobre o grau de hipersensibilidade causado pelos aparelhos ortodônticos, ao longo do tratamento.

Proposição

---

2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho propõe-se analisar os danos citotóxicos e citogenéticos em células epiteliais da mucosa bucal de pacientes com diferentes tempos de tratamento ortodôntico corretivo, por meio do MNT.

A hipótese a ser confirmada ou rejeitada é que o tratamento ortodôntico corretivo pode causar efeitos citotóxicos e genotóxicos nos pacientes.

Material e Métodos

---

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FORP-USP (CAAE 35905914.1.0000.5419, Anexo 1). A participação dos pacientes no estudo ocorreu forma voluntária e com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ou do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), onde foram esclarecidos os objetivos, os benefícios e os riscos inerentes ao estudo.

3.1. SELEÇÃO DE PACIENTES

Foram selecionados (74) pacientes do gênero masculino e feminino, entre 11 e 35 anos de idade em tratamento ortodôntico corretivo (grupos experimentais) nas clínicas de pós-graduação em Ortodontia da FORP/ USP e (21) pacientes como grupo controle sem tratamento ortodôntico, alunos do curso de graduação em Odontologia da mesma instituição e do curso de Fonoaudiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Como critérios de inclusão, foram selecionados pacientes com dentição permanente, sem restaurações de amálgamas, sem tratamentos ortodônticos anteriores e ainda que não tivessem hipersensibilidade a metais como níquel e o cromo. Foram excluídos pacientes com síndromes, doenças sistêmicas como diabetes, anemia ou doenças debilitantes como câncer, doenças relacionados a algum dano genético, fumantes, alcoólatras, dependentes de drogas, expostos à radiação ou produtos químicos, em tratamento com antibióticos ou algum tipo de esteróides, pacientes fazendo uso de enxaguatórios bucais com álcool e doenças bucais como cáries, periodontites e gengivites.

Os pacientes participantes da pesquisa nos grupos experimentais, foram subdivididos em 3 subgrupos que se diferenciaram pelo tempo de tratamento: G1 com 21 pacientes (1 mês à 12 meses de tratamento); G2 com 21 pacientes (13 à 24 meses de tratamento); G3 com 23 pacientes (25 à 48 meses de tratamento) e G4 com 9 pacientes (acima de 48 meses de tratamento). Todos os pacientes em tratamento apresentaram média de 20 bráquetes colados, 4 tubos e 4 bandas. Todos os bráquetes eram do sistema

Edgewise standard, slot 0.022"x 0.028" de aço inoxidável (Cromo 17,0-20,0%; Níquel 8,0–10,5%; Molibdeno máximo 0,60%) e receberam ou estavam com fios de aço inoxidável (0,016", 0,018", 0,020" ou 0,019" x 0,025") em ambos arcos com dobras e alças utilizadas de acordo com a necessidade do caso. Todos os materiais ortodônticos utilizados foram da marca Morelli (Sorocaba, SP, Brasil).

3.2. TÉCNICA DE COLETA DE CÉLULAS EPITELIAIS PARA MNT

Antes de iniciar o estudo, todos os pacientes foram orientados a continuar com escovação, mas sem uso de enxaguatórios que contenham fluór ou clorexidina (Hafez et al., 2011).

No início do experimento os pacientes foram instruídos para realizar bochechos com soro fisiológico (Solução de Cloreto de Sódio 0,9%) durante 2 minutos por duas vezes antes da coleta das células bucais, com a finalidade de remover células bucais esfoliadas (Figura 8).

Figura 8. A- Paciente realizando bochechos com soro fisiológico 0,9%; B- Solução de Cloreto de Sódio 0,9% (Arboreto, Poço Rico, Juiz de Fora, MG, Brasil)

As células foram coletadas por meio de raspagem da mucosa bucal de cima para baixo dos dois lados da bochecha com escova dental macia (Escova Dental Científica, FORP-USP) durante 30 segundos. Isto permitiu coletar amostra heterogênea de células de toda a mucosa bucal do epitélio escamoso estratificado (Figuras 9 e 10, página 48).

Figura 9. Escova de dente utilizada para realizar a coleta das amostras.

Figura 10. Raspagem das bochechas com escova de dente. **A-** Lado Esquerdo; **B-** Lado Direito.

O material coletado foi transferido para tubos de polietileno de 15 ml (Tubo de centrifugação) tipo FALCON, não pirogênico, livre de DNase, RNase e toxinas, LMP, KASUI, China), devidamente identificados e contendo 5ml de soro fisiológico 0,9% (Figura 11, página 49).

Figura 11. A - Tubos de polietileno de 15 ml tipo FALCON; B- Tubos de polietileno contendo 5 ml de soro fisiológico contendo a escova de dente com amostra do paciente.

Os tubos foram mantidos refrigerados em caixas de isopor com gelo, para em seguida serem transportados ao Laboratório de Mutagênese e Citogenética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Figura 12).

Figura 12. Caixa de isopor com gelo contendo amostras de pacientes

O MNT seguiu os protocolos descritos por (Tolbert et al., 1992; Thomas et al., 2009). Primeramente, os tubos contendo as amostras celulares em solução fisiológica foram centrifugados (Centrifuga 216, FANEM, São Paulo, SP, Brasil) a 1000 rpm por cinco minutos (Figura 13, página 50).

Figura 13. Amostras colocadas na centrífuga.

Em seguida parte do sobrenadante foi retirada e descartada com ajuda de uma pipeta (Pipeta Pasteur em vidro 23cm, ponta longa 3ml, Precision, Icral, Cotia, SP, Brasil), para diminuir endógenos, DNAases e remover bactérias, deixando aproximadamente duas vezes o volume do sedimento de células (Figura 14 e Figura 15, página 51).

Figura 14. Pipeta usada para retirar o sobrenadante.

Figura 15. A- Amostra após ser centrifugada; B- Sobrenadante que foi eliminado com ajuda da pipeta.

Posteriormente, foi acrescentada solução fixadora (metanol/ácido acético 3:1) até completar 5 ml e também 5 gotas de Dimetil sulfóxido (DMSO) para permitir que o citoplasma se espalhasse evitando que as células ficassem grudadas. A suspensão foi agitada e novamente centrifugada da mesma forma e pelo mesmo tempo descrito anteriormente. O sobrenadante foi então descartado e esta etapa foi repetida por duas vezes (Figura 16).

Figura 16. Soluções fixadoras; A- Acido Acético Glacial (J.T. Backer, Xalostoc, México); B- Metanol (J.T. Backer, Xalostoc, México); C- Dimetil Sulfóxido P.A.- A.C.S (Synth, LABSYNTH, Diadema, SP, Brasil).

A suspensão resultante foi gotejada (2 a 3 gotas) em lâminas limpas (Knittel Glass, Starfrost, Alemanha), a uma altura de 3-4 cm e deixadas para secar à temperatura ambiente por 24 horas (Figuras 17 e 18).

Figura 17. Suspensão resultante gotejada na lâmina.

Figura 18. Lâminas para secar em porta lâminas por 24 horas à temperatura ambiente.

Para a coloração das lâminas foi usado o método de *Feulgen/Fast Green*, onde as lâminas foram colocadas em cubas contendo ácido clorídrico (HCL 5N, Labsynth-Diadema, SP, Brasil) por 20 minutos cronometrados (Unilab, São Paulo, SP, Brasil) sendo posteriormente lavadas 3 vezes com água destilada (Figura 19, página 53).

Figura 19. A- Ácido Clorídrico; B- Cuba de vidro; C - Cronômetro marcando 20 minutos.

Em outra cuba envolta em papel alumínio foram colocadas as lâminas e posteriormente acrescentado o reativo de Schiff (1g de Fucsina básica, 200ml de H_2O destilada, 300ml de HCL 1N, 3g de matabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$), 0,5g de carvão descolorante) o qual ficou por 90 minutos (agitado de 30 em 30 minutos) (Figura 20).

Figura 20. A- Reativo de Schiff; B- Cuba de vidro coberta com papel alumínio; C- Cronômetro marcando 90 minutos.

Após esse tempo foi retirado o reativo de Schiff e foi colocada água destilada por 10 minutos (Figura 21).

Figura 21. A- Cuba contendo água destilada para lavar as lâminas por 10 minutos; B- cronômetro marcando 10 minutos.

Logo após, as lâminas foram retiradas e secas à temperatura ambiente (Figura 22).

Figura 22. Lâminas colocadas em porta lâminas e deixadas para secar à temperatura ambiente.

Posteriormente, as lâminas foram contra coradas com *Fast Green* 3% (Etanol 95%; *Fast Green* 0,25g FCF, Merck, Darmstadt, Alemanha), diluído em metanol 100% e secas à temperatura ambiente (Figuras 23 e 24, página 55).

Figura 23. A- Fast Green à 3%; B- Cuba contendo Fast Green à 3%; C- Cuba contendo Metanol à 100%. D. Metanol.

Figura 24. Lâminas após serem contra coradas e secas à temperatura ambiente.

3.3. ANÁLISE DAS LÂMINAS

As lâminas contendo as células foram analisadas em microscópio de luz (Microscópio óptico binocular, Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha) em 400x para contagem das células com micronúcleos e células metanucleadas e 1000x para verificação das mesmas. Para cada paciente foram confeccionadas duas lâminas, todas elas foram então codificadas e as análises citogenéticas foram realizadas em teste cego. Inicialmente foram avaliadas 1000 células para a caracterização dos tipos celulares (basal ou diferenciada) e das anormalidades nucleares (células binucleadas, cariolíticas, cariorréxes e núcleos com cromatina condensada). Nesta primeira análise foram contados MN e brotos em células diferenciadas. Em uma segunda etapa foram analisadas um total de 2000 células

diferenciadas para finalizar verificação da presença de micronúcleos e brotos nucleares (Figura 25) (Sarto et al., 1987; Fenech et al., 2007; Thomas et al., 2009).

Figura 25. A- Microscópio óptico; B- Contador eletrônico de células sanguíneas CCS-011 (Kacil, Ltda, São Paulo, SP, Brasil) utilizado para avaliar a frequência de micronúcleos.

Os critérios de inclusão para o contagem das células normais e com alterações nucleares seguiram as recomendações descritas por Tolbert et al. (1992) e Katarkar et al. (2014). Assim, para células basais (Figura 26, página 57), quando apresentavam citoplasma intacto e relativamente plano, pouca ou nenhuma sobreposição com células adjacentes, pouca ou nenhuma destruição da célula e núcleo com perímetro normal e intacto, liso e diferenciado.

Figura 26. Células basais (seta).

Micronúcleos só foram considerados se estes apresentassem as seguintes características; núcleo arredondado, com suave perímetro sugestivo de membrana, diâmetro menor que um terço do diâmetro do núcleo associado, mas suficientemente grande para ser diferenciado em sua forma e cor, Feulgen-positivo, cor rosa-claro na iluminação de campo claro, intensidade da coloração semelhante à do núcleo, textura semelhante à do núcleo, mesmo plano focal como o núcleo e ausência de sobreposição ou com ponte para o núcleo (Figura 27 e Figura 28, página 58).

Figura 27. Células com um micronúcleo (seta).

Figura 28. Células com dois micronúcleos (seta).

Assim como foram avaliadas outras anomalias celulares. Defeitos durante a divisão ou citocineses; binucleadas (Figura 29), tetranucleadas (Figura 30, página 59), brotos nucleares (Figura 31, página 59), pontes nucleares (Figura 32, página 59). Células com morte celular ou apoptoses; picnóticas (Figura 33, página 60) e cariолíticas (Figura 34, página 60).

Figura 29. Células binucleadas (seta).

Figura 30. A e B - Células tetranucleadas (setas).

Figura 31. Células com brotos nucleares (seta).

Figura 32. Células com pontes nucleares (seta).

Figura 33. Células picnóticas (seta).

Figura 34. Células kariolíticas (seta).

O fluxograma a seguir ilustra os principais procedimentos metodológicos (Figura 35, página, 61).

Figura 35. Fluxograma dos procedimentos metodológicos.

Resultados

---

4. RESULTADOS

Foram realizadas análises descritivas verificando-se a distribuição de cada variável. Análises bivariadas utilizando testes paramétricos (teste t, ANOVA) e testes não paramétricos quando necessário (teste do qui-quadrado ou exato e teste Kruskal-wallis seguido de pós-teste de Dunn) (Tabela 1).

Tabela 1. Análise descritiva dos grupos de indivíduos (n =95).

	Controle n= 21	G1 n=21	G2 n=21	G3 n=23	G4 n= 9	p**=
Idade anos (EP)*	24,5 (1,09)	16,4 (1,09)	16,7 (1,09)	16,9 (1,05)	18,2 (1,67)	<0,001
Sexo masculino (%)	9,5	38,1	33,3	60,9	33,3	0,0127
Sexo feminino (%)	90,5	61,9	66,7	39,1	66,7	
Tempo de tratamento meses (EP)	---	8,1 (1,3)	20,3 (1,3)	38,3 (1,2)	71,2 (1,9)	

* EP = erro padrão; ** p= valor de p para teste de comparação de médias ou de proporções.

A distribuição de idade entre indivíduos do sexo masculino e do sexo feminino é bem diferente ($p= 0,0390$). Isto é, a idade dos indivíduos do sexo masculino é significativamente menor do que dos indivíduos do sexo feminino, mas existem valores extremos entre o primeiro grupo (Figuras 36 e 37, página 65 e Figura 38 página 66). A idade do grupo controle foi bem maior que os demais grupos ($p<0,001$).

Figura 36. Gráfico da distribuição de idade entre os grupos.

Figura 37. Gráfico da distribuição de idade e sexo (1=masculino; 2=feminino).

Figura 38. Gráfico de distribuição de idade entre sexo masculino e feminino

A média de idade entre indivíduos do sexo masculino foi de 16,9 (EP = 1.0) e média de idade entre indivíduos do sexo feminino foi de 19,5 (Tabela 2). Para comparação de idade utilizou ANOVA com pós-teste de Tukey mostrando que apenas o controle teve idade diferente dos demais grupos.

Tabela 2. Distribuição da idade entre sexo e grupos.

	Masculino (n=34)			Feminino (n= 61)		
	N	M (DP)	Min – Max	N	M (DP)	Min - Max
Controle	2	31,0 (4,2)	28 – 34	19	23,8 (4,3)	18 - 33
G1	8	14,3 (2,7)	12 – 20	13	17,7 (7,5)	11 - 35
G2	7	15,6 (4,0)	12 – 24	14	17,2 (6,1)	11– 31
G3	14	16,7 (4,3)	14 – 31	9	17,2 (3,8)	14 – 24
G4	3	18,3 (0,6)	18 – 19	3	18,2 (4,5)	13 - 24

M= Média/ DP= desvio padrão/ Min=mínima/ Max=máxima.

Analisando a Tabela 3, não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes para nenhuma das anomalias citogenéticas, exceto para a cariolíticas, com maior frequência no grupo controle. Apenas o controle foi diferente do grupo 4. O grupo com maior tempo de tratamento com o aparelho. Células binucleadas se apresentaram em maior

quantidade em todos os grupos avaliados e quando foram comparadas com as outras anomalias celulares. Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$).

Tabela 3. Análise descritiva das alterações citogenéticas.

	Controle (n= 21)	G1 (n=21)	G2 (n=21)	G3 (n=23)	G4 (n= 9)	$p^{**} =$
	M (Q1 – Q3)	M (Q1 – Q3)	M (Q1 – Q3)	M (Q1 – Q3)	M (Q1 – Q3)	
1 MN	2 (0 – 2,5)	1,5(0,5–2,0)	1,5 (1,0 – 2,0)	0,5 (1,0 – 2,5)	1,0 (0 – 2,0)	0,9016
2 MN	0 (0 – 0,5)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0,0723
Binucleadas	15 (12 – 21)	9 (8 – 16)	14 (9 – 21)	11 (9 – 18)	9 (7 – 12)	0,4257
Picnóticas	1 (0 – 7)	1 (0 – 4)	0 (0 – 1)	2 (0 – 4)	3 (1 – 3)	0,3467
Cariolíticas	5 (2 – 10)	4 (0 – 9)	2 (0 – 6)	2 (0 – 5)	0 (0 – 2)	0,0166
Brotos	1 (0 – 2)	1 (0 – 1)	1 (0 – 1)	1 (0 – 1)	1 (0 – 1)	0,6480
Total	28 (18,5 – 36,5)	19 (11,5 – 36,5)	19,5 (14,0 – 30,0)	18 (4,5 – 25,5)	17,5 (11,0 – 19,5)	0,1470
RI	0,34 (0,11 – 0,71)	0,25 (0,0 – 0,54)	0,97 (0,0 – 0,31)	0,09 (0 – 0,38)	0,10 (0 – 0,30)	0,0661

*Valor de p para teste de Kruskal-wallis/ M=Média/Q1= quartel 1 /Q3=quarte 3.I

Na comparação das células tetranucleadas utilizou-se o teste exato para tabela de contingência e não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, embora exista aparentemente aumento destas anomalias no grupo G3, um aumento no número amostral poderia revelar uma diferença significativa. As pontes nucleares apresentaram valores de apenas 0, 0,5 e 1 sendo apenas 8 indivíduos com valores de 0,5 e 2 indivíduos com o valor de 1. Assim, os valores foram agrupados como presente e ausente sendo realizado, portanto, teste exato para tabela de contingência resultando num valor de p de 0,6526. Isto revela que não foi possível encontrar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. A contagem de células binucleadas foi na Tabela 4, transformada em presença e ausência. Note que na Tabela 3, a análise foi realizada considerando os dados como contínuos, e o valor do p é semelhante.

Tabela 4. Análise descritiva da presença de células com alterações citogenéticas.

	Controle (n= 21)	G1 (n=21)	G2 (n=21)	G3 (n=23)	G4 (n= 9)	p*
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Tetranucleadas	2 (9,5)	2 (9,5)	1 (4,8)	4 (17,3)	1 (11,1)	0,7671
Pontes	2 (9,5)	4(19,1)	1 (4,4)	1 (4,4)	1 (11,1)	0,6526
Binucleadas	7 (33,3)	2 (9,5)	1(4,8)	1 (8,7)	1 (11,1)	0,0957

*Valor de p para teste exato para análise de tabela de contingência.

Para dar suporte às análises segue uma análise bivariada de anomalias citogenéticas de acordo com o sexo, sem apresentar diferenças estatísticas em nenhuma das alterações (Tabela 5 e Tabela 6).

Tabela 5. Análise bivariada de anomalias citogenéticas de acordo com o sexo.

	Masculino (n=34)	Feminino (n= 61)	
	M (Q1 Q3)	M (Q1-Q3)	p*
1 MN	2 (1 – 3,5)	1,5 (0,5 – 2,5)	0,2399
2 MN	0 (0 – 0)	0 (0 – 0)	0,3199
Binucleadas	19,8 (13,5 – 33,5)	19,5 (13,5 – 32,0)	0,8800
Picnóticas	2 (0 – 4)	1 (0 – 4)	0,4328
Cariolíticas	4 (0 – 6)	2 (0 – 5)	0,4564
Brotos	0 (0 – 1)	0 (0 – 1)	0,5660
Mil Total	13,5 (9 – 16,0)	12 (8 – 18,5)	0,9690
RI	0,25 (0,0 – 0,38)	0,14 (0,0 – 0,42)	0,7591

*Valor de p para teste Kruskal wallis. M= Mediana, Q1=primeiro Quartil, Q3= terceiro quartil

Tabela 6. Distribuição de células com anomalias citogenéticas para sexo masculino (n= 34) e sexo feminino (n= 61).

	Masculino (n=34)	Feminino (n= 61)	
	n (%)	n (%)	P*
Tetranucleadas	5 (14,7)	5 (8,2)	0,4868
Pontes Nucleares	5 (14,7)	5 (14,7)	0,4868
Micronúcleos	3 (8,8)	10 (16,4)	0,3666

*Valor de p para teste exato de Fischer

Tabela 7. Correlação de Spearman entre as alterações citogenéticas.

[illegible]

Discussão

---

5. DISCUSSÃO

A integridade genética da população humana nas últimas décadas tem sido afetada pela interação entre fatores ambientais, novos hábitos de vida e certos polimorfismos genéticos (Westphalen et al., 2008). Os biomateriais usados na Ortodontia, quando presentes na cavidade bucal, estão sujeitos a processos corrosivos facilitando a liberação de elementos secundários como íons níquel e cromo, que podem ficar acumulados em determinados órgãos (Munksgaard, 1992; Wataha, 2000; Valko et al., 2005; Levrini et al., 2006; Souza e Menezes, 2008). Embora existam estudos que relatam que a quantidade desses metais liberados no sangue e na saliva são significativamente mais baixos, sem atingirem níveis tóxicos (Kerosuo, 1995; Janson, 1998; Hwang, 2001; Petoumeno, 2008), não se pode excluir a possibilidade de que concentrações não tóxicas, a longo prazo, podem ser suficientes para induzir efeitos biológicos em células buco-epiteliais (Hwang et al., 2001; Faccioni et al., 2003; Westphalen et al., 2008). Assim, pacientes em tratamento ortodôntico tem mostrado reações alérgicas quando apresentam contato prévio com metais considerados alergênicos, independente do tempo de tratamento ortodôntico (Genelhu, 2005). Portanto, nosso estudo teve como objetivo avaliar pacientes em contato com aparelhos ortodônticos (bráquetes, bandas, fios) por longo período de tempo, levantando a hipótese que estes possam causar danos permanentes no DNA e causar mutações. Além disto, na literatura existem poucos trabalhos que usaram MNT em pacientes com aparelhos ortodônticos (Westphalen et al., 2008; Angelieri et al., 2011; Natarajan et al., 2011; Hevari et al., 2013; Martín-Cameán et al., 2015).

A literatura relata que o MNT foi usado principalmente em células de linfócitos para avaliar pacientes expostos a agentes tóxicos, estilos de vida e ingestão de alimentos. (Fenech et al., 2003). No entanto, quando foi aplicado em tecidos epiteliais, a técnica apresentou vantagens sobre o emprego em linfócitos, sendo que as células epiteliais podem ser diretamente estudadas. A coleta não é invasiva e apresenta baixo custo, além de vários pesquisadores afirmarem que a análise de micronúcleos em células da mucosa bucal apresenta suficiente validade e sensibilidade (Sarto et al., 1987; Bloching et al., 2008;

Westphalen et al., 2008). Outra vantagem de usar células epiteliais de pacientes em tratamento ortodôntico se deve ao fato que elas estão em contato direto com os aparelhos, sofrendo alterações por traumas ou pela captação contínua de íons tóxicos liberados pelas ligas metálicas, além de apresentar capacidade limitada para a reparação do DNA. Servem também como amostras mais adequadas para revelar a instabilidade do genoma em comparação com células que reparam danos no DNA de forma mais eficiente como são as células dos linfócitos (Holland et al., 2008; Heravi et al., 2013). Por outro lado, o MNT permite avaliar na mesma lâmina, além dos micronúcleos, outras anomalias nucleares denominadas metanucleadas como brotos nucleares, pontes nucleares, cromatina condensada, cariolíticas, picnóticas, anomalias frequentes nas células epiteliais da mucosa bucal. Por estes motivos optou-se por utilizar neste trabalho o MNT.

Com relação a estudos *in vivo* ou *in vitro*. Estudos *in vitro* não representam totalmente as condições bucais reais, limitando a veracidade dos resultados. Por outro lado, estudos *in vivo* apresentam também fatores limitantes, sendo que as condições biológicas de cada paciente dificultam a padronização do estudo. Mesmo assim mostram mais vantagens, ao representar uma real condição da cavidade bucal por intermédio das células, que são diretamente expostas aos aparelhos ortodônticos (Faccioni et al., 2003). Assim, o uso de células da mucosa bucal que estão em contato direto com os aparelhos ortodônticos e que absorvem os íons liberados por eles, são fontes que permitem avaliar os efeitos causados pelos mesmos. No presente estudo optou-se por usar o MNT em células epiteliais da mucosa bucal pela facilidade da realização das coletas, enquanto os pacientes eram atendidos regularmente na consulta ortodôntica, sem causar desconforto e facilitando a avaliação.

O MNT em células esfoliadas apresenta muitas variáveis na sua metodologia que podem dificultar sua padronização em relação a: critérios de avaliação, tipos de coloração (*Feulgen*, *DAPI*, *May Grunwald Giemsa*, etc) e número de células contadas por indivíduos (1000-3000 células por indivíduo) (Titenko-Holland et al., 1993; Nersesyan et al., 2006). Em nosso estudo foram avaliadas 2000 células por pacientes, foi usada solução de *Fast Green*

para colorir as lâminas, por ser mais efetivo e por não colorir grânulos de querato-hialina e bactérias que se assemelham a MN que podem levar a falsos positivos. Além disto, foi realizada a lavagem das lâminas com solução de Buffer, para diminuir a presença de DNAases endógenas presentes na cavidade bucal e remover bactérias e restos celulares poderiam complicar a seleção de MN e outras anormalidades nucleares.

Ao comparar nosso trabalho com os existentes na literatura, observamos certas semelhanças de resultados. Westephalen et al., (2008) avaliaram 20 pacientes antes e após 10 dias da instalação e como resultados não encontraram mudanças significativas nos danos citotóxicos. Porém, Natarajan et al. (2011) observaram maiores danos citotóxicos no momento da instalação dos aparelhos ortodônticos quando comparados ao grupo controle, porém tais efeitos diminuíram após 30 dias de tratamento. Em nosso estudo foram avaliados 74 pacientes com aparelhos ortodônticos e 21 pacientes controle, num total de 95 pacientes, em períodos de avaliação entre 1 a 48 meses de tratamento. Como resultados não foram encontrados danos citogenéticos e citotóxicos estatisticamente significativos nos quatro grupos avaliados. O grupo de pacientes com tratamento prolongado G4 apresentou poucos pacientes o que pode ter mascarado as alterações celulares. Cabe ressaltar que nenhum outro trabalho avaliou pacientes acima de 9 meses de tratamento. Contudo, nossos resultados afirmam que os aparelhos ortodônticos não causam efeitos genotóxicos e citotóxicos nos pacientes, sejam pela capacidade de reparo ou adaptabilidade do paciente independente do tempo de tratamento. Assim como a quantidade de liberação dos íons que não alcança níveis tóxicos e não provoca instabilidade do genoma. Além disso as células epiteliais ao estarem em íntimo contato com a saliva permitem um mecanismo de defesa contra reações alérgicas ao níquel, sendo que a saliva elimina os potenciais alérgenos quando eles são engolidos, associados a vascularização da mucosa bucal que permite rápida dispersão dos mesmos.

Estudo confirma que a viabilidade celular em células epiteliais é baixa (Thomas et al., 2009). A mucosa bucal se encontra em renovação constante da camada superficial, apresentando diversidade de células em renovação e apoptose (Albertini et al., 2000; Setcos

et al., 2006; Thomas et al., 2009). Portanto, a frequência de Micronúcleos em células epiteliais é menor do que em células sanguíneas (Tintenko-Holland et al., 1994). Stich et al. (1982) encontraram que 0,47% das células bucais apresentavam micronúcleos em pacientes saudáveis. Rosin et al. (1989) encontraram frequência de 0,29% numa população controle. Tolbert et al. (1992) encontraram em pacientes que receberam radioterapia frequência de micronúcleos de 0,52%. Tintenko-Holland et al., (1994) encontraram frequência de MN de 0,145%. Hevari et al. (2013) encontraram em células da mucosa bucal de 25 pacientes com aparelhos ortodônticos, uma frequência de micronúcleos antes da instalação do aparelho de $(10,6 \pm 5,7)$ em 1000 células e depois de nove meses de tratamento de $9,2 (\pm 6,37)$ também em 1000 células, com ausência de resultados estatísticos significantes. Nesta pesquisa, foi encontrada na tipologia de 1MN as seguintes médias para os grupos: G0 de 0,2%, G1 de 0,15%, G2 de 0,15%; G3 de 0,05% e G4 de 0,1%, sem diferenças estatísticas significantes entre os grupos ($p=0,9016$). Por outro lado, quando foram avaliadas a tipologia de 2MN, estas só foram encontradas no Grupo controle com uma média de 0 (0-0,5), também sem resultados estatísticos significativos ($p=0,0723$).

Ao avaliar outras alterações nucleares presentes na mucosa bucal. Tolbert et al. (1992) encontraram em pacientes que receberam radioterapia a prevalência de brotos nucleares e picnóticas na ordem de 1 em cada 1000 células; para binucleadas, cariorréxes e cromatina condensada foram de 3-12 em cada 1000 células e para cariолíticas foram de 200 em cada 1000 células. Por outro lado, Tintenko-Holland et al. (1994) encontraram uma frequência de células picnóticas e brotos nucleares não maior a 2% do total das células avaliadas em pacientes saudáveis. Toy et al. (2014) avaliaram a genotoxicidade e citotoxicidade em 30 pacientes em tratamento ortodôntico cujo os bráquetes foram colados com três diferentes compósitos. Para avaliação foi utilizado o MNT e não foram encontradas diferenças estatísticas significantes entre os diferentes grupos. Porém, o número de células binucleadas aumentou significativamente em todos os grupos e as células cariолíticas aumentou no grupo de 6 meses de tratamento. Concluíram que aos 6 meses de tratamento com diferentes compósitos de colagem observou-se citotoxicidade. Porém, efeitos

genotóxicos foram ausentes, por causa da capacidade das células epiteliais de se renovar e regenerar em um tempo curto de 7 a 14 dias, com os efeitos deletérios dos materiais não permanecendo até o final do estudo. Resultados similares foram obtidos nesta pesquisa, com maior frequência de células cariолíticas no grupo controle ($p=0,0166$). Segundo Ramirez e Saldanha (2002), incrementos de células cariолíticas acontecem em processos de queratinização, representando resposta adaptativa a injúrias que aconteceram no epitélio bucal, relacionadas também com células necróticas e efeitos de citotoxicidade. Porém esta anomalia é normal em epitélios escamosos, em especial pelos efeitos causados pela mastigação. No entanto, a constante ação dos agentes mutagênicos como álcool, tabaco, radioterapia em pacientes com câncer e aparelhos ortodônticos poderia aumentar a taxa de morte celular, como indicado pelo aumento significativo desta anomalia. Porém, os dados obtidos nesta pesquisa não podem ser interpretados como citotoxicidade dos aparelhos ortodônticos, sendo que estão presentes nos processos normais de homeostase da mucosa bucal.

Por outro lado, células binucleadas apresentam morfologia semelhante a das células diferenciadas, contém dois núcleos com o mesmo tamanho, forma e cor. Os núcleos são geralmente muito próximos entre si, podendo ou não se tocar, não envolvem interações diretas com o DNA, mas sim envolvem interferências com os eventos que ocorrem no final da divisão celular, resultando em divisões celulares incompletas por falhas na citocinese. Apresentam também, associação com células do câncer e doenças neurodegenerativas, sugerindo que proporção elevada de células binucleadas pode estar associada com essas enfermidades (Tintenko-Holland et al., 1994; Thomas et al., 2007). Neste estudo, células binucleadas apresentaram valores elevados quando comparadas as outras alterações nucleares avaliadas: G0 - 15; G1- 9; G2-14; G3-11 e G4-9 (Tabela 3). Porém com distribuição normal entre os grupos e sem valores estatisticamente significativos ($p=0,4257$).

A literatura relata que existe tendência das mulheres apresentarem maior frequência de MN e outras células metanucleadas (Konopacka 2003; Holland et al., 2008; Bloching et al., 2008; Holland et al., 2008; Bonassi et al., 2011; Fenech et al., 2011). No

entanto, nossos resultados não acompanharam essa tendência, pois não foram encontradas diferenças estatísticas significantes em nenhuma das alterações citogenéticas quando comparadas entre os sexos. Apesar da ausência estatística foram encontrados valores maiores de todas as alterações citogenéticas no sexo masculino (Tabela 5).

Bloching et al. (2008) encontraram maior número de micronúcleos em pacientes com maior idade e problemas bucais como falta de dentes e doenças periodontais. Hevari et al. (2013) concluíram que idade avançada, presença de doenças sistêmicas e fatores de risco como tabaco e consumo de álcool podem agravar os efeitos nocivos dos aparelhos ortodônticos corretivos. Em nosso estudo, não foram selecionados pacientes fumantes, alcoólatras e com doenças sistêmicas ou bucais, eliminando os fatores externos que poderiam influenciar os resultados. Neste trabalho, ao comparar as alterações nucleares com a idade dos pacientes em todos os grupos, não foram encontradas diferenças estatísticas significantes em nenhuma das alterações citogenéticas, sendo importante reconhecer que a idade do grupo controle foi bem maior que os demais grupos (Figura 39, página 68).

Como relatado na literatura, células binucleadas e brotos nucleares estão relacionados com defeitos durante a divisão celular ou citocineses, assim como células cariolíticas e picnóticas estão relacionadas com morte celular ou apoptoses (Thomas et al., 2009). Em nossos resultados encontramos associação com valores estatisticamente significativos entre: células picnóticas e células cariolíticas ($p=0,004$), células picnóticas e brotos nucleares ($p=0,0104$), células cariolíticas e células binucleadas ($p=0,0023$) e células com um micronúcleo e células binucleadas ($p=0,0023$). Segundo Gonçalves et al., (2014) presença de brotos nucleares estão relacionados com problemas de reparo do DNA, assim a correlação encontrada em nossos resultados entre células picnóticas e brotos nucleares, mostra além de morte celular e apoptoses, problemas de reparo do DNA (Tabela 7).

Embora os danos encontrados tenham sido reduzidos ou não encontrados, estudos adicionais são necessários, tanto de natureza experimental quanto de base epidemiológica. Talvez não existam resultados neste estudo que mostrem riscos para os pacientes em

tratamento ortodôntico, porém existe a possibilidade que outros agentes associados à terapia ortodôntica possam ser responsáveis por alterações celulares. Estes fatores são: idade, estilo de vida, materiais restauradores, usos de elásticos, que são, muitas vezes, relacionados com danos citogenéticos. Este estudo *in vivo* não relatou qualquer efeito genotóxico causado por aparelhos ortodônticos corretivos nas células epiteliais humanas de indivíduos saudáveis nos diferentes tempos de tratamento, ainda que seja o primeiro estudo com avaliações em longo prazo G1 (1 a 12 meses), G2 (13 a 24 meses), G3 (25 a 48 meses) e G4 (acima de 48 meses). Os resultados deste estudo, devem ser interpretados com cautela, sendo que danos no DNA causados pelo uso dos aparelhos ortodônticos podem ser reparados em indivíduos saudáveis, mas uma diminuição na capacidade de reparação ou alterações no sistema imunitário podem permitir que o dano de DNA possa permanecer e ser expressado como alteração do genoma ou mutações em tempo futuro (Heravi et al., 2013).

Nosso trabalho apresentou algumas limitações, principalmente no mecanismo de avaliação das lâminas que foi realizado por meio do microscópio de luz óptica, o que limita a possibilidade de captar galeria de imagens completas para futuras reanálises e controle de qualidade. Além disto, causa o risco de obter valores heterogêneos, independentemente do nível de formação do avaliador. Assim podem existir diferenças entre os escores dados pelo avaliador, seja por fadiga, ou diferenças na capacidade e/ou interpretação dos critérios (Fenech et al., 2003). Outras limitações importantes encontradas foram as diferenças de idade e sexo entre os grupos estudados, além do pequeno tamanho da amostra no Grupo G4, tanto de número de pacientes como número de células avaliadas. A discussão dos resultados dos grupos G2, G3, G4 não foi possível devido a ausência de trabalhos na literatura com estes tempos de avaliação.

Mais estudos são necessários para determinar os efeitos biológicos de aparelhos ortodônticos numa população maior, avaliando os mesmos pacientes em diferentes tempos

de tratamento e com idades semelhantes entre os grupos. Assim como, emprego de outros sistemas de teste, como Ensaio Cometa, uso de outro tipo de coloração como 4'-stainfluorescente, 6'-diamidino-2-fenilindole (DAPI), uso de imagens de células vivas e uso de sistemas automáticos de contagem de MN como Metafer e MetaSystems, IMSTAR, *iCyte*®.

Conclusão

---

6. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicaram que aparelhos ortodônticos corretivos em pacientes saudáveis com capacidade de reparo normal, não causaram risco de danos genotóxicos em células da mucosa bucal, como evidenciado pelo MNT em diferentes tempos de tratamento.

A frequência de MN e outras anormalidades encontradas no grupo controle mostram que a idade e estilo de vida são fatores mais revelantes do que os aparelhos ortodônticos para aumentar a frequência de tais alterações.

Foi rejeitada a hipótese que o tempo prolongado de tratamento ortodôntico corretivo pode causar efeitos citotóxicos e genotóxicos nos pacientes.

Referências

REFERÊNCIAS *

1. Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res.* 2000;463:111-172.
2. Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of bucal mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11:51-56.
3. Angelieri F, Carlin V, Martins RA, Ribeiro DA. Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:399-404.
4. Bass JK, Fine H, Cisneros GJ. Nickel hypersensitivity in the orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1993;103:280-285.
5. Bloching M, Reich W, Schubert J, Grummt T, Sandner A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to bucal hygiene and dental factors. *Bucal Oncol.* 2008;44:220-226.
6. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S. The Human MicroNucleus project on exfoliated buccal cells (HUMN(XL)): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol. *Mutat Res.* 2011;728:88-97.
7. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007; 28:625-631.
8. Bukvic N, Gentile M, Susca F, Fanelli M, Serio G, Buonadonna L, et al. Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenarians. *Mutat Res.* 2001;498:159-167.
9. Eliades T, Pratsinis H, Kletsas D, Eliades G, Makou M. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloys. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;125:24-29.
10. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fraccasso ME. *In vivo* study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am.J.Orthod.Dentofacial Orthop.* 2003;124:687-693.
11. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res.* 1993;285:35-44.
12. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2007;2:1084-1104.

*As referências seguiram as normas do Committee International Medical Journals Editor- Group Vancouver. As abreviaturas dos periódicos estão de acordo com o Medline.

13. Fenech M, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmüller S, Holland N. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells--a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis*. 2007;22:3-4.
14. Fenech M, Holland N, Zeiger E, Chang WP, Burgaz S, Thomas P, et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. *Mutagenesis*. 2011;26:239-245.
15. Fernández-Miñano E, Ortiz C, Vicente A, Calvo JL, Ortiz AJ. Metallic ion content and damage to the DNA in buccal mucosa cells of children with fixed orthodontic appliances. *Biometals*. 2011;24:935-941.
16. Genelhu MC, Marigo M, Alves-Oliveira LF, Malaquias LC, Gomez RS. Characterization of nickel-induced allergic contact stomatitis associated with fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005;128:378-381.
17. Gonçalves TS, Menezes LM, Trindade C, Machado Mda S, Thomas P, Fenech M, Henriques JA. Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without silver soldered joints. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;762:1-8.
18. Hafez HS, Selim EM, Kamel Eid FH, Tawfik WA, Al-Ashkar EA, Mostafa YA. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140:298-308.
19. Heravi F, Abbaszadegan MR, Merati M, Hasanzadeh N, Dadkhah E, Ahrari F. DNA damage in buccal mucosa cells of patients with fixed orthodontic appliances. *J Dent (Tehran)*. 2013;10:494-500.
20. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*. 2008;659:93-108.
21. House K, Sernetz F, Dymock D, Sandy JR, Ireland AJ. Corrosion of orthodontic appliances--should we care?. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008;133:584-592.
22. Hwang CJ, Shin JS, Cha JY. Metal release from simulated fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;120:383-391.
23. Janson GR, Dainesi EA, Consolaro A, Woodside DG, de Freitas MR. Nickel hypersensitivity reaction before, during, and after orthodontic therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1998;113:655-660.

24. Kao CT, Ding SJ, Min Y, Hsu TC, Chou MY, Huang TH. The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. *Eur J Orthod*. 2007; 29:198-203.
25. Kashyap, B e Reddy P.S. Micronuclei assay of exfoliated bucal buccal cells: means to assess the nuclear abnormalities in different diseases. *J Cancer Res Ther*. 2012;8:184-191.
26. Katarkar A, Mukherjee S, Khan MH, Ray JG, Chaudhuri K. Comparative evaluation of genotoxicity by micronucleus assay in the buccal mucosa over comet assay in peripheral blood in bucal precancer and cancer patients. *Mutagenesis*. 2014;29:325-334.
27. Kerosuo H, Moe G, Kleven E. In vitro release of nickel and chromium from different types of simulated orthodontic appliances. *Angle Orthod*. 1995;65:111-116.
28. Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res*. 1997;392:19-30.
29. Konopacka, M. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. *Neoplasma*. 2003;50:380-382.
30. Landi S, Lazzolino E, Barale R. Are baseline frequencies of SCEs, CAs, and MN in human lymphocytes related to hematological values?. *Mutat Res*. 2000; 469:159-166.
31. Lee TK, Allison RR, O'Brien KF, Khazanie PG, Johnke RM, Brown R, et al. Ginseng reduces the micronuclei yield in lymphocytes after irradiation. *Mutat Res*. 2004;557:75-84.
32. Levrini L, Lusvardi G, Gentile D. Nickel ions release in patients with fixed orthodontic appliances. *Minerva Stomatol*. 2006;55:115-121.
33. Lindsten, R. e Kurol J. Orthodontic appliances in relation to nickel hypersensitivity. A review. *J Orofac Orthop*. 1997;58:100-108.
34. Magnusson B, Bergman M, Bergman B, Söremark R. Nickel allergy and nickel-containing dental alloys. *Scand J Dent Res*. 1982;90:163-167.
35. Martín-Cameán A, Jos A, Mellano-García P, Iglesias-Linares A, Solano E, Cameán AM. *In vitro* and *In Vivo* evidence of cytotoxic and genotoxic effects of metal ions released by orthodontic appliances: A review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40:86-113.
36. Martino-Roth MG, Viégas J, Roth DM. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol Res*. 2003;2:410-417.

37. Migliore L, Guidotti P, Favre C, Nardi M, Sessa MR, Brunori E. Micronuclei in lymphocytes of young patients under antileukemic therapy. *Mutat Res.* 1991;263:243-248.
38. Miller B, Pötter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D, Madle S. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung. Mutat Res.* 1998;410:81-116.
39. Natarajan M, Padmanabhan S, Chitharanjan A, Narasimhan M. Evaluation of the genotoxic effects of fixed appliances on bucal mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: an in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140:383-388.
40. Nersesyan A, Kundi M, Atefie K, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated bucal mucosa cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:1835-1840.
41. Nielsen C e Klaschka F. Test studies on the mouth mucosa in allergic eczema. *Dtsch Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl Gesamte.* 1971;57:201-218.
42. Norseth, T. The carcinogenicity of chromium. *Environ Health Perspec.* 1981;40:121-130.
43. Oh, K.T e Kim K.N. Ion release and cytotoxicity of stainless steel wires. *Eur J Orthod.* 2005;27:533-540.
44. Ortiz AJ, Fernández E, Vicente A, Calvo JL, Ortiz C. Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: toxicity and DNA damage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140:115-122.
45. Park, H.Y e Shearer T.R. In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. *Am J Orthod.* 1983;84:156-159.
46. Petoumeno E, Kislyuk M, Hoederath H, Keilig L, Bourauel C, Jäger A. Corrosion susceptibility and nickel release of nickel titanium wires during clinical application. *J Orofac Orthop.* 2008;69:411-423.
47. Ramirez, A e Saldanha P.H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with bucal carcinomas. *Genet Mol Res.* 2002;1:246-260.
48. Ristic L, Vucevic D, Radovic L, Djordjevic S, Nikacevic M, Colic M. Corrosive and cytotoxic properties of compact specimens and microparticles of Ni-Cr dental alloy. *J Prosthodont.* 2014;23:221-226.
49. Saran R, Tiwari RK, Reddy PP, Ahuja YR. Risk assessment of bucal cancer in patients with pre-cancerous states of the bucal cavity using micronucleus test and challenge assay. *Bucal Oncol.* 2008;44:354-360.

50. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*. 1987;2:11-17.
51. Setcos JC, Babaei-Mahani A, Silvio LD, Mjör IA, Wilson NH. The safety of nickel containing dental alloys. *Dent Mater*. 2006;22:1163-1168.
52. Snustad, DP, Simmons MJ. Principles of genetics. 6th ed. United States of America. John Wiley & Sons, Inc; 2012.
53. Squier C.A. e Kremer M.J. Biology of buccal mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001;29:7-15.
54. Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis*. 2007;22:371-379.
55. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4:825-837.
56. Titenko-Holland N, Moore LE, Smith MT. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat Res*. 1994;312:39-50.
57. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat Res*. 1992;271:69-77.
58. Toy E, Yuksel S, Ozturk F, Karatas OH, Yalcin M. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the buccal epithelial cells of patients undergoing orthodontic treatment with three light-cured bonding composites by using micronucleus testing. *Korean J Orthod*. 2014;44:128-135.
59. Van Hoogstraten IM, Andersen KE, Von Blomberg BM, Boden D, Bruynzeel DP, Burrows D, et al. (1991). Reduced frequency of nickel allergy upon buccal nickel contact at an early age. *Clin Exp Immunol*. 1991;85:441-445.
60. Wataha, J.C. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J Prosthet Dent*. 2000;83:223-234.
61. Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JA, Medina-Silva R. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res*. 2008;7:1259-1266.
62. Xue KX, Wang S, Ma GJ, Zhou P, Wu PQ, Zhang RF, Xu Z, Chen WS, Wang YQ. Micronucleus formation in peripheral-blood lymphocytes from smokers and the influence of alcohol- and tea-drinking habits. *Int J Cancer*. 1992;50:702-705.
63. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents. *Sist Sanit Navar*. 2005;28:227-236.

Anexos

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ EM PESQUISA PARA SERES HUMANOS

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS EM PACIENTES COM APARELHO ORTODÔNTICO CORRETIVO AVALIADOS POR FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS E ENSAIO COMETA

Pesquisador: Fábio Lourenço Romano

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35905914.1.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 874.068

Data da Relatoria: 14/12/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto está apresentado de forma correta, cumpre todas as normativas estabelecidas pelo CEP da FORP/USP e CONEP.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo será avaliar os danos citogenotóxicos causados em células epiteliais bucais de pacientes submetidos a tratamentos ortodônticos corretivos e compará-los a um grupo controle. Sessenta pacientes em tratamento ortodôntico corretivo e 20 pacientes controle com idade entre 14 e 20 anos de idade participarão da pesquisa, de ambos os gêneros e que estiverem em atendimento na clínica de pós-graduação. Os pacientes em tratamento serão divididos em três grupos (n=20) que se diferenciarão pelo tempo de tratamento G1 (1 mês a 12 meses de tratamento), G2 (13 meses a 24 meses), G3 (25 meses a 48 meses de tratamento). As células serão coletadas da parte interna da bochecha, com escova citológica e colocadas em tubos de polietileno contendo solução tampão de fosfato salina (PBS). Imediatamente após a obtenção da mostra será realizada avaliação dos danos citogenéticos por meio do teste de micronúcleos e ensaio

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-0251

Fax: (16)3602-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO/ FORP/ USP

Continuação do Parecer: 874.068

cometa no Laboratório Citogenético e Mutagênese da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os dados obtidos nas avaliações serão submetidos a análise estatística, empregando o teste apropriado frente à natureza dos dados. O nível de significância a ser adotado será 5%.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os mesmos descritos inicialmente no projeto de pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores adequaram o projeto a todas as solicitações do CEP da FORP/USP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo aprovado. Os relatórios (parciais/final) deverão ser encaminhados, utilizando-se da opção “Enviar Notificação” (descrita no Manual “Submeter Notificação”, disponível na Central de Suporte – canto superior direito do portal www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberado na 174ª R.O. do CEP.

RIBEIRÃO PRETO, 17 de Novembro de 2014

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº
Bairro: Monte Alegre CEP: 14.040-904
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-0251 Fax: (16)3602-4102 E-mail: cep@forp.usp.br

ANEXO 2 - IDENTIFICAÇÃO DOS MATERIAIS DE AÇO INOXIDÁVEL UTILIZADOS NOS PACIENTES

	Dental Morelli Ltda. Ficha de Segurança – FISPQ / Ficha de Datos de Seg
Identificação do Produto 1. Identificação da substância/preparação e da sociedade/empresa; 1.1- Identificação da substância/preparação. Produtos de aço inoxidável austenítico ligados ao Cr-Ni ou ao Cr-Ni e Mo. Podem ser fornecidos na forma de fios ou fitas. Bráquetes, bandas, tubos e dispositivos feitos de fitas e fios para ortodontia. 1.2- Identificação da sociedade/empresa. Dental Morelli Ltda Alameda Jundiá, 230 / 250 Jardim Saira CEP 18085-090 – Sorocaba – São Paulo – Brasil. Responsável Técnico: Eng. Roger Morelli Telefone de emergência desta empresa e/ou de um responsável de acordo com o Artigo 12 do Directivo 86/379/EEC: No Brasil: +55-15-0800-12-14-55 +55-15-3238-8200 Na Europa: EUROPEAN REPRESENTATIVE Nuno Flores Al. Bonifácio Lázaro Lozano, 3 – Piso 0 – C 2780-125 Oeiras – Portugal info.morelli@euroconexao.com Tel. +351 214439292 / Fax +351 214439294 Nos Estados Unidos da América: Sr. Yesid Arias Urea ariasid@bellsouth.net Telephone: 1-954 3499046 2. Composição/informação sobre os componentes: Produtos em aços inoxidáveis tipo 302, 303, 304, 304L e 304V: Cr: 17,0 – 20,0% Ni: 8,0 – 10,5% Mo: máx. 0,60% Produtos em aço 316 e 316L Cr: 16,0 – 18,0%	Identificación del Producto 1. Identificación de la sustancia o preparado o empresa; 1.1- Identificación de la sustancia o preparado Productos en acero inoxidable aleados con Cr-Ni o Pueden ser suministrados en la forma de alambres Bráquetes, bandas, tubos y dispositivos hechos de al para ortodoncia. 1.2- Identificación de la sociedad o empresa; Dental Morelli Ltda. Alameda Jundiá, 230 / 250 Jardim Saira CEP 18085-090 – Sorocaba – São Paulo – Brasil. Responsable Técnico: Eng. Roger Morelli Teléfono de emergencia de la empresa o responsable artículo 12 del Directivo 86/379/EEC. En Brasil: +55 (15) 0800-141255 +55 (15) 3238-8200 En Europa: EUROPEAN REPRESENTATIVE Nuno Flores Al. Bonifácio Lázaro Lozano, 3 – Piso 0 – C 2780-125 Oeiras – Portugal info.morelli@euroconexao.com Tel. +351 214439292 / Fax +351 214439294 En los EE.UU. Sr. Yesid Arias Urea ariasid@bellsouth.net Teléfono: 1-954 3499046 2. Composición/información sobre los comp Productos em aceros inoxidables tipo 302, 303, 304 Cr: 17,0 – 20,0% Ni: 8,0 – 10,5% Mo: máx. 0,60% Productos en acero 316 e 316L Cr: 16,0 – 18,0%