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

ARTHUR CUNHA DA SILVA

**AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS GENOTÓXICOS/CITOTÓXICOS
DE DISJUNTORES DE HAAS SOBRE CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL,
PELA ANÁLISE DE MICRONÚCLEOS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson Filho

Ribeirão Preto
2017

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

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

Cunha, Arthur da Silva

Avaliação *in vivo* dos efeitos genotóxicos/citotóxicos de Disjuntores de Haas sobre células da mucosa bucal, pela análise de micronúcleos. Ribeirão Preto, 2017.

71p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Nelson-Filho, Paulo

1. Expansão Maxilar; 2. Testes para Micronúcleo; 3. Genotoxicidade; 4. Citogenética.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cunha, AS. **Avaliação *in Vivo* dos Efeitos Genotóxicos/Citotóxicos de Disjuntores de Haas Sobre Células da Mucosa Bucal, Pela Análise de Micronúcleos.**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data da defesa: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

ARTHUR CUNHA DA SILVA

DADOS CURRICULARES

Nascimento	30 de outubro de 1986 – Belém/PA
Filiação	Paulo Roberto Pinheiro da Silva Valdéa de Nazaré Cunha da Silva
2006-2010	Graduação em Odontologia Centro Universitário do Estado do Pará, CESUPA
2009-2009	Atualização em Cirurgia Oral da ABO Associação Brasileira de Odontologia / Pará, ABO/PA
2011-2012	Capacitação em Ortodontia com Ênfase em Diagnóstico Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará – UFPA/PA
2012-2015	Especialização em Ortodontia Fundação Odontológica de Ribeirão Preto - FUNORP
2012-2014	Extensão Universitária em Centro de Formação de Recursos Humanos Especializados no Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais Departamento de Clínica Infantil – FORP/USP
2012-2014	Extensão Universitária em Odontologia Preventiva e Interceptadora Departamento de Clínica Infantil – FORP/USP
2014-2016	Extensão Universitária em “Tratamentos Orto-Cirúrgico em Pacientes Adultos” Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - FORP/USP
2015-2017	Pós-Graduação – nível mestrado Área de concentração: Odontopediatria Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP Orientador: Prof. Dr. Paulo Nelson Filho Bolsa: CNPq
2017-2017	Extensão Universitária: Estudante Visitante em Universidade de Pittsburgh, PA, Estados Unidos

DEDICATÓRIA

Primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Sem a fé em Sua existência nada teria sentido e nada seria possível. Obrigado por me mostrar o caminho, não deixando o ego falar mais alto e tratando ao próximo sempre com respeito como dignos filhos do mesmo pai.

Aos meus pais, Paulo e Valdêa, pelo total apoio e suporte dedicados em anos de puro trabalho. Com muita fé, obtiveram sucesso em disponibilizar toda a base para a criação, educação e principalmente amor a seus filhos. Seus valores e ensinamentos moldaram minha personalidade e caráter. Sou eternamente grato. Obrigado por me apoiarem em todas as minhas decisões tomadas até momento. Sem essa base familiar enraizada, não teria condições de prosperar e realizar este trabalho.

Às minhas irmãs, Paula e Luciana, por sempre me servirem de exemplo e inspiração para continuar em busca de meus sonhos. Suas determinações me motivam e inspiram a nunca perder o foco de minhas metas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Nelson-Filho.

Me considero um aluno de sorte por ter sido orientado por uma grande pessoa. Tentei sempre extrair ao máximo os exemplos demonstrados no dia-a-dia. Nada é por acaso e não é ao acaso que hoje esta Instituição de Ensino é uma das mais respeitadas e influentes no meio científico. Nos mínimos detalhes pude presenciar a grandeza de um profissional dedicado, competente, ético e comprometido em realizar um trabalho de excelência. Espero obter força e maturidade para alcançar algum dia esta ideologia de vida e trabalho com a qual tanto me identifico e respeito.

AGRADECIMENTOS

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

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Diretora, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e do Vice-Diretor Prof. Dr. Arthur Belem Novaes Júnior.

A Profa. Dra. Erika Calvano Küchler, por ter confiado em meu trabalho e proporcionado uma das experiências mais marcantes, até o momento, que foi poder passar alguns meses na Universidade de Pittsburgh, PA, Estados Unidos. Fico muito feliz que o fruto de nosso trabalho mútuo, tenha surgido uma bela amizade ao qual pretendo manter. Sua dedicação em me fazer enxergar o caminho do aprendizado foi fundamental para o meu amadurecimento.

Ao Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, a quem eu não cansarei de agradecer por seus ensinamentos e dedicação usufruído ao longo desses anos. Considero um exemplo de profissional e sobretudo de ser humano. Sua ideologia e caráter me inspiram até hoje e me fortalecem em busca de meus objetivos. Precisamos de um número maior de pessoas com essas características para o bem não só de uma instituição, mas sobretudo de nossa sociedade. Sua paciência e humildade são louváveis.

À Profa. Dra. Miran Aiko Nakane Matsumoto, com quem eu tive o prazer de trabalhar (aprender) durante todos esses anos. Foi a professora que teve maior influência

em minha prática clínica. Por saber de meus objetivos desde a época da Especialização, me ensinou, me orientou e principalmente me instigou com a finalidade de extrair o máximo de meu esforço em me tornar um profissional melhor a cada dia.

Ao Prof. Dr. Adílson Tomasin, por ser uma pessoa de luz inabalável. Foi o primeiro professor a me proporcionar convicção de minhas atitudes como aluno, me encorajando a seguir sempre em frente.

Ao Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, por seus ensinamentos e conselhos desde a época de especialização. Sempre me mostrando a maneira correta de solucionar as intercorrências profissionais e da vida.

Às Profas. Dras. Catharina Satie Takahashi e Elza Tiemi Sakamoto Hojo, pelo suporte físico do laboratório, onde nada faltou para realização deste trabalho e pelo suporte científico, com anos de conhecimento e dedicação em repassar tal experiência para seus alunos. Agradeço também ao suporte emocional, pelo fato de sempre me sentir seguro e à vontade no laboratório para poder realizar esta pesquisa.

Aos Professores do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, Prof. Dr. Alberto Consolaro, Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Andíara De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Maria Cristina Borsato, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra

Segato, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, por toda organização e dedicação de anos e anos de trabalho, gerando docentes hoje inseridos em várias instituições nacionais.

Aos funcionários do Departamento da Clínica Infantil, Dra. Carolina Torres Mantovani, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Dra. Marília Pacífico Lucisano, Carmo Eurípedes Terra Barreto (in Memoriam), Marco Antônio dos Santos, Fatima Aparecida Jacinto Daniel, Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanela, Benedita Rodrigues Viana, por todo carinho e suporte nesses anos. Muito obrigado!

Aos professores do curso de especialização em ortodontia, Prof. Dr. Ademar Valente (in Memoriam), Profa. Dra. Carla Enoki Itikawa, Profa. Dra. Marcela Cristina Damião Andrucioli, Marcelo Antônio Mestriner, ainda hoje exercem influência direta e indireta em minhas atitudes ortodônticas. Serei eternamente grato.

Aos colegas de turma do mestrado em Odontopediatria Alessandra Parreira Menino, Ana Maria Guerra Costa, Ana Paula Dias Moreno, Guido Marañon Vasques, Letícia Sgarby Pinto, Mariana Trevizan, Mariana Umekita Shirozaki, Thaíse Taira, com quem tive o prazer de compartilhar esses anos de aprendizado. Cada um teve papel importante em minha caminhada. Me sinto um felizardo em ter convívio com colegas com formas variadas de agir e pensar. A oportunidade de refletir e desenvolver novas maneiras de lidar com as diferentes situações que nos deparamos na vida é imensurável.

Às alunas da Pós-Graduação em Odontologia, Carolina Maschietto Pucinelli, Francine Lorencetti, Juliana Arid, Laura Bastos, Nicole Lima, Raquel Morelli e Thaís Xavier, com quem tive o prazer de compartilhar algumas disciplinas e foram importantes na minha formação acadêmica.

Aos meus colegas do Laboratório Ana Paula, Danilo Xavier, Leonardo Franchi e Willian Castillo, obrigado por me acolherem no grupo e estarem sempre dispostos a ajudar. Conhecer cada um de vocês foi uma grande e excelente surpresa. Minhas expectativas em compartilhar conhecimento fora de meu departamento original supriu minhas expectativas, graças ao convívio que tive com vocês.

À Rosemary Alves, secretária do curso de Especialização em Ortodontia, a quem sou suspeito de falar. São anos do mais gratificante convívio, fazendo-me lembrar a relação com meus entes familiares. Muito obrigado por toda a contribuição e disposição desde que cheguei a Ribeirão Preto.

À Nílza Leticia Magalhães, técnica do laboratório do Departamento da Clínica Infantil, resumo de simpatia e simplicidade. Infelizmente só trabalhamos juntos no final de minha pesquisa, mas já conhecia sua pessoa e sabia que seria extremamente gratificante quando tivesse a oportunidade de dividir o mesmo ambiente de trabalho.

Ao Luiz Augusto Costa Junior, técnico do laboratório da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, agradeço por todo o apoio que tive desde os meus primeiros passos em laboratório. Consegui desenvolver a habilidade necessária, muito em função da sua dedicação em solucionar minhas dúvidas e corrigir meus erros.

Ao CNPq, pela bolsa concedida para a realização desta pesquisa.

O referido Projeto foi desenvolvido nos Laboratórios de "Ortodontia", "Histologia" e "Biologia Molecular e Cultura de Células" do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, e no Laboratório de "Citogenética e Mutagênese" da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP.

RESUMO

Cunha AS. **Avaliação *in vivo* dos efeitos genotóxicos e citotóxicos de disjuntores de Haas Sobre Células da Mucosa Bucal, pela análise de micronúcleos.** Ribeirão Preto, 2017. 71p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos/citotóxicos ocasionados por disjuntores de Haas em células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal de pacientes submetidos a tratamento ortodôntico, por meio do ensaio de micronúcleos. Participaram do estudo 22 pacientes entre 06 a 12 anos de idade, de ambos os gêneros, que necessitaram de disjuntores de Haas para correção de mordida cruzada posterior. Foi efetuada a coleta de células epiteliais da mucosa da bochecha, por meio de raspagem suave com escova científica. As células foram coletadas antes (T0), um mês após a instalação do aparelho (T1) e 3 meses após o travamento dos disjuntores (T2). As células foram processadas para obtenção de lâminas, as quais foram coradas com o método de *Feulgen/Fast Green* para quantificação do número de células normais, cariolíticas, picnóticas, brotos nucleares, bi/trinucleadas e com a presença de micronúcleos, em microscopia de luz. Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa com relação à presença de micronúcleos, nos períodos avaliados ($p > 0,05$). Os brotos nucleares sofreram aumento em T1 ($p > 0,05$), com retorno aos níveis baseline em T2. Em relação às outras anormalidades (células cariolíticas, picnóticas e bi/trinucleadas), houve aumento significativo em T1 e T2 ($p < 0,0001$). Concluindo, este estudo demonstrou que os disjuntores de Haas não ocasionaram aumento de micronúcleos em células da mucosa bucal. Entretanto, foram observadas aumento estatisticamente significativo das células cariolíticas, picnóticas e bi/trinucleadas durante o tratamento, sugerindo possíveis efeitos citotóxicos.

Palavras-chave: Expansão Maxilar; Testes para Micronúcleos; Genotoxicidade; Citogenética.

ABSTRACT

Cunha AS. **Genotoxic/cytotoxic in vivo effects of Haas appliance by micronucleus assay in exfoliated mucosal cells.** Ribeirão Preto, 2017. 71p. Dissertação (Mestrado). Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

The aim of the present study was to evaluate the genotoxic and cytotoxic effects caused by Haas appliance through micronuclei assay in buccal mucosa epithelial cells of patients submitted to orthodontic treatment. The study included 22 patients between 06 and 12 years of age, both genders, who required Haas appliance for correction of posterior crossbite. Epithelial cells from the cheek mucosa were collected performed by gentle scraping scientific toothbrush. The cells were collected before (T0), one month after the device was installed (T1) and 3 months after the appliance immobilization (T2). The cells were processed to obtain slides and Feulgen/Fast Green was used as staining method for counting the number of normal, karyolytic, pyknotic, nuclear buds, binucleated and micronucleus cells under light microscopy. The cellular abnormalities were evaluated with the parametric tests for comparison of the means by ANOVA test followed by the Tukey post-test. The significance level was 5%. The results of this study showed that there were no statistically significant results for the micronuclei in the evaluated periods ($p > 0,05$). Nuclear buds increased in T1 ($p < 0,05$), returning to baseline levels in T2. In relation to the other abnormalities (karyolytic, pyknotic and bi/trinucleated cells), there were a significant increase in T1 and T2 ($p < 0.0001$). In conclusion, this study demonstrated that Haas appliance did not cause micronuclei increase in cells of buccal mucosa. However, a statistically significant increase in karyolytic, pyknotic and bi/trinucleated cells were observed during treatment, suggesting possible cytotoxic effects.

Keywords: Palatal Expansion Technique; Micronucleus Tests; Genotoxicity; Cytogenetic

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. PROPOSIÇÃO.....	29
3. MATERIAL E MÉTODO.....	33
3.1 Aspectos éticos	35
3.1.1 Seleção dos pacientes.....	35
3.1.2 Critérios de inclusão	35
3.1.3 Critérios de Exclusão	35
3.2 Tratamento ortodôntico	36
3.3 Coleta das células da mucosa bucal.....	40
3.4 Técnica de processamento e coloração das amostras	41
3.5 Análise do Teste de micronúcleos (versão <i>Cytome</i>)	43
3.6 Análise Estatística.....	46
4. RESULTADOS	47
6. CONCLUSÃO	59
REFRÊNCIAS.....	63
ANEXO	69

1. Introdução

---

1. INTRODUÇÃO

A mordida cruzada posterior é uma maloclusão definida como a posição reversa no plano transversal de um ou mais dentes maxilares (caninos, pré-molares e molares), com seus respectivos dentes antagonistas mandibulares, quando os arcos estão em relação cêntrica (Haas, 1961), podendo ser uni ou bi-lateral e classificada como dentária, óssea ou muscular (Haas, 1961; 1970; Pereira *et al.*, 2017). Diferentes fatores estão provavelmente relacionados com a mordida cruzada posterior, incluindo respiração bucal, hábitos bucais deletérios, anomalias ósseas congênitas, discrepância dental negativa e do tamanho do arco, fissuras palatinas, perda precoce ou retenção prolongada de dentes decíduos, migração do germe do dente permanente e interferências oclusais (Graber, 1972; Pereira *et al.*, 2017).

A Expansão Rápida da Maxila (ERM) é um método utilizado para a correção transversal da mordida cruzada posterior, por meio da abertura da sutura palatina mediana durante o período de crescimento esquelético, aplicando forças pesadas com aparatos rígidos e fixos para adquirir máxima resposta esquelética e mínimo movimento dentário (Haas, 1961; 1970; Weissheimer *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2017).

Dentre os aparelhos utilizados para ERM, os dento-muco-suportados (disjuntor de Haas) e os dento-suportados (disjuntor de Hyrax) são os mais recomendados na literatura específica (Weissheimer *et al.*, 2011). A principal diferença entre ambos é que, no disjuntor de Haas, é confeccionada uma placa de resina acrílica no aparelho, que permanece próxima ao palato do paciente. A função da placa de acrílico é aumentar a área de ancoragem do aparelho, proporcionando maior resposta do tecido ósseo e evitando possíveis recidivas pós-tratamento (Haas, 1961; 1970). Por outro lado, o disjuntor de Hyrax, por não apresentar o acrílico, facilita a higienização, prevenindo irritações dos tecidos moles decorrentes do acúmulo de resíduos (alimentos e biofilme) entre a mucosa e o acrílico (Biederman, 1968; Weissheimer *et al.*, 2011; Bagatin *et al.*, 2017).

1.1. Biodegração dos componentes dos aparelhos ortodônticos

O meio bucal é particularmente ideal para a ocorrência da biodegradação de metais, devido às suas características químicas, térmicas, microbiológicas e enzimáticas (Kedici *et al.*, 1998). Os disjuntores são confeccionados com acessórios à base de Níquel (Ni) e Cromo (Cr) como parafusos expansores, fios metálicos e bandas metálicas, além da solda de prata, constituída de Prata (Ag), Cobre (Cu) e Zinco (Zn), utilizada para unir fios e bandas (Freitas *et al.*, 2011). A liberação de íons metálicos decorrentes da corrosão dos componentes da aparelhagem fixa pode causar danos à mucosa bucal ou sensibilidade devido à sua toxicidade (Gonçalves *et al.*, 2015). Acessórios ortodônticos fabricados com diferentes ligas metálicas foram avaliados como indutores de alterações genotóxicas, havendo evidências de que metais contendo Ni, Cobalto (Co), Cr e Berílio (Be) aumentam o risco de câncer em humanos (Martín-Cameán *et al.*, 2015).

A resina acrílica utilizada no disjuntor de Haas é constituída de Monômero Metil Metacrilato (MMA), Tereftalato de dimetilo (DMT), Copolímero Metil EtilMetacrilato (PMMA), Peróxido e pigmentos. Além da resina acrílica, os disjuntores necessitam de materiais resinosos para serem fixados aos dentes que servirão de suporte. Tanto os compósitos quanto os cimentos resinosos apresentam bisfenol-A glicidil metacrilato (Bis-GMA), uretano dimetacrilato (UDMA) e trietileno glicol dimetacrilato (TEGDMA) como principais monômeros e co-monômeros em sua constituição (Siqueira Goncalves *et al.*, 2008; Toy *et al.*, 2014). Efeitos mutagênicos/genotóxicos e efeitos citotóxicos vem sendo associados com estes componentes (Lunder e Rogl-Butina, 2000; Schweikl *et al.*, 2001; Toy *et al.*, 2014).

Os estudos envolvendo a biocompatibilidade e citotoxicidade de materiais odontológicos avaliam principalmente componentes como resina acrílica, compósitos, elásticos de látex e não látex e metais (Siqueira Goncalves *et al.*, 2008; De Menezes e Quintão, 2010; Freitas *et al.*, 2011; Maríez-Colomer *et al.*, 2016). A avaliação da citotoxicidade é o primeiro passo para o estudo da biocompatibilidade de materiais, pois refere-se à cascata de eventos moleculares que podem gerar funções celulares alteradas e danos estruturais (Murray *et al.*, 2007; Martín-Cameán *et al.*, 2015). Nesse sentido, o efeito mais perigoso da biodegradação que ocorre após a instalação de aparelhos ortodônticos na cavidade bucal é a possibilidade de gerar danos

genotóxicos ao DNA de células humanas (Martín-Cameán *et al.*, 2015). A genotoxicidade é a capacidade de um agente exercer efeitos deletérios ao material genético da célula, afetando sua integridade. Segundo Montanaro *et al.* (2005), a avaliação das propriedades genotóxicas dos metais utilizados no tratamento ortodôntico é essencial para determinar a segurança no uso desses materiais.

1.2. Ensaios para avaliação da genotoxicidade

Atualmente, existem vários métodos para avaliar o potencial genotóxico de agentes físicos e químicos, tais como Teste de Aberrações Cromossômicas, Troca entre Cromátides Irmãs, Reativação de Células Hospedeiras, Ensaio Cometa, Gamma-H2AX e o Teste de Micronúcleos (MNT) (Tatar *et al.*, 2009; Ağar *et al.*, 2011; Hafez *et al.*, 2011; Öztürk *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2017). Este último, considerado um dos melhores ensaios para avaliação de danos genéticos (Freitas *et al.*, 2011), mensura danos cromossômicos produzidos por agentes clastogênicos (quebras nos cromossomos) ou aneugênicos (danos no fuso mitótico) (Gonçalves *et al.*, 2015). Os micronúcleos (MN) são massas de cromatina citoplasmáticas aparentando forma de pequenos núcleos. São originários de quebras cromossômicas por fragmentos ou filamentos inteiros acêntricos (fora do centro). Estas quebras não são incorporadas ao núcleo principal celular durante a anáfase da divisão celular (Fenech *et al.*, 2011).

O MNT pode ser realizado utilizando variadas técnicas, destacando-se a cultura de células (Gonçalves *et al.*, 2014) e a citologia esfoliativa (Bonassi *et al.*, 2011; Martín-Cameán *et al.*, 2015). A utilização da citologia esfoliativa a partir de células da mucosa é relativamente simples e de baixo custo, quando comparada à cultura de células, o que permite a realização de estudos em âmbito populacional (Ayyad *et al.*, 2006).

A versão *Cytome* é um método mais robusto do MNT. Como na versão original, produz resultados confiáveis dos danos ao DNA em nível cromossômico, (Gonçalves *et al.*, 2015). Alterações nucleares degenerativas são avaliadas nessa versão, incluindo células binucleadas, brotos nucleares, cromatina condensada, cariorréxe, picnose e cariólise. A sensibilidade do MNT é aumentada quando estas

anomalias são avaliadas conjuntamente com a frequência de MNs (Bonassi *et al.*, 2007; Bonassi *et al.*, 2011; Öztürk *et al.*, 2012).

Poucos estudos avaliaram a genotoxicidade dos aparelhos ortodônticos, sendo a maioria referente a aparelhos corretivos (bráquetes, bandas, fios e compósitos) (Westphalen *et al.*, 2008; Hafez *et al.*, 2011; Öztürk *et al.*, 2012; Toy *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2015). Até o momento, os efeitos genotóxicos e citotóxicos dos disjuntores de Haas sobre células esfoliadas da mucosa bucal não foi investigado. Considerando a relevância clínica do assunto exposto, torna-se importante avaliar a influência local dos materiais utilizados para a confecção dos disjuntores de Haas, sobre os tecidos circundantes.

2. Proposição

---

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, os efeitos genotóxicos e citotóxicos de disjuntores de Haas em células epiteliais esfoliadas da mucosa bucal de pacientes submetidos ao tratamento ortodôntico, por meio do teste de micronúcleos (versão *Cytome*).

3. Material e Método

---

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (CAAE: 58659616.0.0000.5419) (Anexo A). A participação dos pacientes no estudo ocorreu de forma voluntária, com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Termo de Assentimento, por parte do participante ou responsável pelo paciente.

3.1.1 Seleção dos pacientes

Previamente ao estudo, foi adotado o alfa de 5% e o poder de 80% para o cálculo amostral. De acordo com os resultados apresentados por Gonçalves et al. (2015), a amostra estimada foi de 20 disjuntores. Assim, foram selecionados 28 pacientes que iniciaram tratamento ortodôntico na clínica de Graduação e Especialização em Ortodontia na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

3.1.2 Critérios de inclusão

- Ambos os gêneros.
- 06 a 12 anos de idade.
- Sem distinção de etnia.
- Bom estado geral de saúde, verificado após anamnese detalhada.
- Presença de alterações transversais da maxila (mordida cruzada posterior).
- Ausência de restaurações ou próteses dentárias.
- Ausência de tratamento ortodôntico anterior.

3.1.3 Critérios de Exclusão

- Histórico de hipersensibilidade a metais (níquel e cromo), verificada após anamnese detalhada.
- Pacientes sindrômicos e portadores de problemas sistêmicos.

- Pacientes diabéticos, anêmicos e com diagnóstico de câncer.
- Pacientes portadores de lesões de cárie com cavitação.
- Pacientes com doença periodontal.
- Pacientes portadores de doenças relacionadas a danos genéticos.
- Histórico de antibióticos e/ou bochechos com soluções antimicrobianas, no período de 3 meses previamente ao início do estudo.

3.2 Tratamento ortodôntico

O disjuntor de Haas foi utilizado para expansão rápida da maxila. Todos os princípios de confecção, fixação e ativação do aparelho foram seguidos, de acordo com as orientações preconizadas por Haas (1961), com adaptações para a dentição mista (Bagatin *et al.*, 2017). O aparelho foi confeccionado com bandas de aço inoxidável (Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) nos 1ºs molares permanentes, ligadas a fios de aço inoxidável de 0,9 mm de espessura (Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil), contornando as faces vestibular e palatina dos caninos, molares decíduos e primeiro molar permanente. Os fios e bandas foram soldados entre si por fluxo e solda de prata (Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) aquecida com micro-maçarico (GB 2001, Blazer, Farmingdale, NY, USA), por vestibular e palatina.

Para confecção da placa de acrílico, foi utilizada resina acrílica auto-polimerizável Ortoclass (Artigos Odontológicos Clássicos Ltda., São Paulo, Brasil) unindo as estruturas metálicas dos lados direito e esquerdo, com parafuso expensor de 11 mm (Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil), centralizado transversalmente ao nível da sutura palatina mediana e ao nível dos segundos molares decíduos, no sentido ântero-posterior. Realizou-se o recorte e o acabamento do aparelho, utilizando broca Maxicut (Dental Future Systems, Ländenstrabe, Germany), seguida de broca de tungstênio (Artigos Odontológicos Clássicos Ltda., São Paulo, Brasil), em motor com peça de mão para baixa rotação (Dabi Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Para acabamento e regularização da superfície, foram utilizadas lixas de madeira nº 180 e lixas d'água nº 400 e 600, montadas em mandris e motor de baixa rotação com peça de mão. O polimento foi realizado com escova de pêlos em forma de roda, montada em torno para polimento, utilizando-se baixa velocidade e pasta de pedra-

pomes em pó e água, seguida de uma roda de tecido. O aparelho foi lavado com água e sabão e o acabamento final foi realizado em polidora química (PQ 9000 Termotron, Piracicaba, SP, Brasil).

Após acabamento e polimento, o aparelho foi instalado com cimento de ionômero de vidro Ultra Band-Lok (Reliance Ortho Prod., Itasca, IL, USA) e os fios ortodônticos foram fixados nos caninos ou molares decíduos com resina composta universal Filtek^{TM} Z350 XT (3M ESPE, Campinas, SP, Brasil) às faces vestibulares e palatinas. Os materiais utilizados para confecção, assim como os passos para a confecção, instalação e contenção pós-tratamento (Placa de Hawley) dos disjuntores de Haas estão apresentados na tabela 1 e nas figuras 1, 2 e 3.

Tabela 1- Componentes utilizados nos disjuntores.

Material	Composição	Fabricante
Bandas de aço inoxidável	Níquel e Cromo	Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil
Fios de aço inoxidável	Níquel e Cromo	Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil
Parafuso expansor	Níquel e Cromo	Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil
Solda de prata	Prata, Cobre e Zinco	Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil
Resina acrílica - pó	Polimetilmetacrilato, Peróxido de Benzoíla e Pigmentos	Artigos Odontológicos Clássicos Ltda., São Paulo, Brasil
Resina acrílica - líquido	Metil Metacrilato e DMT	
Cimento resinoso	Bis-GMA, Fibra de Vidro, Sílica Amorfa e Fluoreto de Sódio	Reliance Orthodontic Products, Inc., Itasca, IL, USA
Compósito	Bis-GMA, UDMA, TEGDMA e Bis-EMA	Filtek ^{TM} Z350 XT (3M ESPE, Campinas, SP, Brasil)
Resina flow	Bis-GMA, Dimetacrilato, Boro-Alumínio Silicato de Vidro, Sílica Sintética, Pigmentos	DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Figura 1- Confecção do aparelho disjuntor de Haas.

Figura 2 - Aparelho Disjuntor de Haas instalado. **A.** Aspecto intra-bucal frontal; **B.** Aspecto intra-bucal oclusal; e **C e D.** Aspecto intra-bucal lateral.

Previamente à instalação do aparelho, foi realizada tomada radiográfica oclusal. Após cimentação e fixação, o parafuso foi ativado seguindo as recomendações de Haas (1961). Primeiramente, quatro ativações ($\frac{1}{4}$ de volta) foram realizadas em intervalos de 15 minutos até completar 1,0 mm de expansão (uma volta completa) no dia da instalação. Nos dias seguintes, o responsável pelo paciente foi instruído a realizar $\frac{1}{4}$ de volta no período da manhã e $\frac{1}{4}$ de volta no período da noite, em intervalos de 12 horas. O controle clínico do paciente foi realizado semanalmente, até a obtenção da correção da mordida cruzada posterior, que ocorreu aproximadamente após 20 dias.

A ativação foi interrompida após comprovação da separação da sutura palatina mediana, visualizada após tomada de radiografia oclusal e, clinicamente, pela presença de diastema entre os incisivos centrais superiores e quando, no mínimo, as vertentes oclusais vestibulares das cúspides palatinas dos molares superiores estivessem em contato com as vertentes oclusais linguais das cúspides vestibulares dos molares inferiores. Após sobre-correção, o parafuso foi imobilizado com fio de amarrilho 0,012" (Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) e resina composta fluida Natural Flow (DFL, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

O disjuntor foi mantido na cavidade bucal do paciente, sem ativação, por um período mínimo de 3 meses após imobilização do aparelho, para reorganização das fibras e neoformação óssea na sutura palatina mediana (Haas, 1961). Ao final deste período, foi realizada tomada radiográfica oclusal para constatação da formação óssea na sutura palatina mediana, sendo o disjuntor removido. Em seguida, um aparelho de contenção removível foi instalado, composto por placa de resina autopolimerizável (Artigos Odontológicos Clássicos Ltda., São Paulo, Brasi), grampos tipo Adams ancorados nos molares e arco labial confeccionados de fios de aço inoxidável com 0,7 mm de espessura (Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil).

Figura 3 - Aparelho de contenção (Placa de Hawley). **A.** Aspecto intra-bucal frontal; **B.** Aspecto intra-bucal oclusal; e **C e D.** Aspecto intra-bucal lateral.

3.3 Coleta das células da mucosa bucal

A coleta das células da mucosa da bochecha foi realizada em três etapas: antes do tratamento (T0; baseline), após um mês (T1) e três meses após estabilização do aparelho (T2), utilizando escova dental macia (Escova Dental Científica; FORP-USP). Os participantes foram instruídos a bochechar soro fisiológico duas vezes durante 1 minuto antes da coleta, para remoção de células bucais descamadas. Em seguida, as células foram coletadas da região central dos lados direito e esquerdo da bochecha, por meio de raspagem suave com movimentos circulares de dentro para fora, durante 30 segundos (em média 20 rotações), para permitir a coleta homogênea das células do epitélio escamoso estratificado bucal. O material coletado foi transferido para tubos de polietileno de 15mL tipo Falcon (Falcon, LMP, Kasui, China), não pirogênicos, livres de DNA, RNA, DNase e RNase e toxinas, devidamente identificados, contendo 5mL de soro fisiológico. Os tubos foram mantidos em bolsas térmicas contendo gelo (aproximadamente 4°C) sendo, em seguida, transportados imediatamente para o Laboratório de "Citogenética e Mutagenese" da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, para processamento das amostras (Figura 4).

Figura 4 - Coleta das células da mucosa bucal.

3.4 Técnica de processamento e coloração das amostras

O teste de micronúcleos versão *Cytome* foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Tolbert et al. (1992) e Thomas et al. (2009). O processamento das amostras iniciou-se pela centrifugação dos tubos contendo as amostras a 1000 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e descartado sendo, em seguida, acrescentados 5mL de soro fisiológico ao *pellet*, para ressuspensão da amostra. Essa etapa de centrifugação foi realizada três vezes. Posteriormente, a solução fixadora (metanol/ácido acético 3:1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), contendo cinco gotas de Dimetil Sulfóxido (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi acrescentada. A suspensão foi agitada manualmente e novamente centrifugada, sendo o sobrenadante descartado. Esta etapa foi repetida duas vezes. Após nova etapa de ressuspensão, parte do sobrenadante foi retirada e descartada, deixando aproximadamente duas vezes o volume do sedimento de células. Após homogeneização, foram gotejadas (3 a 4 gotas) da suspensão em lâminas limpas e secas (Knittel Glass, Starfrost, Germany). As lâminas foram mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 24 horas, para secagem (Figura 5).

Figura 5 - Processamento das amostras.

Para a coloração das amostras (Figura 6), o método de *Feugen/Fast Green* foi empregado. Primeiramente, as lâminas foram inseridas em cubetas contendo ácido hidrocloreídrico (HCl 5N, Labsynth-Diadema, SP, Brazil) por 20 minutos, e lavadas 3 vezes com água Milli-Q. As lâminas foram introduzidas, em outra cubeta envoltas em papel alumínio com o reativo de Schiff [1g de fucsina básica, 200mL de água destilada, 300mL de HCl 1N, 3g de metabisulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) e 0,5g de carbono descolorado], o qual foi mantido por 90 minutos, com agitação a cada 30 minutos. Decorrido esse período, foi acrescentada água destilada, por 10 minutos. As lâminas foram retiradas e secas à temperatura ambiente sendo, em seguida, contra-coradas com *Fast green* a 3% (95% etanol e 0,25g *Fast Green* FCF - Merck Darmstadt, Germany), diluído em metanol a 100% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para, posteriormente, serem analisadas microscopicamente. As células foram analisadas em microscópio óptico (microscópio binocular óptico, Carl Zeiss, Göttingen, Germany), com aumento de 400x. Para cada paciente foram confeccionadas duas lâminas.

Figura 6 - Método de coloração das amostras.

3.5 Análise do Teste de micronúcleos (versão *Cytome*)

Um único avaliador (A.C.S.) realizou a análise (duplo-cego) das lâminas, onde foram quantificadas 1000 células para caracterização das anormalidades celulares: células com danos ao DNA (micronúcleos e brotos nucleares), morte celular (cariólise e picnose) e defeitos citocinéticos (células binucleadas e trinucleadas). Para calibração do avaliador, pelo menos uma lâmina de cada período (T0, T1 e T2) foi analisada duas vezes pelo mesmo avaliador, em comparação a outro avaliador experiente (W.O.C.).

Os critérios de seleção das células para a contagem dos micronúcleos e das anormalidades celulares seguiram as recomendações descritas por Thomas et al. (2009), levando em consideração a atualização realizada pelos projetos de *HUMN* e *HUMNxl* (www.humn.org), onde foram acrescentados danos citogenéticos e outras anormalidades nucleares celulares ao MNT convencional. Foram considerados micronúcleos as estruturas que apresentaram um halo circundante sugestivo de uma

membrana, com menos de 1/3-1/6 do diâmetro do núcleo com intensidade de coloração semelhante ao núcleo, no mesmo plano focal e com ausência de sobreposições ou pontes nucleares. Células picnóticas com MN não foram consideradas para a contagem de MN, afim de evitar confusão com corpos apoptóticos de desintegração nuclear.

Como controle, foi efetuada a quantificação das células basais, que são células encontradas no epitélio da mucosa bucal. As características de cada célula analisada estão apresentadas na Tabela 2. A figura 7 (fluxograma) resume a metodologia empregada no presente estudo, para processamento das amostras, obtenção e análise das lâminas.

Tabela 2 - Descrição das células avaliadas.

Tipos	Descrição	Características
Células normais basais	Células encontradas na camada basal do epitélio.	São as menores células dentre as células esfoliadas bucais.
Picnose	Células com condensação irreversível de cromatina nuclear em processo de apoptose.	Núcleo pequeno (encolhido) em comparação às células normais.
Cariólise	Estágio terminal de necrose e morte celular.	Resposta negativa nuclear à coloração de <i>Feulgen</i> . Célula com ausência de núcleo (<i>ghost-like</i>).
Células Bi(tri)nucleadas	Células relacionadas à falha na citocinese e possível atraso na divisão celular. Provavelmente não são relacionadas a alterações de DNA	Dois ou mais núcleos principais de igual tamanho, intensidade e textura na mesma célula.
Brotos nucleares	Processo de eliminação de material nuclear, pelo reparo de DNA ou DNA amplificado. Podem ser precursores dos MNs	Estreita constrição de parte do núcleo principal originando um broto de material nuclear.
Micronúcleos	Estruturas constituídas de material cromatínico contido por um envoltório nuclear e menores que o núcleo principal.	Apresentam-se de mesma forma, textura e com tamanho entre 1/3 e 1/6 do núcleo principal.

Figura 7 - Fluxograma dos procedimentos metodológicos.

3.6 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando o software Graphpad Prism 7.0 para Mac (Graphpad Software Inc. USA), por meio do teste ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

4. Resultados

---

4. RESULTADOS

A figura 8 ilustra imagens representativas do aspecto de células da mucosa bucal normais e de células com anormalidades.

Figura 8 - A e B. Células Basais Normais; **C.** Cariólise; **D.** Picnoses; **E.** Célula Bi-nucleada; **F.** Célula Tri-nucleada; **G.** Broto nuclear; **H.** Célula com um micronúcleo; **I.** Célula com dois micronúcleos.

A tabela 3 apresenta a caracterização dos pacientes, sendo 60,7% (17 pacientes) do sexo feminino e 39,3% (11 pacientes) do sexo masculino. A idade média dos pacientes foi de 9 anos e 3 meses (DP 18,05 meses).

Tabela 3 - Características da amostra.

Pacientes (n=28)	
Gênero (%)	
Masculino	39,3
Feminino	60,7
Ano (meses)	
Média (DP)	9a 3m (18,05)
Variação	82-143

DP = Desvio Padrão

Os resultados do MNT (danos genotóxicos e citotóxicos) nos diferentes períodos de avaliação (T1, T2 e T3) estão apresentados na Tabela 4 e na figura 9.

Tabela 4. Resultados do Teste de Micronúcleos, evidenciando a comparação entre os períodos de avaliação (T0=antes do tratamento; T1=após um mês; e T2, três meses após estabilização do aparelho).

Quantidade/1000 células	Períodos avaliados			p-valor
	T0 Média (DP)	T1 Média (DP)	T2 Média (DP)	
Células normais basais	961,40 (35,05)A	959,40 (9,10)A	930,00 (13,14)B	< 0,0001
Picnose	1,17 (1,13)A	3,50 (2,18)B	6,96 (4,52)C	< 0,0001
Cariólise	11,46 (3,09)A	16,39 (5,72)B	27,46 (8,05)C	< 0,0001
Células bi(tri)nucleadas	10,07 (3,72)A	15,39 (4,81)B	31,89 (7,01)C	< 0,0001
Broto nuclear	0,71 (1,21)A	3,50 (2,23)B	1,71 (1,21)A	< 0,0001
Micronúcleo	0,85 (0,84)A	1,71 (1,56)A	1,75 (1,32)A	> 0,05

DP = Desvio Padrão

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os períodos.

Figura 9 - Gráficos dos resultados obtidos nos diferentes períodos de avaliação (T0=antes do tratamento; T1=após um mês; e T2, três meses após estabilização do aparelho).

Com relação às células normais, não foi observada diferença significativa quando comparou-se os períodos T0 e T1 ($p>0,05$). Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$) no último período da coleta, com diminuição na quantidade de células.

Com relação aos Micronúcleos, não ocorreu aumento significativo em nenhum dos períodos avaliados ($p>0,05$), embora tenha sido observada uma tendência de aumento quantitativo em T1 e T2.

Observou-se aumento estatisticamente significativo ($p<0,05$) na quantidade de células picnóticas, cariolíticas e bi/trinucleadas, nos períodos T1 e T2, em comparação a T0 (baseline).

As células bi/trinucleadas foram o tipo de alteração que sofreu o maior aumento numérico dentre todas as anormalidades avaliadas, seguido das células cariolíticas e das células picnóticas.

Ao contrário das outras células, o aumento das células com broto nuclear foi maior no primeiro mês de tratamento ($p<0,05$), porém houve diminuição dos valores em T2. Comparando T0 e T2, o aumento dessa alteração não foi estatisticamente significativo ($p>0,05$).

5. Discussão

---

5. Discussão

Para avaliação dos efeitos genotóxicos, o uso de um método de coloração específico de DNA é essencial, com intuito de evitar resultados falso-positivos. Elementos não nucleares, bactérias e grânulos de queratohialina podem ser confundidos e contabilizados como MN, quando métodos não-específicos de DNA são utilizados (Bolognesi *et al.*, 2015). Embora diferentes métodos de coloração sejam utilizados para avaliação da genotoxicidade em células da mucosa bucal, o método de Feulgen/Fast Green, apesar de mais trabalhoso, é considerado o mais sensível para a mensuração de danos cromossômicos (Gonçalves *et al.*, 2015).

Especificamente na área da Ortodontia, vários estudos avaliaram a genotoxicidade de aparelhos corretivos, contendo bráquetes, bandas, fios e compósitos, em células esfoliadas da cavidade bucal, empregando o MNT (Westphalen *et al.*, 2008; Natarajan *et al.*, 2011; Heravi *et al.*, 2013; Toy *et al.*, 2014; Francis *et al.*, 2017). Deve ser ressaltado que esses estudos utilizaram diferentes métodos de coloração, incluindo Papanicolaou (Francis *et al.*, 2017), Giemsa (Heravi *et al.*, 2013) e Laranja de acridine (Toy *et al.*, 2014). Além disso, os períodos de avaliação e os dispositivos ortodônticos utilizados não foram padronizados. Possivelmente, estes fatores geraram resultados conflitantes, sendo relatado aumento da média dos valores de MN por alguns autores (Westphalen *et al.*, 2008; Natarajan *et al.*, 2011; Francis *et al.*, 2017), enquanto outros não verificaram diferenças (Angelier *et al.*, 2011; Heravi *et al.*, 2013; Toy *et al.*, 2014).

Utilizando o método de Feulgen/Fast Green, no presente estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa na média dos valores de MN nos diferentes períodos de avaliação, durante o tratamento ortodôntico com disjuntores de Haas, embora tenha ocorrido uma tendência ao aumento quantitativo de MNs. Esses resultados são similares aos obtidos por Gonçalves *et al.* (2015), que utilizaram o mesmo método de coloração empregado no presente estudo, para avaliar o efeito genotóxico de disjuntores de Hyrax. Esses autores relataram uma tendência ao aumento da média dos valores de MN no primeiro mês de tratamento. Seis meses após, os valores tenderam a diminuir e, após um ano, curiosamente tenderam a sofrer novo aumento, atingindo valores similares aos observados no primeiro mês. À

semelhança do que ocorreu no presente estudo, esses autores não observaram diferença significativa entre os períodos, evidenciando que a significância clínica e biológica dessas alterações permanece incerta.

Vale a pena ressaltar que, de acordo com Thomas *et al.* (2009), pacientes mais jovens apresentam menores índices de MN, o que justifica a necessidade da realização de estudos adicionais, avaliando as alterações genotóxicas, em pacientes com idades mais avançadas. No presente estudo, a idade dos pacientes foi homogênea, sendo a amostra composta por crianças entre 6-12 anos, o que possivelmente justifica a ausência de danos genotóxicos pelo MNT. Pela idade dos participantes, supõe-se que não houve ingestão de nicotina e/ou bebidas alcoólicas.

No presente estudo, 3 avaliações (T0, T1 e T2) foram realizadas em cada paciente, ou seja, cada paciente foi considerado seu próprio controle. Assim, fatores relacionados à dieta alimentar e exposição a ambientes radioativos, supostamente, foram controlados. Portanto, qualquer efeito de outros agentes genotóxicos/citotóxicos deveria estar presente na primeira coleta de células (T0), e quaisquer diferenças entre as avaliações subsequentes podem ser atribuídas aos possíveis danos do disjuntor de Haas, em contato com a mucosa bucal.

Com relação à citotoxicidade, no presente estudo os valores encontrados para as células picnóticas e cariolíticas aumentaram estatisticamente em T1 e T2. Resultados semelhantes foram observados por Gonçalves *et al.* (2015), que avaliaram disjuntores de Hyrax. Segundo esses autores, a causa desse aumento estaria relacionada com os componentes da solda de prata, em contato com a cavidade bucal. O calor requerido durante a soldagem certamente aumenta a taxa de corrosão do dispositivo (Gonçalves *et al.*, 2015). Além disso, o cobre presente na liga de prata promove maiores liberações de íons metálicos tóxicos, como o níquel, na região de solda (Wataha *et al.*, 2000). Segundo Ramirez e Saldanha (2002), o aumento de células cariolíticas representa uma resposta adaptativa a traumas no epitélio bucal e está relacionado com células necróticas e danos citotóxicos. Esta anomalia é normal na região da mucosa da bochecha, especialmente em decorrência da mastigação. Entretanto, a ação constante de agentes mutagênicos como álcool, tabaco, radioterapia e, possivelmente, aparelhos ortodônticos, poderia aumentar o índice de morte celular, caracterizado pelo aumento significativo desta anomalia

celular, como pôde ser observado no presente estudo, durante o uso de disjuntores de Haas. Vale a pena ressaltar que, segundo alguns autores, danos citotóxicos podem ocasionar a morte de células portadoras de MNs, diminuindo a observação e quantificação dessa anormalidade genotóxica (Angelier *et al.*, 2010; Lorenzoni *et al.*, 2012), o que pode possivelmente explicar a ausência de aumento estatisticamente significativo na contagem de MNs no presente trabalho (com uso de disjuntor de Haas) e no trabalho de Gonçalves *et al.*, (2015), que avaliou disjuntores de Hyrax.

A ocorrência de células binucleadas foi a anormalidade que apresentou os maiores valores no presente estudo, com média superior a 30/1000 células, em T2. Estas células são indicativas de falhas na citocinese, associada a doenças neurodegenerativas e células cancerígenas, sugerindo que uma alta proporção dessas células pode estar associada com a taxa de risco a essas lesões (Thomas *et al.*, 2007).

Adicionalmente, o presente estudo demonstrou aumento significativo das células com formação de brotos nucleares em T1. Entretanto, em T2 a média dos valores tornaram-se similares aos encontrados antes da inserção do disjuntor de Haas. Gonçalves *et al.* (2015) observaram padrão similar após 6 meses de tratamento com o disjuntor de Hyrax. A formação de brotos nucleares pode ser um possível biomarcador diretamente relacionado ao dano do genoma por quebras de DNA relacionado à liberação de íons metálicos (Fenech *et al.*, 2011) sendo, possivelmente, um antecessor da formação de Mns (Mitchell e Norman, 1987).

O disjuntor de Haas, aparelho ortodôntico avaliado no presente estudo, é composto por uma placa de resina acrílica, materiais metálicos soldados por solda de prata, fios aderidos ao sistema resinoso e bandas cimentadas com cimento resinoso, o que pode levar à hipótese de que esses componentes, individualmente ou em combinação, causam danos celulares quando o aparelho permanece em contato com a mucosa bucal. Para comprovação da citotoxicidade de cada componente presente no aparelho disjuntor de Haas, são necessários mais estudos.

Outro fator importante é que, em comparação com o tratamento ortodôntico corretivo, os disjuntores de Haas permanecem em contato com a cavidade bucal por períodos mais curtos. Embora no presente trabalho tenham sido observados efeitos citotóxicos em células esfoliadas da cavidade bucal (cerca de três meses), os estudos

que avaliaram outros dispositivos ortodônticos por períodos de tempo mais longos (entre 6 a 9 meses) (Öztürk et al., 2012; Toy et al., 2014; Gonçalves et al., 2015) evidenciaram que a citotoxicidade é maior nos períodos iniciais. Há evidências de rápida liberação de monômeros residuais, nas primeiras 24 horas, a partir de resinas ortodônticas, sendo os íons metálicos liberados apenas nos estágios iniciais do tratamento ortodôntico (Martín-Cameán et al., 2015).

Além disso, as células epiteliais da mucosa bucal regeneram-se rapidamente, geralmente a cada 7 a 14 dias (Öztürk et al., 2012). Em outras palavras, os efeitos genotóxicos/citotóxicos dos dispositivos ortodônticos podem não permanecer a longo prazo, sendo reversíveis (Baraba et al., 2011; Martín-Cameán et al., 2015). No entanto, os efeitos citotóxicos e genotóxicos iniciais devem ser considerados em pacientes geneticamente predispostos a danos genotóxicos adicionais, dependendo do estilo de vida de cada indivíduo (Angelieri et al., 2011).

Outro fator a ser considerado é que os disjuntores de Haas podem, clinicamente, ser associados ao uso de DATs (dispositivos de ancoragem temporária), arcos linguais ou aparelhagem fixa corretiva, que podem permanecer em contato com as células da cavidade bucal por meses ou até por anos (Ortiz et al., 2011; Martín-Cameán et al., 2015; Choi et al., 2017). A exposição repetida a agentes citotóxicos/genotóxicos pode resultar em lesão celular crônica, proliferação celular compensatória, hiperplasia e desenvolvimento de tumores (Lorenzoni et al., 2012).

No presente estudo, observou-se que os disjuntores de Haas, embora não tenham ocasionado aumento de micronúcleos nas células da mucosa bucal, aumentaram a ocorrência de células cariolíticas, picnóticas e bi/trinucleadas, o que sugere possíveis efeitos citotóxicos. A fim de reduzir esses efeitos indesejáveis, as pesquisas na área da Ortodontia deveriam focar, também, no desenvolvimento de novos materiais, menos susceptíveis à biodegradação e com menor liberação de componentes prejudiciais. Além disso, sugere-se a realização de estudos adicionais, com inclusão de pacientes com maior faixa etária avaliando, inclusive, se essas alterações citotóxicas e genotóxicas se mantêm, após a remoção dos aparelhos ortodônticos.

6. Conclusão

---

6. CONCLUSÃO

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, concluiu-se que os disjuntores de Haas não ocasionaram aumento de micronúcleos em células da mucosa bucal. Entretanto, células cariolíticas, picnóticas e bi/trinucleadas foram observadas durante o tratamento, sugerindo possíveis efeitos citotóxicos.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Açar G, Aslan A, Sarioğlu EK, Alpsoy L, Çeker S. Protective activity of the methanol extract of *Usnea longissima* against oxidative damage and genotoxicity caused by aflatoxin B₁ in vitro. *Turk J Med Sci*. 2011;41(6):1043-9.
2. 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(4):e399-e404.
3. Angelieri F, Carlin V, Saez D, Pozzi R, Ribeiro DA. Mutagenicity and cytotoxicity assessment in patients undergoing orthodontic radiographs. *Dentomaxillofac Rad*. 2010;39(7):437-40.
4. Ayyad SBA, Israel E, El-Setouhy M, Nasr GR, Mohamed MK, Loffredo CA. Evaluation of Papanicolaou stain for studying micronuclei in buccal cells under field conditions. *Acta cytol*. 2006;50(4):398-402.
5. Bagatin CR, Andruccioli MCD, Ferreira JTL, Matsumoto MAN, da Silva RAB, da Silva LAB. Biofilm formation in Haas palatal expanders with and without use of an antimicrobial agent: an in situ study. *Microsc res tech*. 2017;80(5):471-7.
6. Baraba A, Želježić D, Kopjar N, Mladinić M, Anić I, Miletić I. Evaluation of cytotoxic and genotoxic effects of two resin-based root-canal sealers and their components on human leucocytes in vitro. *Int Endod J*. 2011;44(7):652-61.
7. Biederman W. A hygienic appliance for rapid expansion. *J Pract Orthod*. 1968;2(2):67-70.
8. Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;766:20-31.
9. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, et al. 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 Rev Mutat Res*. 2011;728(3):88-97.
10. 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(3):625-31.
11. Choi HW, Park YS, Chung SH, Jung MH, Moon W, Rhee SH. Comparison of mechanical and biological properties of zirconia and titanium alloy orthodontic micro-implants. *Korean J Orthod*. 2017;47(4):229-37.
12. De Menezes LM, Quintão CCA, editors. The release of ions from metallic orthodontic appliances. *Semin Orthod*; 2010: Elsevier.

13. Dindaroğlu F, Doğan S. Evaluation and comparison of root resorption between tooth-borne and tooth-tissue borne rapid maxillary expansion appliances: A CBCT study. *Angle Orthod.* 2015;86(1):46-52.
14. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan A, Surralles J, Crott J, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011;26(1):125-32.
15. Francis P, Thomas M, Antony V, Shalooob M, Hassan KJ, Roshan G. Cytomorphometric analysis on the effects of components of orthodontic appliances on the epithelial cells of the buccal mucosa. *J Int Soc Prevent Communit Dent.* 2017;7(3):142.
16. Freitas MP, Oshima HM, Menezes LM. Release of toxic ions from silver solder used in orthodontics: an in-situ evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(2):177-81.
17. Garib DG, Henriques JFC, Janson G, de Freitas MR, Fernandes AY. Periodontal effects of rapid maxillary expansion with tooth-tissue-borne and tooth-borne expanders: a computed tomography evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129(6):749-58.
18. Garrett BJ, Caruso JM, Rungcharassaeng K, Farrage JR, Kim JS, Taylor GD. Skeletal effects to the maxilla after rapid maxillary expansion assessed with cone-beam computed tomography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;134(1):8. e1-8. e11.
19. Gonçalves TS, de Menezes LM, Trindade C, da Silva Machado M, Thomas P, Fenech M, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without silver soldered joints. *Mutat Res-Gen Tox En.* 2014;762:1-8.
20. Gonçalves TS, Menezes LM, Trindade C, Thomas P, Fenechc M, Henriques JA. In vivo evaluation of the genotoxic effects of Hyrax auxiliary orthodontic appliances containing silver-soldered joints. *Mutat Res-Genet Tox En.* 2015;791:25-9.
21. Graber T. *Orthodontics: principles and practice* (ed. 3) WB Saunders Company. Philadelphia; 1972.
22. Haas AJ. Palatal expansion: just the beginning of dentofacial orthopedics. *Amer J Orthodontics.* 1970;57(3):219-55.
23. Haas AJ. Rapid expansion of the maxillary dental arch and nasal cavity by opening the midpalatal suture. *Angle Orthod.* 1961;31(2):73-90.
24. Hafez HS, Selim EMN, Eid FHK, 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(3):298-308.

25. Heravi F, Abbaszadegan MR, Merati M, Hasanzadeh N, Dadkhah E, Ahrari F. DNA damage in oral mucosa cells of patients with fixed orthodontic appliances. *J denti (Tehran)*. 2013;10(6):494.
26. Kedici S, Aksüt AA, Kılıçarslan MA, Bayramog Lu G, Gökdemir K. Corrosion behaviour of dental metals and alloys in different media. *J Oral Rehabil*. 1998;25(10):800-8.
27. Lorenzoni DC, Fracalossi ACC, Carlin V, Ribeiro DA, Sant'Anna EF. Mutagenicity and cytotoxicity in patients submitted to ionizing radiation: A comparison between cone beam computed tomography and radiographs for orthodontic treatment. *Angle Orthod*. 2012;83(1):104-9.
28. Lunder T, Rogl-Butina M. Chronic urticaria from an acrylic dental prosthesis. *Contact Dermatitis*. 2000;43(4):232-3.
29. Martín-Cameán A, Jos Á, Mellado-García P, Iglesias-Linares A, Solano E, Cameán AM. In vitro and in vivo evidence of the cytotoxic and genotoxic effects of metal ions released by orthodontic appliances: A review. *Environ toxicol phar*. 2015;40(1):86-113.
30. Martínez-Colomer S, Gatón-Hernández P, Romano FL, De Rossi A, Fukada SY, Nelson-Filho P. Latex and nonlatex orthodontic elastics: In vitro and in vivo evaluations of tissue compatibility and surface structure. *Angle Orthod*. 2016;86(2):278-84.
31. Mitchell JC, Norman A. The induction of micronuclei in human lymphocytes by low doses of radiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1987;52(4):527-35.
32. Montanaro L, Cervellati M, Campoccia D, Prati C, Breschi L, Arciola CR. No genotoxicity of a new nickel-free stainless steel. *Int J Artif Organs*, v. 28, n. 1, p. 58-65, 2005. ISSN 0391-3988.
33. Murray PE, García Godoy C, García Godoy F. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? *Med Oral Patol Oral*. 2007;12(3):258-66.
34. Natarajan M, Padmanabhan S, Chitharanjan A, Narasimhan M. Evaluation of the genotoxic effects of fixed appliances on oral mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: an in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(3):383-8.
35. Ortiz AJ, Fernandez 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(3):e115-22.
36. Öztürk F, Yüksel Ş, Toy E, Kurtoglu EL, Küçük EB. Genotoxic effects of banding procedure with different orthodontic cements on human oral mucosa cells. *Turk J Med Sci*. 2012;42(Sup. 1):1157-65.

37. Pereira JdS, Jacob HB, Locks A, Brunetto M, Ribeiro GLU. Evaluation of the rapid and slow maxillary expansion using cone-beam computed tomography: a randomized clinical trial. *Dental Press J Orthod*. 2017;22(2):61-8.
38. Ramirez A, Saldanha PH. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genet Mol Res*. 2002;1(3):246-60.
39. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res*. 2001;80(7):1615-20.
40. Siqueira Goncalves T, Minghelli Schmitt V, Thomas M, Lopes de Souza MA, Macedo de Menezes L. Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthod*. 2008;78(5):926-30.
41. Tatar A, Özkurt Z, HacimÜftÜOĞLu A, YeŞİLyurt A, Vancelik S. Evaluation of ribavirin genotoxicity with sister chromatid exchange and micronuclei assays in humans. *Turk J Med Sci*. 2009;39(2):241-6.
42. Thomas P, Hecker J, Faunt J, Fenech M. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis*. 2007;22(6):371-9.
43. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat protoc*. 2009;4(6):825-37.
44. 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(3):128-35.
45. Wataha J, Lockwood P, Schedle A. Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures. *J Biomed Mater Res A*. 2000;52(2):360-4.
46. Weissheimer A, de Menezes LM, Mezomo M, Dias DM, de Lima EM, Rizzato SM. Immediate effects of rapid maxillary expansion with Haas-type and hyrax-type expanders: a randomized clinical trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(3):366-76.
47. Westphalen G, Menezes L, Prá D, Garcia G, Schmitt V, Henriques J, et al. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res*. 2008;7(4):1259-66.
48. Yang Y, He X, Shi J, Hickel R, Reichl F-X, Högg C. Effects of antioxidants on DNA double-strand breaks in human gingival fibroblasts exposed to dental resin co-monomer epoxy metabolites. *Dent Mater J*. 2017;33(4):418-26.

Anexo

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comitê de Ética em Pesquisa

Atest.CEP 009/2017

ATESTADO

Atestamos, de acordo com os registros desta Secretaria, que o Protocolo CAAE nº 58659616.0.0000.5419 sobre a pesquisa intitulada **"AVALIAÇÃO IN VIVO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS EM CÉLULAS EPITELIAIS DA MUCOSA E DA LIBERAÇÃO DE ÍONS EM PACIENTES ORTODÔNTICOS TRATADOS COM DISJUNTORES DE HAAS"**, sob a responsabilidade de Arthur Cunha da Silva, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, em 01/09/2016.

We hereby certify, in accordance with the existing settlements of this Office, that the Protocolo CAAE nº 58659616.0.0000.5419 about the research entitled **"GENOTOXIC AND CYTOTOXIC EFFECTS OF HASS APPLIANCE IN EXFOLIATED BUCCAL MUCOSA CELLS DURING ORTHODONTIC TREATMENT"**, under responsibility of . Dr. Arthur Cunha da Silva, was approved by the Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, in 01/09/2016.

Ribeirão Preto, 30 de outubro de 2017.

Ana Aparecida Ferreira do Nascimento
Secretária "ad hoc" do Comitê de Ética em Pesquisa
FORP/USP