

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

**GRAZIELA HENRIQUES WESTPHALEN**

**AVALIAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE A METAIS E  
TOXICIDADE GENÉTICA ASSOCIADAS AO USO DE  
APARELHOS ORTODÔNTICOS FIXOS**

Porto Alegre  
2006

**GRAZIELA HENRIQUES WESTPHALEN**

**AVALIAÇÃO DE HIPERSENSIBILIDADE A METAIS E  
TOXICIDADE GENÉTICA ASSOCIADAS AO USO DE  
APARELHOS ORTODÔNTICOS FIXOS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Ortodontia), pelo Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Orientadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciane Macedo de Menezes

Porto Alegre  
2006

**Aos meus pais, pelo infinito amor e incansável apoio.  
Aos meus irmãos, pelo carinho, amizade e exemplo de alegria.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela sua infinita bondade e sabedoria.

A toda minha família, em especial aos meus pais pelo exemplo de amor, carinho, dedicação e transmissão de valores éticos e morais e de amor a Deus e ao próximo.

Aos queridos amigos que sempre me apoiaram.

À CAPES, pela bolsa de estudo e à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pela oportunidade de ingresso nessa excelente instituição, que merecidamente recebeu o título de melhor Universidade privada do Sul do país.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia Dr. Marcos Túlio Mazzini Carvalho pela seriedade e competência no desempenho do cargo. À Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilza Pereira da Costa pela dedicação e compreensão.

À Prof<sup>a</sup>. orientadora Dr<sup>a</sup>. Luciane Macedo de Menezes pela competência, disponibilidade, amizade e atenção na orientação do trabalho, pela confiança depositada e pela ótima Coordenação do Curso de Mestrado em Ortodontia.

À equipe de professores do Curso de Mestrado em Ortodontia: Eduardo Martinelli de Lima, Ernani Marchioro, Luciane Macedo de Menezes, Susana Rizzatto e Telmo Berthold pela disponibilidade, competência, ensinamentos transmitidos e dedicação ao curso.

Aos colegas de turma (Cláudia, Gustavo, Marcos, Michel e Paulo), do primeiro e segundo ano do Mestrado da Ortodontia, da Especialização em Ortodontia, do Mestrado em Cirurgia Bucomaxilofacial, pela convivência, amizade e ensinamentos compartilhados.

A todas as pessoas relacionadas à área conexa dessa pesquisa, a começar pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Antonieta Lopes de Souza, pelos ensinamentos prestados e pela indicação da brilhante Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Medina, que não mede esforços para orientar os alunos de maneira inteligente, competente e amiga. À Prof<sup>a</sup>. Virgínia Schmitt, pela dedicação e abertura do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Pesquisas Biomédicas da PUCRS, assim como à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Cantarelli Machado e os técnicos Christian e Jeremiah, pela atenção. À Gisela Garcia, pelo trabalho realizado com disposição, determinação e alegria, além da sua amizade e carinho. À Viviane Amaral, pelos ensinamentos e amizade. Ao Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques da Biociências da UFRGS, pelo seu importante papel como pesquisador pela disponibilização de seu laboratório e equipe, em especial ao seu doutorando Daniel Prá, pelos excelentes ensinamentos, competência e disponibilidade em sempre ajudar.

Ao médico dermatologista Dr. Luis Carlos Campos do Centro Clínico do Hospital São Lucas PUCRS e á secretária Sr<sup>a</sup>. Ruth pela atenção e amizade.

Aos pacientes que participaram voluntariamente desta pesquisa.

A todos os funcionários da PUCRS, que desenvolvem seu trabalho com dedicação e cordialidade.

À equipe de professores da Faculdade de Odontologia da UFSM, em especial da disciplina de Ortodontia, pela competência e incentivo pela busca de conhecimento. À equipe de Ortodontia da UFSC, pela brilhante convivência e ensinamentos adquiridos. Aos professores e amigos da Ortodontia da UERJ, pelo convívio e conhecimentos compartilhados.

“O bem que praticares em algum lugar é teu advogado em toda parte”.

*Chico Xavier*

## RESUMO

WESTPHALEN, G.H. **Avaliação de hipersensibilidade a metais e toxicidade genética associadas ao uso de aparelhos ortodônticos fixos.** Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciane Macedo de Menezes. Porto Alegre, PUCRS, Faculdade de Odontologia – Dissertação (Mestrado em Ortodontia e Ortopedia Facial), 2006.

O objetivo desse estudo foi avaliar a hipersensibilidade a metais e a toxicidade genética associadas ao uso de aparelhos ortodônticos fixos. As reações de hipersensibilidade foram verificadas por análise dermatológica utilizando o teste de contato, antes e dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico em um grupo de pacientes. A toxicidade genética foi avaliada pelo teste de micronúcleos e pelo ensaio cometa, a partir de células da mucosa bucal dos pacientes. Para o teste de micronúcleos, as células foram coletadas antes e 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico. Para o ensaio cometa, a amostra foi obtida antes e 10 dias após o início do tratamento ortodôntico. Para os dois testes foram preparadas lâminas, cuja leitura foi realizada em microscópio óptico. Na análise estatística empregaram-se testes não paramétricos (Teste Exato de Fisher, McNemar, Wilcoxon) e análise descritiva. Em relação às reações de hipersensibilidade, não foi observada diferença antes e após a montagem do aparelho ortodôntico, o que indica que os pacientes não foram sensibilizados pelo aparelho. O ensaio cometa mostrou baixos níveis de dano no DNA nas células avaliadas, tanto antes quanto após a montagem do aparelho. No entanto, no teste de micronúcleos foi observado um aumento significativo de danos cromossômicos permanentes no período de trinta dias após a montagem do aparelho ortodôntico. Dessa forma, pesquisas adicionais são necessárias a fim de avaliar o potencial genotóxico dos aparelhos ortodônticos fixos, em associação a estudos de longo prazo de acompanhamento dos pacientes.

**Palavras-chave:** Ortodontia. Hipersensibilidade. Genotoxicidade.

## **ABSTRACT**

WESTPHALEN, G.H. **Evaluation of hypersensitivity to metals and genetic toxicity associated with the use of fixed orthodontic appliances.** Advisor: Professor Doctor Luciane Macedo de Menezes. Porto Alegre, PUC/RS, School of dentistry – Dissertation (Master in Orthodontics and Dentofacial Orthopedics), 2006.

The aim of this study was to evaluate the hypersensitivity to metals and the genetic toxicity associated with the use of fixed orthodontic appliances. Hypersensitivity reactions were verified through the patch test carried out by a dermatologist before and two months after the placement of orthodontic appliances in a group of patients. The genetic toxicity was evaluated by using the micronucleus test and the comet assay. The sample was constituted of cells of the oral epithelium of the patients. For micronucleus test, cells were sampled before and 30 days after the placement of orthodontic appliance. For comet assay, the sample was obtained before and 10 days after the placement of orthodontic appliance. For either the micronucleus test or the comet assay, slides were mounted and processed according to standard protocols and analyzed under light microscope. Statistical analysis was performed by non-parametric tests (Fisher's Exact Test, McNemar and Wilcoxon) and descriptive analysis. Regarding hypersensitivity, no differences were observed between the reactions before and after placement of the orthodontic appliances, which indicates that they did not sensitize patients. The comet assay showed low DNA damage level either before or after orthodontic appliance placement. Conversely, micronucleus test revealed a significant increase of permanent chromosomal damages in the period of 30 day after the placement of orthodontic appliance. Thus, more studies are still needed to understand the genetic toxicity potential of orthodontic devices, and long term studies of follow-up of the orthodontic patients are suggested.

**Key words:** Orthodontics. Hypersensitivity. Genotoxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Quadro 1</b>	Elementos metálicos das ligas odontológicas que possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas conhecidas. Fonte: Wataha (2000).....	27
<b>Quadro 2</b>	Representação de alguns trabalhos que mostraram casos clínicos de reações de hipersensibilidade aos aparelhos ortodônticos.....	57
<b>Gráfico 1</b>	Reações de hipersensibilidade na amostra que foi avaliada através do teste cometa. ....	53
<b>Figura 1</b>	Etapas do teste de contato: A) Limpeza da região selecionada, com algodão embebido em álcool; B) Substância a ser testada sendo colocada no contensor; C) Adesivos e contensores posicionados no antebraço; D) Delimitação das áreas para leitura dos resultados.....	38
<b>Figura 2</b>	Leitura dos testes de contato, de acordo com os graus das reações avaliadas. Fonte: Menezes (2000).....	39
<b>Figura 3</b>	Coleta de células da mucosa bucal: A) Antes; B) 10 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.....	40
<b>Figura 4</b>	Classificação visual das células em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda. Fonte: <a href="http://www.cometassay.com">www.cometassay.com</a> , acesso 15/10/05.....	42
<b>Figura 5</b>	A) e B) Presença de micronúcleo (seta) em células epiteliais da mucosa bucal com aumento de 1000 X. B) Maior aumento da região delimitada.....	43
<b>Figura 6</b>	Células da mucosa bucal (aumento de 1000 X) de paciente gênero masculino, de 11 anos de idade, com classificação classe 0, nos períodos antes (A) e após 10 dias (B) da montagem do aparelho ortodôntico.....	49
<b>Figura 7</b>	Células da mucosa bucal (aumento 1000 X) de paciente do gênero feminino com 24 anos de idade. A) Antes da colocação do aparelho ortodôntico; B) Após 30 dias da montagem do aparelho ortodôntico. Observar a presença de micronúcleo (seta).....	51
<b>Figura 8</b>	Presença de “broken egg” em célula epitelial da mucosa bucal no período de 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico, em paciente do gênero feminino com 16 anos de idade.....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Comparação dos resultados do teste de contato entre os materiais níquel e cromo: antes da montagem do aparelho ortodôntico.....	45
<b>Tabela 2</b>	Comparação dos resultados do teste de contato entre os materiais níquel e cromo: dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico.....	45
<b>Tabela 3</b>	Comparação dos resultados do teste de contato entre os períodos antes e 2 meses após a montagem do aparelho ortodôntico para o níquel.....	46
<b>Tabela 4</b>	Comparação dos resultados do teste de contato entre os períodos antes e 2 meses após a montagem do aparelho ortodôntico para cromo.....	46
<b>Tabela 5</b>	Comparação dos resultados do teste de contato após a montagem do aparelho ortodôntico entre os gêneros em relação ao níquel.....	47
<b>Tabela 6</b>	Comparação dos resultados do teste de contato após o tratamento ortodôntico entre os gêneros em relação ao cromo.....	47
<b>Tabela 7</b>	Comparação dos resultados do teste de contato entre níquel e cromo: antes da montagem do aparelho ortodôntico, de acordo com os diferentes escores.....	48
<b>Tabela 8</b>	Índice de dano antes e após 10 dias da montagem do aparelho ortodôntico na amostra estudada.....	49
<b>Tabela 9</b>	Comparação das quantidades de micronúcleos nos períodos antes e 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.....	50
<b>Tabela 10</b>	Teste de contato ao níquel e presença de micronúcleos 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.....	54
<b>Tabela 11</b>	Teste de contato ao níquel e presença de micronúcleos 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Carbono
Cr	Cromo
cm	Centímetros
Cr <sup>+3</sup>	Cromo trivalente
Cr <sup>+6</sup>	Cromo hexavalente
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDS	Espectroscopia por dispersão de energia
g	Gramas
h	Hora
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
LMP	<i>Low melting point</i> – baixo ponto de fusão
mA	Mili amperes
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetros
Mn	Manganês
MN	Micronúcleo
Mo	Molibdênio
Ni <sup>0</sup>	Níquel metálico
Ni <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	Sulfeto de níquel
NiCl <sub>2</sub>	Cloreto de níquel
NiSO <sub>4</sub>	Sulfato de níquel
Ni	Níquel
NiACS	<i>Nickel allergic contact stomatitis</i> – Estomatite de contato alérgica ao níquel
Nb	Nióbio
PBMCs	Células sanguíneas periféricas humanas
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – tampão fosfato salina
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
®	Marca registrada
rpm	Rotações por minuto
Si	Silício
Ta	Tântalo
V	Voltagem
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
°C	Graus Celsius
µg/ml	Microgramas por mililitros

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISTA DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS APARELHOS ORTODÔNTICOS.....	15
2.2 HIPERSENSIBILIDADE A METAIS RELACIONADA AO USO DE APARELHOS ORTODÔNTICOS .....	16
2.3 TOXICIDADE GENÉTICA ASSOCIADA AO USO DE APARELHOS ORTODÔNTICOS .....	26
2.4 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPERSENSIBILIDADE A METAIS E TOXICIDADE GENÉTICA.....	33
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	34
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	35
4.1 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO). 35	
4.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS).....	40
<b>4.2.1 Ensaio cometa</b> .....	41
<b>4.2.2 Teste de micronúcleos</b> .....	42
<b>5 RESULTADOS</b> .....	45
5.1 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO). 45	
5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS).....	48
<b>5.2.1 Ensaio cometa</b> .....	48
<b>5.2.2 Teste de Micronúcleos</b> .....	49
5.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO) E TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS) ...	52

<b>5.3.1 Avaliação da associação entre hipersensibilidade a metais (teste de contato) e teste cometa .....</b>	<b>52</b>
<b>5.3.2 Avaliação da associação entre hipersensibilidade a metais (teste de contato) e testes de micronúcleos .....</b>	<b>53</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
6.1 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE A METAIS.....	55
6.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA .....	58
<b>6.2.1 Ensaio cometa .....</b>	<b>59</b>
<b>6.2.2 Teste de micronúcleos.....</b>	<b>60</b>
6.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO) E TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS).....	62
6.4 CONSIDERAÇÕES .....	63
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>83</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A biocompatibilidade dos materiais odontológicos tem sido amplamente pesquisada, uma vez que algumas substâncias liberadas por eles apresentam capacidade de alterar a atividade biológica, promovendo, muitas vezes, efeitos adversos ao organismo humano (PHILLIPS, 1998; VAN NOORT, 2004). Dessa forma, recomenda-se, além do entendimento das propriedades físicas, mecânicas e químicas, o conhecimento das respostas biológicas desencadeadas pelos materiais.

As ligas metálicas ortodônticas de aço inoxidável tem como algum de seus constituintes níquel (8%) e cromo (18%), quando presentes na cavidade bucal estão constantemente sujeitas ao processo corrosivo (MATASA, 1995; GRIMAUDO, 2001). Quando um material é suscetível à corrosão, no ambiente biológico, ele tende a liberar suas substâncias componentes, as quais podem causar reações adversas tanto locais, como sistêmicas. Diversos estudos demonstram que os íons metálicos (níquel e cromo) produzem efeitos deletérios nos tecidos humanos (WATAHA, 2000; DAYAN; PAINE, 2001; ZORODDU et al. 2002; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005). Sabe-se que o níquel é capaz de produzir mais reações alérgicas que todos os outros metais combinados (BASS; FINE; CISNEROS, 1993; LOWEY, 1993). O contato desse metal nos indivíduos suscetíveis pode produzir amplo espectro de reações de hipersensibilidade, não havendo um padrão previsível. O cromo apresenta-se como o segundo metal relacionado à etiologia das reações de hipersensibilidade (PARK; SHEARER, 1983).

Outro ponto de fundamental importância, na avaliação do emprego de metais pesados na Ortodontia, é o seu potencial genotóxico, citotóxico e carcinogênico, uma vez que elementos metálicos como o níquel e o cromo apresentam resultados positivos relacionados à toxicidade genética. Estudos *in vivo*, mostraram que metais como o níquel e o cobalto liberados de aparelhos ortodônticos podem causar quebras no DNA de células da mucosa bucal (FACCIONI et al., 2003). Apesar dessas evidências, existem poucos estudos abordando esses aspectos dos materiais.

Portanto é de suma importância que o Ortodontista conheça a capacidade dos materiais afetarem o ambiente biológico, a fim de garantir um tratamento seguro e eficaz aos seus pacientes. Dessa forma, pretende-se verificar a hipersensibilidade

0, aos metais e a toxicidade genética associadas ao uso de aparelhos ortodônticos de aço inoxidável, em um grupo de pacientes.

## 2 REVISTA DE LITERATURA

### 2.1 EFEITOS BIOLÓGICOS DOS APARELHOS ORTODÔNTICOS

Segundo Phillips (1998), nenhum material dentário é absolutamente seguro, visto que existe certa probabilidade de aparecimento de efeitos adversos. Assim, a seleção dos materiais deve ser baseada na garantia de que os benefícios se sobreporão aos riscos biológicos.

A biocompatibilidade dos materiais na Odontologia tem sido amplamente estudada devido à propriedade de interação dos materiais com os tecidos e fluidos do corpo humano. Em Ortodontia, uma das aplicações da biocompatibilidade está relacionada à resistência à corrosão das ligas metálicas (FARRONATO et al., 2002). Sabe-se que os aparelhos ortodônticos são confeccionados basicamente a partir de ligas de aço inoxidável, sendo que contêm metais como o níquel e o cromo (STARKJAER; MENNÉ, 1990; BISHARA; BARRETT; SELIM, 1993; RAHILY; PRICE, 2003).

Quando o aparelho ortodôntico está presente na cavidade bucal, os metais constituintes da aparelhagem têm o processo de corrosão estimulado, uma vez que esse meio possui elementos químicos que são prejudiciais ao aço inoxidável (MATASA, 1995). Wataha (2000), Grimaudo (2001), Farronato et al. (2002) e Schmalz e Garhammer (2002) afirmaram que a corrosão das ligas metálicas utilizadas em Odontologia resulta na liberação de íons, que são pré-requisitos para desencadear efeitos biológicos adversos, como toxicidade, alergia e mutagenicidade.

Grimaudo (2001) afirma que a resposta biológica depende de quais íons são liberados, das quantidades liberadas, da duração da exposição aos tecidos e de outros fatores. O potencial dos fios ortodônticos e de outras ligas de causar reações alérgicas está relacionado a seu modo e padrão da liberação de íons metálicos.

A fim de minimizar os riscos biológicos, Wataha em 2000 recomendou a seleção de ligas com baixas taxas de liberação de íons, ou seja, baixa corrosão pelos dentistas.

Diversas abordagens experimentais demonstram que os íons metálicos produzem efeitos deletérios nos tecidos humanos. Têm-se atribuído efeitos alergênicos (EL AGROUDI; EL MOTAYAM; AWAD, 1986; MUNKSGAARD, 1992, GRIMAUDDO, 2001), mutagênicos (FACCIONI et al., 2003), carcinogênicos (OLLER; COSTA; OBERDÖRSTER, 1997; BURGAZ et al., 2002) e citotóxicos (BOUR, 1994; NOVELLI et al., 1998; MORAES et al., 1999; FACCIONI et al., 2003; NIKI, et al. 2003) aos elementos metálicos constituintes dos aparelhos ortodônticos.

Apesar dessas evidências, ainda falta um consenso na literatura sobre as propriedades biológicas das substâncias liberadas pelos aparelhos ortodônticos (ELIADES et al., 2004).

## 2.2 HIPERSENSIBILIDADE A METAIS RELACIONADA AO USO DE APARELHOS ORTODÔNTICOS

Segundo Schuster et al. (2004), a alergia significa uma hipersensibilidade específica adquirida do sistema imune tanto de uma fonte exógena quanto endógena. Grimaudo, em 2001, afirma que a alergia, na Odontologia, está geralmente relacionada a reações de hipersensibilidade tardias a materiais dentários específicos.

As reações alérgicas podem ser divididas em tipos I, II, III e IV (MUNKSGAARD, 1992). As repostas induzidas pelos aparelhos ortodônticos contendo níquel são geralmente chamadas de dermatite de contato, e, do ponto de vista imunológico, são consideradas reação de hipersensibilidade do tipo IV (MARIGO et al. 2003; RAHILLY; PRICE, 2003; SCHUSTER et al., 2004).

Estudos recentes confirmam um aumento na tendência de indivíduos apresentarem reações alérgicas aos materiais ortodônticos (FARRONATO et al., 2002). O interesse nos efeitos tóxicos e alergênicos dos metais como níquel, cromo e mercúrio tem aumentado em decorrência de razões como: alta incidência a alergia conhecida de alguns metais, particularmente do níquel; potencial de produção de reações alérgicas locais e, conseqüentemente, rejeição do material utilizado ou exacerbação da sensibilização pré-existente; possibilidade de efeitos tóxicos diretos e de sensibilização, geralmente com sérias conseqüências para pessoas com

implante metálico, próteses de quadril e marca-passos; maior propensão de pacientes portadores de doenças da mucosa bucal, como o líquen plano, de apresentarem reações de hipersensibilidade. (BURROWS, 1986).

O níquel é um elemento metálico magnético, de aspecto branco prateado, utilizado principalmente em ligas, classificado como um dos elementos de transição, (VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005). Esse metal é considerado um potente sensibilizador e um alergênio freqüente (ATSDR, 2005, GENELHU et al., 2005), sendo uma das causas mais comuns da dermatite de contato (BASS; FINE; CISNEROS, 1993; SCHMALZ; GARHAMNER, 2002).

A incidência de hipersensibilidade ao níquel é significativa (GRIMSDOTTIR; GJERDET; HENSTEN-PETERSEN, 1992) e ocorre em 8 a 30% da população em geral (JONES et al., 1996; MENNÉ et al., 1987, GRIMSDOTTIR; GJERDET; HENSTEN-PETERSEN, 1992; BASS; FINE; CISNEROS, 1993; GRIMAUDO, 2001). As mulheres apresentam uma incidência maior que os homens (BLANCO DALMAL; CARRAQUILLO-ALBERTY; SILVA PARRA 1984; JONES et al. 1996; NIELSEN; MENNÉ, 1993; KERUSUO et al., 1996; JANSON et al., 1998; GRIMAUDO, 2001; NIELSEN et al., 2002; KALIMO; MATILLA; KAUTIAINEN, 2004; MENEZES et al., 2004; SAGLAN; BAYSAL; CEYLAN, 2004). Segundo Saglan, Baysal e Ceylan (2004) a reação de hipersensibilidade ao níquel ocorre pelo contato direto ou indireto com a pele ou mucosa. Pesquisas na literatura mostram que a dermatite de contato proveniente do níquel está relacionada ao contato com jóias, óculos, relógios (BLANCO DALMAU; CARRAQUILLO-ALBERTY; SILVA PARRA, 1984; JONES; et al 1996, NIELSEN; MENNÉ, 1993; KERUSUO et al., 1996; JANSON et al., 1998; KALIMO, MATILLA; KAUTIAINEN, 2004).

O cromo também está relacionado a reações de hipersensibilidade, (CURRENTS CONFERENCES, 1984), sendo apontado como a segunda causa mais freqüente de dermatite de contato (PARK; SHEARER, 1983). De acordo com Wataha (2000) 8% da população em geral é sensível a esse metal. O cromo é definido como um elemento metálico de cor cinza. Classificado como um dos elementos de transição, seu número atômico é 24 (VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

Existem diversas evidências na literatura relacionadas à hipersensibilidade a metais. A seguir serão citados alguns desses estudos.

Bass, Fine e Cisneros, em 1993, objetivaram determinar se o tratamento ortodôntico poderia causar reações alérgicas ao níquel e avaliar as respostas gengivais aos aparelhos ortodônticos nos pacientes que apresentassem sensibilidade antes do tratamento. Nesse estudo, 29 indivíduos foram submetidos ao teste de contato antes de iniciarem o tratamento e divididos em dois grupos: Grupo 1 - pacientes com reação positiva ao níquel e Grupo 2 - pacientes com reação negativa ao níquel. Os indivíduos do Grupo 1 foram avaliados mensalmente, após a colocação do aparelho ortodôntico, quanto ao índice de placa e inflamação gengival. Os indivíduos do Grupo 2 foram reavaliados somente três meses depois do início do tratamento, sendo que, nesse momento, foram realizados novos testes de contato. Verificou-se que a colocação do aparelho ortodôntico de aço inoxidável e fios de níquel-titânio, em indivíduos sensíveis ao níquel, não provocou inflamação ou hiperplasia gengival, pois os índices de placa permaneceram estáveis, durante o período investigado. Os autores também constataram que dois indivíduos insensíveis ao níquel, ao início do tratamento, apresentaram reação positiva para este metal após três meses de utilização do aparelho.

Janson et al. (1994) avaliaram a possibilidade da aparelhagem ortodôntica provocar gengivite por reação de hipersensibilidade. Foi realizada anamnese de 248 pacientes em tratamento ortodôntico. Destes, 147 (59,2%) eram do gênero feminino e 101 (40,8%) do gênero masculino, com idades variando de 10 a 17 anos. A fim de coletar os dados foi aplicado um questionário que constava de perguntas relacionadas ao aparecimento de reação alérgica devido ao uso de objetos metálicos e histórico familiar. Os pacientes foram avaliados por dois examinadores que determinaram, clinicamente, o grau de higiene bucal, a presença visível ou não de placa bacteriana e/ou gengivite e a sua provável causa. A partir da análise dos dados os autores concluíram que os materiais utilizados em Ortodontia podem provocar reação de hipersensibilidade por contato; a reação de hipersensibilidade ocorre mais freqüentemente no gênero feminino que no masculino, numa proporção de 5:1; há evidência de provável relação entre a reação de hipersensibilidade ao níquel e o aparecimento de gengivites. Essa associação é também mais comum no gênero feminino, numa proporção de 6:1. Recomenda-se aos ortodontistas aventar a possibilidade da presença de uma gengivite ser de origem alérgica ao níquel e não somente causada pelo acúmulo de placa bacteriana.

Vilaplana, Romaguera e Cornellana (1994) objetivaram avaliar as dermatites de contato e as reações adversas na mucosa bucal em pacientes que utilizavam próteses. Sessenta e seis pacientes que apresentaram reações adversas às próteses foram encaminhados por dermatologistas e dentistas para realização de teste de contato. Observou-se que as reações adversas foram mais freqüentes do que se esperava antes da realização do estudo. A aplicação de teste de contato mostrou que os alergênicos apresentaram a seguinte ordem decrescente de severidade: níquel, cobalto, potássio, dicromato de rádio, paládio, mercúrio, berílio, metil metacrilato, cobre e zinco.

Al-Waheidi (1995) relatou o caso clínico de um paciente de 14 anos de idade, do gênero masculino, que apresentou reação alérgica aos arcos de níquel-titânio (contendo em torno de 50% de níquel). Após duas semanas de uso dos arcos, o paciente apresentou sensação de queimação e ulcerações em torno dos lábios e boca. Essas lesões foram atribuídas a causas traumáticas, assim os arcos foram removidos e, após o período da remoção, as sensações desapareceram. Com a evolução do tratamento, o paciente recebeu novamente arcos contendo níquel e, poucos dias após, reapareceram as lesões eritematosas na cavidade bucal e na mucosa dos lábios. Assim o paciente foi encaminhado para realização de teste de contato, no qual foi confirmada alergia ao níquel. O autor recomendou que as ligas contendo níquel deveriam apresentar advertência sobre o seu conteúdo e cautela de uso em indivíduos alérgicos.

Objetivando investigar a freqüência da hipersensibilidade ao níquel em adolescentes em relação ao gênero, início e duração do tratamento ortodôntico e idade em que as orelhas foram perfuradas, Kerusuo et al. (1996) analisaram 700 adolescentes, entre 14 a 18 anos de idade, nos quais 476 (68%) tiveram história de tratamento ortodôntico com aparelhos metálicos. O estudo consistiu de testes de contato para verificar alergia ao níquel e história do paciente obtida através de questionário. A freqüência da sensibilização ao níquel foi de 19%, sendo mais significativa em meninas (30%) do que em meninos (3%) e em indivíduos com orelhas perfuradas (31%) do que aqueles sem perfuração (2%). Os resultados sugeriram que o tratamento com aparelhos ortodônticos metálicos contendo níquel pode reduzir a freqüência da hipersensibilidade a este metal. O tratamento ortodôntico não pareceu afetar a prevalência da sensibilização ao níquel.

Reações alérgicas, como aparecimento de vesículas amareladas nos lábios e eczemas vermelhos com presença de fissuras nas palmas das mãos e solas dos pés, foram observadas em um menino de 14 anos de idade que iniciou o tratamento ortodôntico com a utilização de duas bandas nos primeiros molares superiores e um arco facial extra-oral usado durante a noite. A dermatite desenvolveu-se logo após a inserção do aparelho. Com o uso descontinuado do arco facial a dermatite resolveu-se imediatamente. Em um curto período de tempo, após a remoção das bandas, o eczema desapareceu. Foi realizado teste de contato, que mostrou reação alérgica positiva ao níquel e cobalto. Considerando a ampla utilização do aço inoxidável contendo níquel em Ortodontia, o desenvolvimento de dermatites severas, como o presente caso, pode ser considerado como extremamente raro (KEROSUO; KANERVA, 1997).

Lindsten e Kurol, em 1997, comentaram que a hipersensibilidade ao níquel é um problema crescente em adolescentes, especialmente em meninas, que apresentam uma prevalência de reações positivas ao metal maior que 30%. Os autores constataram que os pacientes hipersensíveis ao níquel no início do tratamento podem mostrar reações adversas durante a terapia ortodôntica, no entanto isto é muito incomum. Os pacientes que não são hipersensíveis ao níquel no início do tratamento provavelmente não apresentam risco de desenvolver alergia ao metal em função do tratamento ortodôntico. A liberação lenta e a longo prazo de níquel dos aparelhos ortodônticos pode induzir tolerância ao metal em indivíduos que não são hipersensíveis no início do tratamento.

Menezes et al. (1997) relataram um caso clínico de uma paciente que demonstrou reação alérgica à parte metálica da tala cervical do aparelho extra-oral. Foi relatada urticária e irritação da pele do pescoço. Clinicamente foi observada uma área eritematosa com vesículas no pescoço, uma lesão de cada lado, correspondendo em tamanho e localização com as partes metálicas da tala do aparelho extra-oral. A análise da história clínica da paciente revelou que a mesma apresentava alergia a brincos que não fossem de ouro, provocando inflamação local e descamação da pele após o seu uso. A lesão foi diagnosticada como sendo dermatite de contato. O tratamento realizado consistiu na remoção do estímulo, ou seja, troca da tala cervical por uma onde a parte metálica não entrasse em contato com a pele. Quinze dias após o diagnóstico e tratamento, a paciente retornou sem nenhum sinal de reação alérgica.

Em 1998, Janson et al. investigaram a reação de hipersensibilidade ao níquel relacionada ao tratamento ortodôntico. A amostra constituiu-se de 170 pacientes brasileiros, os quais foram avaliados antes, durante e após a terapia ortodôntica, Grupos A, B e C, respectivamente. O Grupo A foi composto por 60 pacientes (27 homens e 33 mulheres), o Grupo B, por 66 pacientes (21 homens e 45 mulheres) e o Grupo C, por 44 indivíduos (17 homens e 27 mulheres). Para verificar a prevalência de hipersensibilidade nos distintos grupos, realizou-se teste de contato com sulfato de níquel, o qual permaneceu em contato com a pele por até 96 horas. A reação tecidual foi verificada e classificada, de acordo com uma escala do Grupo de Pesquisa Internacional de Dermatite de Contato. Os resultados indicaram uma alta prevalência de reação alérgica ao níquel, 28,3%, sendo que não houve diferença estatística entre os grupos. Os autores concluíram que o tratamento ortodôntico não induziu reações de hipersensibilidade ao níquel, e a prevalência de reações a este metal foi quatro vezes maior entre as mulheres.

De Silva e Doherty (2000) apresentaram o caso de um menino de 12 anos de idade com dermatite atópica e severas lesões de pele num período de 18 meses. No exame clínico foi observado eczema nas regiões em torno da boca, olhos, couro cabeludo anterior e também perda de cabelo. A exacerbação do eczema pareceu coincidir com a colocação de aparelho ortodôntico fixo constituído de arcos de níquel-titânio e bráquetes de aço inoxidável. O paciente não apresentava história prévia de reação a metais e nem uso de jóias e orelhas perfuradas. Após a aplicação da série de testes de contato, foi observada reação positiva ao sulfato de níquel e ao dicromato de potássio 0,5%. O aparelho foi substituído por um removível. Apesar do novo aparelho ser confeccionado com metil metacrilato e um arco de aço inoxidável para estabilização, a remoção dos elementos metálicos presentes anteriormente fez que os eczemas melhorassem. Foi observado que o cabelo voltou a crescer.

No mesmo ano, Kanerva et al. avaliaram a incidência de alergia a metais em diferentes condições ocupacionais. Do total de 2543 casos de dermatite de contato alérgicas ocupacionais relatadas, durante 1991 e 1997, foi observado que o cromo, níquel e o cobalto causaram 143 (5,6%), 176 (6,9%) e 41 (1,6%) dos casos respectivamente. As mulheres apresentaram maior número de dermatite de contato ocupacional em relação ao níquel, enquanto que as reações ao cromo e ao cobalto foram mais freqüentes nos homens.

Menezes (2000) avaliou, através de espectroscopia de absorção atômica, a quantidade de níquel na urina de 21 pacientes, antes e aproximadamente dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico fixo, sendo constatado aumento da quantidade de níquel após a montagem do aparelho, não havendo diferença estatística entre os gêneros feminino e masculino. Também foi realizada a pesquisa sobre os efeitos do níquel em 26 camundongos (*Swiss webster*), divididos em dois grupos controle (C14 e C45) e dois grupos níquel (N14 e N45), que receberam aplicação subcutânea de sulfato de níquel, sendo sacrificados após 15 e 46 dias. Constatou-se, no grupo experimental, aumento de peso total e de alguns órgãos, lesão microscópica em órgãos hematopoiéticos, coração, fígado e rins, mais evidentes em N45. Nefrotoxicidade foi evidenciada por modificação no padrão de ligação às lectinas. No fígado, a análise estereológica demonstrou aumento de volume dos hepatócitos e de seus núcleos. Não foram detectadas quantidades mensuráveis de níquel ao microscópio eletrônico de varredura com raios X por energia dispersa (EDS).

Na Ortodontia a incidência de reações de hipersensibilidade é de 1:100, sendo 85% dessas reações relacionadas à parte metálica dos aparelhos de ancoragem extra-bucal. Apesar da hipersensibilidade alérgica verdadeira a materiais dentários se apresentar rara, determinados produtos possuem propriedades alérgicas definidas. Assim, algumas recomendações clínicas devem ser seguidas: avaliar a composição dos materiais utilizados em relação à presença de elementos que podem afetar a saúde do paciente (níquel, cromo, cobalto); evitar a inalação de pó das ligas; incluir no histórico de saúde questionamento sobre a sensibilidade a metais dos pacientes. Essas medidas capacitarão os dentistas a melhor entender as implicações e as reações adversas dos materiais comumente utilizados na Odontologia (GRIMAUDO, 2001).

Nielsen et al. (2002) investigaram a incidência da alergia ao níquel em adultos dinamarqueses, entre os anos de 1990 e 1998. Inicialmente, em 1990, realizou-se um estudo transversal, onde se avaliou a prevalência de alergia, através do teste de contato em 567 pessoas. Em 1998, 365 destes mesmos indivíduos foram reavaliados (novos testes de contato). Os autores observaram um aumento na prevalência de reações alérgicas ao níquel no período, de 7 a 11%. A incidência anual de casos novos de reação alérgica ao níquel variou de 1-5%. Dessa forma, com base nos resultados desse estudo, pode-se considerar que o grupo de risco

para desenvolver a dermatite de contato ao níquel está aumentando na população dinamarquesa.

Counts et al., em 2002, relataram um caso de hipersensibilidade ao níquel com manifestações na mucosa bucal durante o uso de uma barra transpalatina. Uma menina de 11 anos e 8 meses, que utilizou um aparelho de expansão rápida e uma barra transpalatina, apresentou, após 8 meses de tratamento, no segmento posterior direito, uma hipertrofia, em torno dos anéis do primeiro molar e pré-molar. Foi realizado teste de contato com sulfato de níquel 5%, que indicou reação positiva. Observou-se que a paciente apresentava orelhas perfuradas aos dois anos de idade. A literatura mostra que essa exposição pode ter atuado como um evento sensibilizador.

Considerando que o tratamento com aparelhos funcionais ortopédicos de acrílico e aço inoxidável, durante vários meses, poderia induzir reações adversas, Farronato et al. (2002) sugeriram a confecção de aparelhos de expansão rápida palatal e de Frankel em uma versão menos alergênica tendo como constituinte básico o titânio. Esse elemento apresenta uma elevada resistência à corrosão tornando-o altamente biocompatível. A sua flexibilidade favorece a confecção de aparelhos de Frankel, que são complexos, com um grau de precisão adequado.

Além de reações alérgicas observadas intra-bucalmente, em decorrência da utilização de aparelhos ortodônticos, Mancuso e Berdondini, em 2002, constataram eritemas simétricos, edema nas pálpebras e na região superior das bochechas e, também, presença de hiperemia conjuntiva nos olhos de uma paciente de 13 anos de idade, após o uso de aparelho ortodôntico, constituído de 10-13% de níquel e 16-19% de cromo. Foi confirmada alergia ao níquel após aplicação do teste de contato (padrão europeu). O uso do aparelho ortodôntico foi suspenso e as lesões oculares desapareceram em duas semanas. Quando da reinserção do aparelho houve recidiva da dermatite.

Em 2003, Jensen et al. verificaram a liberação de íons de níquel usados nos aparelhos ortodônticos e sua reatividade ao teste de contato em indivíduos sensíveis a esse metal. Os parâmetros analisados foram: liberação de níquel estimada em saliva artificial de quatro diferentes ligas de aço inoxidável frequentemente utilizadas em aparelhos ortodônticos; conteúdo de níquel em células da mucosa bucal, coletadas de três pacientes, antes e depois da colocação dos aparelhos; e reatividade, através do teste de contato, a quatro ligas de aço inoxidável, em 31

pacientes. Todas as ligas liberaram pequenas quantidades de íons níquel na saliva artificial. No entanto, não foram encontradas quantidades mensuráveis de níquel em qualquer amostra da mucosa bucal. Nenhum dos 31 indivíduos reagiu positivamente ao teste de contato com as quatro ligas de aço inoxidável, indicando que elas mesmas poderiam ser usadas, seguramente, no contato direto e prolongado com a pele.

Enfocando o estudo do perfil imunológico de pacientes com sensibilidade ao níquel devido ao uso de aparelhos ortodônticos fixos, Marigo et al. (2003) testaram, *in vitro*, o efeito do antígeno níquel na resposta proliferativa de linfócitos, utilizando ensaio de estimulação de linfócitos com células sangüíneas mononucleares periféricas (PBMCs), de pacientes com aparelhos ortodônticos. O ensaio de proliferação celular foi usado como metodologia básica para investigar a influência de variáveis como a fonte do antígeno níquel e o número de células na cultura. Foram selecionados 35 pacientes, classificados em sensíveis e não sensíveis ao níquel, baseados nas avaliações clínicas. Os resultados mostraram que o sulfato de níquel hexahidratado em 10 ug/ml e  $2 \times 10^5$  células foi a melhor condição para induzir a resposta proliferativa mais marcante de níquel *in vitro*. Esse método aperfeiçoado foi capaz de distinguir pacientes sensíveis dos não sensíveis.

Rahilly e Price (2003), em uma revisão da literatura, afirmam que o uso de bráquetes, fios e acessórios de aço inoxidável parece ser seguro, pois a composição dessas ligas não causaria reações de hipersensibilidade. No entanto, os autores recomendam que arcos com altos conteúdos de níquel devam ser evitados em pacientes sensíveis a esse metal. Materiais ortodônticos livres de níquel devem ser considerados nesses casos.

Em 2004, Kalimo, Matilla e Kautiainen procuraram relacionar o efeito do tratamento ortodôntico no desenvolvimento de alergia ao níquel em estudantes universitários. Foi aplicado teste de contato em 153 pacientes (113 tinham perfuração de pele e 70 apresentavam história de tratamento ortodôntico aproximadamente dez anos antes). A alergia ao níquel foi significativamente associada com presença de perfuração da pele. O tratamento ortodôntico foi considerado responsável pela sensibilização de determinados indivíduos.

Menezes (2000) e Menezes et al. (2004) verificaram as reações de hipersensibilidade a metais em pacientes submetidos a tratamento ortodôntico. Para tanto foi realizado teste de contato com oito substâncias (cloreto de cobalto, sulfato

de cobre, bicromato de potássio, sulfato de ferro, cloreto de manganês, sal de molibdênio, sulfato de níquel e óxido de titânio) antes e dois meses após a colocação de aparelho ortodôntico em um grupo de 38 pacientes. As substâncias testadas foram posicionadas nas costas dos pacientes incluindo a área escapular e infra-escapular, sendo removidas após 48 horas e examinadas pelo médico dermatologista 48 e 72 horas após a aplicação do antígeno. A leitura dos testes foi realizada com base na recomendação do *“International Research Contact Dermatitis Group”*. Os resultados da pesquisa mostraram reações positivas estatisticamente significantes para o sulfato de níquel (21,1%), o dicromato de potássio (21,1%) e o cloreto de manganês (7,9%), sendo que o sulfato de níquel apresentou reações de maior intensidade. Nenhuma diferença foi observada entre as reações antes e após a colocação de aparelhos ortodônticos, indicando que os antígenos estudados não sensibilizaram os pacientes ou afetaram a sua tolerância a esses metais durante esse período. Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação ao gênero nas substâncias avaliadas, apesar da grande tendência à positividade ao sulfato de níquel observada entre pacientes do gênero feminino, e ao dicromato de potássio em pacientes do gênero masculino.

Visando determinar a alteração da concentração de cromo e de níquel na saliva e seus efeitos nos tecidos gengivais durante o tratamento ortodôntico, foram avaliados vinte pacientes (10 homens e 10 mulheres), na idade de 17 a 20 anos, que receberam aparelhos fixos na arcada superior. A concentração de ambos os metais foi registrada nos períodos pré-tratamento, três e doze meses de tratamento e um mês após a descolagem. A profundidade do sulco gengival foi avaliada. Os resultados revelaram que 20% das mulheres e 10% dos homens mostraram reação de alergia na forma de gengivite depois de 3 meses, sendo que os sinais desapareceram espontaneamente após um mês da remoção do aparelho. Assim, a alergia ao níquel e ao cromo não foi considerada um problema médico sério e, em tais pacientes, medidas de higiene bucal devem ser mantidas com a utilização de cremes dentais e enxaguatórios bucais (RAMADAM, 2004).

Saglam, Baysal e Ceylan (2004) realizaram um estudo com objetivo de determinar a prevalência de reações de hipersensibilidade ao níquel antes e após a colocação de aparelhos ortodônticos com bráquetes e arcos de aço inoxidável. A amostra total consistia de 82 pacientes (55 mulheres e 27 homens). Foi utilizado

teste de contato e questionário para avaliar a hipersensibilidade aos metais constituintes dos dispositivos. A prevalência da alergia ao níquel foi mais alta nas mulheres do que nos homens. A história familiar e o uso de objetos metálicos em contato com a pele não caracterizaram hipersensibilidade ao níquel. Os resultados sugeriram que a terapia ortodôntica com aparelhos de aço inoxidável não iniciou ou não agravou a reação de hipersensibilidade ao níquel.

A incidência de reações alérgicas durante a terapia ortodôntica fixa foi observada na Alemanha, no Estado de Hesse, através da aplicação de um questionário em 68 consultórios ortodônticos. Os dados obtidos corresponderam a 0,3% dos 60.000 pacientes atendidos. Foram observadas mais alterações extra-orais (45%) do que intra-orais (17%), sendo que a prevalência de reações alérgicas foi de 38%. Em 53% dos casos afetados, a terapia adotada foi a utilização de materiais sem níquel, enquanto que a terapia foi continuada após um período de recuperação em 33% dos casos (SHUSTER et al., 2004).

Genelhu et al. (2005) realizaram análise retrospectiva a fim de investigar o papel do gênero, idade, história prévia de alergia e tempo de exposição ao aparelho ortodôntico fixo na etiopatogenia da estomatite de contato alérgica induzida por níquel (NiACS). Foram avaliados 44 pacientes ortodônticos (de 10 a 44 anos), divididos em dois grupos, dependendo das manifestações clínicas das NiACS. Os resultados mostraram que pacientes jovens, especialmente mulheres, com história de reação alérgica, tiveram maior predisposição à manifestação clínica das NiACS. O tempo de exposição ao tratamento ortodôntico não foi considerado um fator significativo.

### 2.3 TOXICIDADE GENÉTICA ASSOCIADA AO USO DE APARELHOS ORTODÔNTICOS

A genotoxicidade é o setor da genética que estuda os processos que alteram a base hereditária da vida, quer seja em sua estrutura física e química, o DNA (ácido desoxirribonucléico), processo este classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético ao nível celular ou orgânico, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese. A genotoxicidade estuda o

que induz à lesão tanto a nível celular ou molecular. É importante salientar que a mutagênese descreve uma alteração na seqüência de pares de base do DNA (mutação), ao passo que a carcinogênese significa que alterações no DNA levaram a um crescimento e divisão celular inapropriados. A carcinogênese resulta geralmente de diversas mutações (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). Dessa forma nem todos os eventos mutagênicos acarretam em carcinogênese (WATAHA, 2000).

Na Odontologia há uma constante preocupação em relação aos efeitos mutagênicos e carcinogênicos dos materiais correntemente utilizados (LI; DUNIPACE; STOOKEY, 1988; RIBEIRO et al., 2004). As propriedades genotóxicas dos materiais odontológicos são definidas como critério essencial na seleção dos mesmos (MONTANARO et al. 2005).

Uns dos principais elementos constituintes das ligas ortodônticas de aço inoxidável (níquel e cromo) têm sido relacionados a efeitos genotóxicos. O níquel é apontado como um material tóxico (MUNKSGARRD, 1992; WATAHA, 2000), ao passo que a exposição aos íons de cromo pode resultar em pontos de mutação no DNA, danos nos cromossomos e modificações oxidativas nas proteínas (DAYAN; PAINE, 2001).

Observa-se que determinadas formas específicas e estados oxidativos dos metais constituintes das ligas odontológicas estão relacionados a efeitos deletérios (WATAHA, 2000) (Quadro 1).

Elemento	Forma	Propriedade mutagênica/carcinogênica	Outros comentários
Cromo	Cr <sup>+3</sup>	Não mutagênica	Muito reativo, morte celular antes do núcleo
	Cr <sup>+6</sup>	Carcinogênica	
Níquel	Ni <sup>0</sup>	Possivelmente carcinogênico	—
	Ni <sub>2</sub> S <sub>3</sub>	Carcinogênico	
	NiCl <sub>2</sub>	Mutagênico fraco	
	NiSO <sub>4</sub>	Mutagênico fraco	

**Quadro 1** - Elementos metálicos das ligas odontológicas que possuem propriedades mutagênicas e carcinogênicas conhecidas.

**Fonte:** Wataha (2000).

A ação carcinogênica do níquel também é conhecida em humanos, conforme dados da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (ZORODDU et al. 2002). A exposição a esse metal tem ocasionado um aumento na incidência de câncer pulmonar (OLLER; COSTA; OBERDÖRSTER, 1997) e gastrointestinal (NOVELLI et al., 1998). O cromo também está associado com o aparecimento de câncer nasal e de pulmão (CURRENTS CONFERENCES, 1984; BURGAZ et al. 2002).

Existe uma variedade de testes para verificação dos efeitos genotóxicos de diferentes materiais, entre eles os testes de micronúcleos e cometa.

O ensaio cometa (teste de células individualizadas em gel de agarose) é uma técnica útil para o estudo de danos e reparos no DNA. As células com dano aumentado no DNA mostram um aumento na migração de DNA cromossomal do núcleo em direção ao ânodo, que se assemelha à forma de um cometa (SPEIT; HARTMANN, 1999).

O princípio da técnica é simples: as células são incluídas em gel sobre uma lâmina de microscopia, faz-se passar uma corrente elétrica e, como o DNA tem carga negativa, se estiver rompido (clastogênese), migra para fora do núcleo, dando a aparência de um cometa ou cauda. O DNA que não estiver rompido ou quebrado fica armazenado no núcleo e é muito grande para migrar (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

As vantagens do ensaio cometa incluem realização rápida e simples, sensibilidade na detecção de danos no DNA, análise de dados em nível de células individuais, uso em amostras extremamente pequenas e aplicabilidade para qualquer população (SPEIT; HARTMANN, 1999; SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

O teste de micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). É considerado como um método para se avaliar a capacidade da substância de induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico em células em estágio de divisão, na medula óssea. Tanto danos cromossômicos estruturais como numéricos estão associados à iniciação e/ou progressão de tumores, e com efeitos reprodutivos adversos (RIBEIRO, 2003).

Os micronúcleos são estruturas extra-nucleares, compostas por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que, durante a mitose, não foram

incorporados ao núcleo principal (BOHRER, 2003). O micronúcleo é o resultado da perda de fragmento(s) cromossômico(s) ou de cromossomo(s) inteiro(s), podendo ser induzido por agentes que danificam diretamente o cromossomo, produzindo quebras, ou por agentes que afetam o fuso mitótico. Os fragmentos ou cromossomos inteiros que não se incluem aos núcleos das células em divisão ficam perdidos no citoplasma e formam a própria membrana nuclear, originando os micronúcleos, que são detectados em células interfásicas como pequenos corpúsculos arredondados de cromatina, separados do núcleo principal (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

A frequência de micronúcleos é capaz de medir tanto a quebras cromossômicas quanto perdas cromossômicas, sendo essa técnica sensível para o monitoramento de danos genéticos (FENECH et al., 1999). De acordo com Silva, Erdtmann e Henriques, em 2003, a presença de micronúcleos pode ser tomada como indicação da existência de aberração cromossômica. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem-se formar nas divisões seguintes. Por isso, para visualizar micronúcleos, as células precisam ter passado por um ciclo mitótico.

Quando o tecido estudado é o epitelial, a técnica de micronúcleos em células esfoliadas apresenta vantagens sobre a técnica de micronúcleos em linfócitos. As células do tecido-alvo podem ser diretamente estudadas e a coleta não é invasiva. Além disso, o estudo dos micronúcleos em linfócitos necessita de estímulo para que estes entrem em divisão, ao contrário das células epiteliais, que estão em constante renovação (BOHRER, 2003).

Os micronúcleos observados nas células dos esfregaços da mucosa bucal indicam a ocorrência de aberrações cromossômicas ocorridas nas células da camada basal (STICH; CURTIS; PARRIDA, 1982) e, dessa forma, refletem o dano genotóxico ocorrido 7 a 10 dias antes da coleta.

A determinação dos micronúcleos é baseada em algumas características como: estrutura e intensidade de coloração da cromatina similares ou mais fracas que o núcleo principal; bordas nítidas, sugerindo a presença de membrana nuclear; forma arredondada ou ovalada e incluída no mesmo citoplasma do núcleo principal e tamanho menor que 1/5 do núcleo principal (SARTO et al, 1987). Segundo Ribeiro,

Salvadori e Marques (2003) os critérios para identificação do micronúcleo são tamanho, forma e coloração.

O aumento da frequência de células micronucleadas tem sido relacionado à exposição a diferentes carcinógenos, assim como as lesões cancerizáveis (BOHRER et al., 2005). Salvadori, Ribeiro e Fenech (2003) afirmam que os testes de genotoxicidade representam uma parte importante da pesquisa do câncer, para avaliação do risco e possíveis carcinógenos. A toxicidade genética não é uma medida de carcinogenicidade, mas é, freqüentemente, usada como indicativo para o câncer, considerando que os testes medem um evento iniciante e intermediário na formação de tumores, e considerando a existência de altas associações entre respostas positivas em testes de toxicidade genética e carcinogenicidade, em roedores e no homem. Como resultado dessas considerações, os testes de toxicidade genética, incluindo o teste de micronúcleo *in vivo*, são usados, rotineiramente, na avaliação toxicológica inicial e no teste de novos medicamentos.

Bohrer et al., em 2005, avaliaram a presença de micronúcleos em células da mucosa bucal coletadas de três locais anatômicos em pacientes expostos a carcinógenos como fumo e álcool. Foram obtidas lâminas com células da mucosa bucal do lábio inferior, borda da língua e assoalho da boca, de 21 pacientes - controle, de 28 pacientes fumantes e de 19 usuários de fumo e álcool. As lâminas foram coradas com Feulgen para a quantificação de células micronucleadas e "broken eggs". Os resultados indicaram que os grupos foram similares na presença média de células micronucleadas e células apresentando cariorrexe. Em relação aos locais anatômicos, a média de células encontradas com cariorrexe foi maior no lábio inferior do que no bordo da língua ou no assoalho da boca (em todos os grupos). Um número significativo de "broken eggs" foi observado no grupo-controle quando comparado a grupos de pacientes usuários de fumo e álcool. Os autores constataram que um número alto de "broken eggs" em pacientes que não apresentaram fatores de risco a lesões cancerígenas sugere que essa alteração nuclear pode estar associada ao reparo do DNA ou à mucosa saudável. Foi observada uma tendência para um aumento no número de células micronucleadas em usuários de álcool e fumo em todos locais anatômicos.

Durante a análise do teste de micronúcleos, também devem ser levadas em consideração outras anomalias nucleares encontradas nos esfregaços citopatológicos da mucosa bucal, pois estas também refletem eventos que podem estar

ligados à carcinogênese. Dentre as anomalias celulares encontradas destacam-se: cariorrexe, picnose, cariólise, binucleação e “broken egg” (BOHRER, 2003). Ribeiro, em 2003, afirmou que uma vantagem da técnica de micronúcleos é a avaliação da frequência de outras anomalias provenientes de alterações do fuso de células em divisão mitótica, como pontes entre núcleos, núcleos irregularmente divididos.

O “broken egg” é descrito como uma forma nuclear bastante anômala, da qual não se sabe a origem ou significado. Bohrer (2003) acredita que o “broken egg” represente uma primeira alteração nuclear, provavelmente uma resposta adaptativa à ação do agente clastogênico. Quando essa ação é intensificada, origina-se um micronúcleo.

O uso concomitante do ensaio cometa e micronúcleos é recomendado na literatura, uma vez que a aplicação desse teste está relacionada ao surgimento de danos permanentes cromossômicos, enquanto aquele detecta injúrias reparáveis no DNA, portanto são complementares na avaliação da genotoxicidade (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Burgaz et al. (2002) realizaram um estudo com técnicos de laboratórios odontológicos a fim de avaliar os danos genéticos nas células nasais esfoliadas e linfócitos desses indivíduos. Para avaliar a genotoxicidade dos elementos metálicos, foi utilizada a técnica de micronúcleos. Os resultados indicaram que a exposição a metais como níquel, cromo e cobalto causou danos genotóxicos nos dois tipos de células analisadas. No entanto não foi possível verificar quais dos metais foram responsáveis pelos danos genotóxicos observados.

Em 2003, Faccioni et al. investigaram *in vivo* a biocompatibilidade e possíveis danos no DNA de células da mucosa bucal decorrente do uso de aparelhos ortodônticos fixos. Analisou-se a presença de íons metálicos em células da mucosa bucal, a citotoxicidade e os possíveis efeitos genéticos dos íons metálicos. Amostras da mucosa bucal de 55 pacientes ortodônticos e de 30 pacientes controle foram coletadas. As células foram imediatamente preparadas para testes de viabilidade celular e para o ensaio cometa alcalino. O conteúdo de níquel e cobalto foi quantificado pelo teste de espectrofotometria. Os resultados mostraram que a concentração de níquel e cobalto foi de 3,4 e 2,8 vezes mais altas, respectivamente, nos indivíduos com aparelhos do que do grupo-controle. A viabilidade celular também foi significativamente mais baixa nos pacientes com aparelho que nos do grupo-controle, havendo uma correlação negativa significativa com os níveis de metal. Os

efeitos biológicos avaliados pelo ensaio cometa alcalino indicaram que ambos os metais induzem danos no DNA. Os autores verificaram que as células da mucosa bucal de pacientes ortodônticos têm concentrações de níquel e cobalto significativamente maiores do que aquelas encontradas em indivíduos sem aparelho. As células com alta concentração de níquel e cobalto tiveram o DNA afetado. Assim, confirmou-se o potencial genotóxico dos íons níquel e cobalto e demonstrou-se que estes metais podem produzir danos no DNA de células da mucosa bucal.

Danadevi et al. (2004) afirmam que metais como cromo e níquel e seus compostos podem apresentar tanto resultados positivos como negativos em relação aos efeitos genotóxicos, não havendo um padrão definido. Estudos que avaliam a exposição crônica a estes metais mostram que a exposição ocupacional em soldadores pode aumentar os níveis de dano no DNA.

No mesmo ano, Eliades et al. propuseram caracterizar quantitativamente e qualitativamente a liberação de substâncias dos bráquetes e dos arcos de níquel-titânio e, comparativamente, avaliar a citotoxicidade dos íons liberados dos aparelhos ortodônticos. Para tanto foi realizada uma pesquisa *in vitro*, na qual a citotoxicidade e a atividade citostática dos materiais foram verificadas. Os autores constataram que os materiais ortodônticos avaliados não mostraram efeito na sobrevivência e síntese de DNA das células, portanto apresentando-se inócuos ao material genético celular.

Montanaro et al. (2005) avaliaram a mutagenicidade e genotoxicidade de ligas ortodônticas de aço inoxidável livres de níquel, em comparação com as ligas de aço convencionais. Empregaram testes *in vitro* (teste de troca de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas e teste de Ames) para avaliação dessas propriedades biológicas. Não foi observado potencial genotóxico nas ligas livres de níquel, sugerindo que elas poderiam representar uma alternativa melhor que as ligas de aço inoxidáveis convencionais.

## 2.4 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPERSENSIBILIDADE A METAIS E TOXICIDADE GENÉTICA

Pacientes portadores de dermatite de contato a metais apresentam resposta alérgica segundo um mecanismo ainda não completamente elucidado (RASANEN et al., 1991; MINANG et al., 2005), caracterizado por reações inflamatórias crônicas. Mignogna et al. (2004) afirmam que a presença de inflamação crônica está associada a uma variedade de tumores epiteliais.

Há possibilidade que muitos dos compostos químicos que produzem dermatite de contato alérgica em humanos possam ser carcinógenos ambientais. Em geral esses compostos são eletrofílicos e têm capacidade de formar pontes com proteínas e DNA (ALBERT, 1997). A carcinogenicidade do cromo é bastante caracterizada e associada à formação de pontes DNA–proteína, DNA-DNA e ao dano oxidativo (VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

É possível que o dano ao DNA seja uma etapa inicial no estado pré-imunológico da sensibilização por contato, confirmando a ação dessas substâncias no nível celular (CAVALLO et al., 2005). Tanto lesões oxidativas quanto as pontes DNA estão intimamente relacionadas à ocorrência de micronúcleos, uma vez que levam a clastogênese (quebra) ou aneugênese (perda) de cromossomos (FENECH, 2000).

### 3 PROPOSIÇÃO

**3.1** Avaliar a prevalência das reações de hipersensibilidade aos metais (níquel e cromo), através de aplicação do teste de contato, em grupo de pacientes, antes e dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico fixo:

- quanto às reações positivas e ao grau de hipersensibilidade aos metais.
- quanto ao uso do aparelho ortodôntico.
- quanto ao gênero.

**3.2** Verificar a toxicidade genética associada ao uso de aparelhos ortodônticos fixos, em grupo de pacientes, por meio de:

- Emprego do ensaio cometa antes e 10 dias após a montagem de aparelho ortodôntico fixo.
- Aplicação de teste de micronúcleos antes e 30 dias após a montagem de aparelho ortodôntico fixo.

**3.3** Verificar associação entre respostas positivas ao teste de contato (indivíduos sensíveis ao cromo e níquel) e presença de danos genéticos detectados pelos dois testes utilizados.

## 4 METODOLOGIA

Quarenta indivíduos participaram inicialmente da pesquisa, entre 11 e 34 anos, nas clínicas de dois cursos de pós-graduação em Ortodontia, para avaliação da hipersensibilidade a diferentes metais e toxicidade genética decorrente do uso de aparelhos ortodônticos fixos. Dos 40 indivíduos que iniciaram a pesquisa, 23 participaram integralmente das etapas do estudo. Os participantes foram submetidos a tratamento ortodôntico com a utilização de aparelhos ortodônticos fixos compostos de aço inoxidável: uma média de quatro anéis<sup>1</sup> e vinte bráquetes<sup>2</sup> (Anexos A e B).

Os pacientes foram informados da pesquisa por meio do consentimento livre e esclarecido (Apêndice A) e responderam a um questionário de saúde (Apêndice B) que forneceu dados em relação aos hábitos e à história médica dos participantes.

Para verificação da hipersensibilidade aos metais, foi aplicado o teste de contato (*Patch Test*). A toxicidade genética foi avaliada através do teste de micronúcleos e do ensaio cometa. As avaliações foram realizadas antes e após a montagem dos aparelhos ortodônticos conforme descrito a seguir:

### 4.1 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO)

Os 23 participantes foram encaminhados para realização dos testes de contato antes e em torno de dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico, para verificação de hipersensibilidade a dois metais constituintes dos aparelhos ortodônticos (cromo e níquel).

Os procedimentos foram realizados sob a supervisão de um Dermatologista e seguiram a seqüência descrita por Menezes (2000) (Figura 1, página 38).

---

<sup>1</sup> Marca comercial: Morelli - composição: Cr: 17 - 20%, Ni: 8 - 10%, Mo: máx. 0,60%.

<sup>2</sup> Marca comercial: 3M - Unitek - composição: C: máx. 0,7%, Mn: máx.1,0%, Si: máx. 1,0%, Cr: 15,5 - 17,5%, Ni: 3 - 5%, Cu: 3 - 5%, Nb e Ta: 0,15 - 0,45%.

### **Entrevista e avaliação pelo médico**

Os pacientes ou seus responsáveis responderam ao questionário de saúde (Apêndice B), elaborado especialmente para esta pesquisa, aplicado no primeiro dia do teste. O objetivo foi avaliar a história clínica e relatos de alergias, além de exame físico objetivo.

### **Seleção e limpeza da região para teste**

A região de eleição para realização dos testes de contato foi o antebraço. Essa região deveria apresentar a pele normal com epitélio intacto. As áreas selecionadas foram limpas com algodão embebido em álcool etanol 70%.

### **Preparo do material para teste**

Foi cortada uma faixa de fita adesiva estéril, hipoalergênica e microporosa, de aproximadamente 8 cm de comprimento, onde foram posicionados os dois contensores.<sup>3</sup>

Cada contensor recebeu uma substância a ser testada (sulfato de níquel e bicromato de potássio), mantendo-se sempre a mesma seqüência e posição de cada um.

### **Tempo de contato**

Os adesivos, com os contensores, foram posicionados e permaneceram em contato com a pele por 48 horas, quando foram removidos para realização das leituras.

### **Recomendações** (Apêndice C)

Os pacientes foram instruídos a, nessas 48 horas, não molhar a região do

---

<sup>3</sup> Marca comercial: Allergofarma®.

teste, evitar a realização de exercícios físicos e outras situações que pudessem favorecer a transpiração e traumas na região, não remover o material nesse período, com exceção daqueles que desenvolvessem extrema coceira ou dor, irritação local, com intenso desconforto ou febre.

### **Leitura dos testes**

A primeira leitura foi realizada pelo dermatologista, 48 horas após a aplicação do teste de contato. Nesse momento, os adesivos foram retirados, os resíduos removidos com álcool e os locais dos testes delimitados com lápis dermatográfico. Os resultados foram marcados a lápis, na ficha do paciente.

Após a leitura, os pacientes foram liberados e marcado retorno para 24 horas. Portanto, a terceira leitura (avaliação final) foi realizada 72 horas após a colocação dos adesivos, quando os resultados foram anotados definitivamente na ficha individual. O objetivo dessa leitura foi distinguir entre reações duvidosas e as positivas fracas.

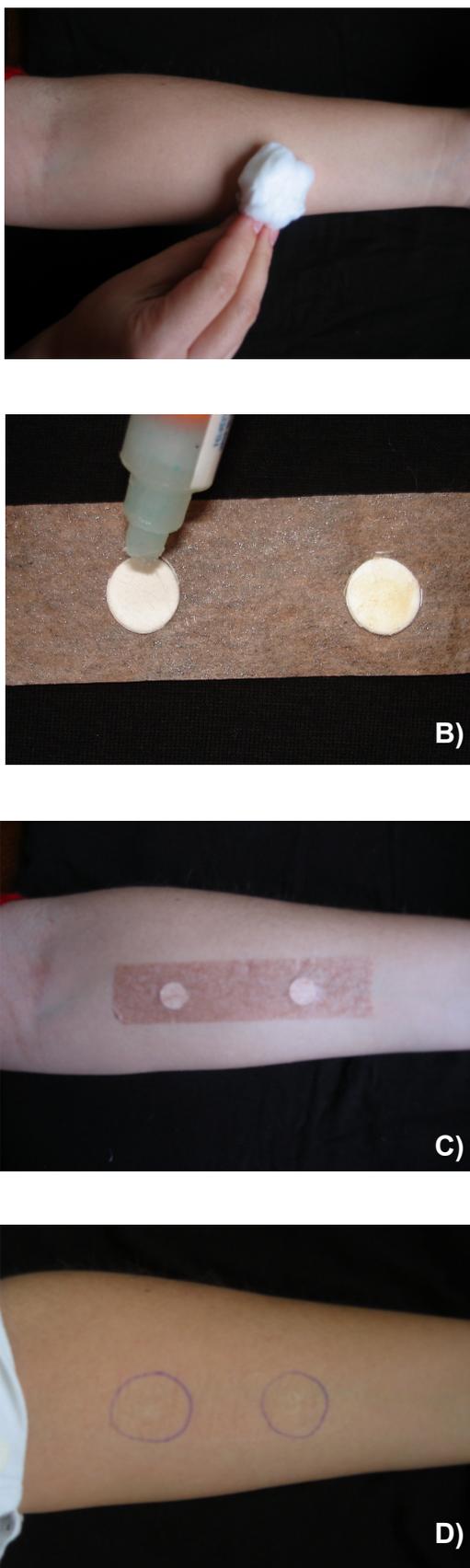
A leitura dos testes foi realizada com base na recomendação do “*International Research Contact Dermatitis Group*”, associando-se os resultados a escores, conforme utilizado por Menezes (2000). Os resultados de escore zero e um são considerados negativos e os escores dois, três e quatro positivos (Figura 2, página 39).

### **Documentação**

Foram realizadas fotografias do antebraço (região do teste de contato) dos pacientes nos momentos antes do teste, 48 e 72 horas após a remoção dos adesivos.

### **Montagem do aparelho**

Após a realização dos testes de contato, os pacientes foram liberados para montagem do aparelho ortodôntico, conforme a necessidade do caso. Aproximadamente dois meses após a colocação do aparelho realizou-se o segundo teste de contato, com a mesma metodologia descrita.



**Figura 1** - Etapas do teste de contato: A) Limpeza da região selecionada, com algodão embebido em álcool; B) Substância a ser testada sendo colocada no contensor; C) Adesivos e contensores posicionados no antebraço; D) Delimitação das áreas para leitura dos resultados.

<i>RESULTADO</i>	<i>ESCORE</i>	<i>REAÇÃO</i>	<i>EXEMPLO</i>
<b>NEGATIVO</b>	0	Ausência	
	1	Eritema leve	
<b>POSITIVO</b>	2	Eritema	
	3	Eritema + edema + pápulas	
	4	Eritema + edema + pápulas + vesículas	

**Figura 2** - Leitura dos testes de contato, de acordo com os graus das reações avaliadas.

**Fonte:** Menezes (2000).

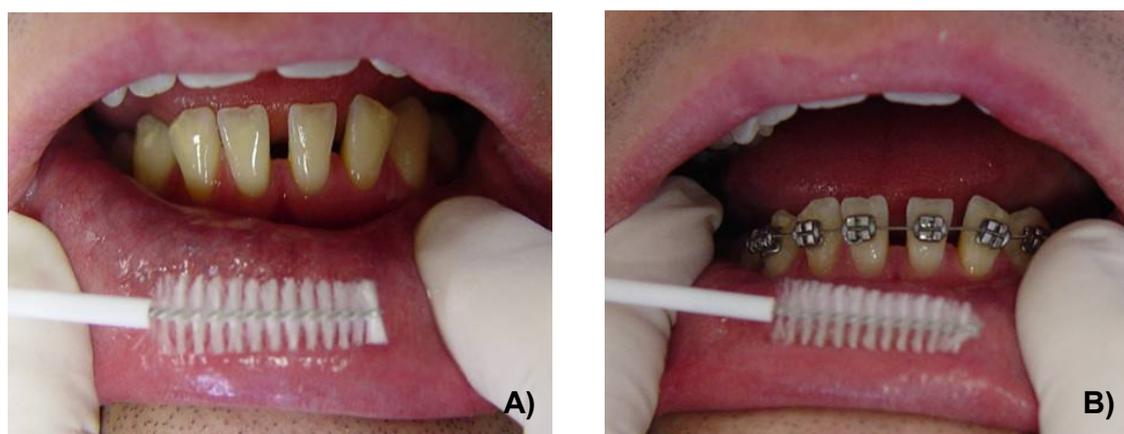
## 4.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS)

Para avaliação da toxicidade genética associada ao uso de aparelhos ortodônticos fixos utilizou-se o ensaio cometa e o teste de micronúcleos, descritos abaixo. Foi realizado um estudo *in vivo*.

Os testes foram realizados em dois momentos: antes da colocação (grupo-controle) do aparelho ortodôntico e após a sua montagem do mesmo, observando-se o período de 10 dias para o ensaio cometa e 30 dias para o teste de micronúcleos.

As amostras coletadas constituíram-se de células da mucosa bucal dos pacientes e seguiu os seguintes passos:

- Enxágüe da boca com água destilada, por duas vezes, a fim de remover células bucais esfoliadas, durante 2 minutos (BESERATI et al., 2000).
- Coleta de células da mucosa bucal na parte interna do lábio inferior com escova citológica (cytobrush)<sup>4</sup>, que é uma técnica recomendada na literatura (JONES; PINK; SANDOW, 1994). A escova foi pressionada e girada durante 30 segundos na mucosa do lábio inferior. O processo foi realizado por um único operador (Figura 3).



**Figura 3** – Coleta de células da mucosa bucal: A) Antes; B) 10 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.

<sup>4</sup> Marca comercial: Adlin Plásticos Ltda.

- Para o ensaio cometa, a amostra coletada foi armazenada em microtubos (1,5 ml)<sup>5</sup> contendo de 250 µl de tampão fosfato salina (PBS).
- O material coletado, para o teste de micronúcleos, foi levado para tubos de polietileno (50 ml)<sup>6</sup> contendo 20 ml de tampão fosfato salina (PBS).

#### **4.2.1 Ensaio cometa**

O ensaio cometa foi desenvolvido no Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul sediado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, seguindo o protocolo padrão utilizado neste laboratório, de acordo com Franke et al. (2005) (Anexo C).

Para avaliação dos danos obtidos, 50 células foram classificadas para cada indivíduo (25 células para cada lâmina – sendo realizadas duas lâminas por paciente). A análise foi executada em microscópio óptico<sup>7</sup> com aumento de 1000 X. O nível de dano é determinado pela extensão de DNA migrada fora do núcleo, apresentando uma aparência de um cometa ou cauda.

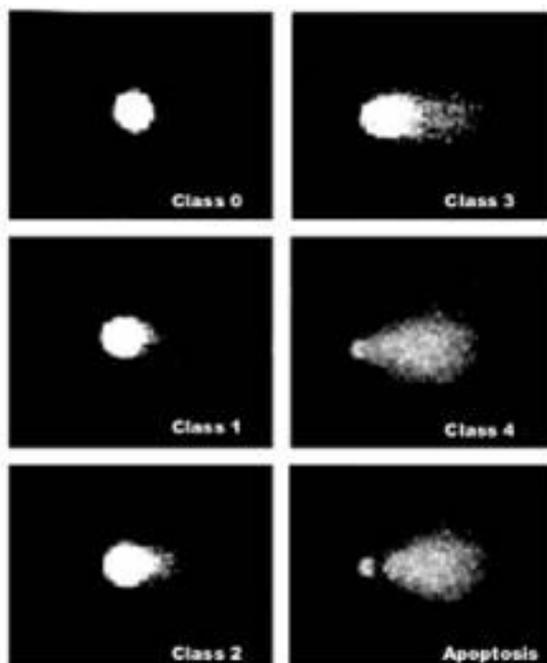
As células foram classificadas por um método visual, de acordo com o tamanho de cauda das células em cinco classes, de classe zero (ausência de dano) até classe quatro (grau máximo de dano), conforme descrito por Speit; Hartmann (1999) (Figura 4, página 42).

---

<sup>5</sup> Marca comercial: Eppendorf.

<sup>6</sup> Marca comercial: Falcon.

<sup>7</sup> Marca comercial: Zeiss



**Figura 4** – Classificação visual das células em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda.

**Fonte:** [www.cometassay.com](http://www.cometassay.com), acesso 15/10/05.

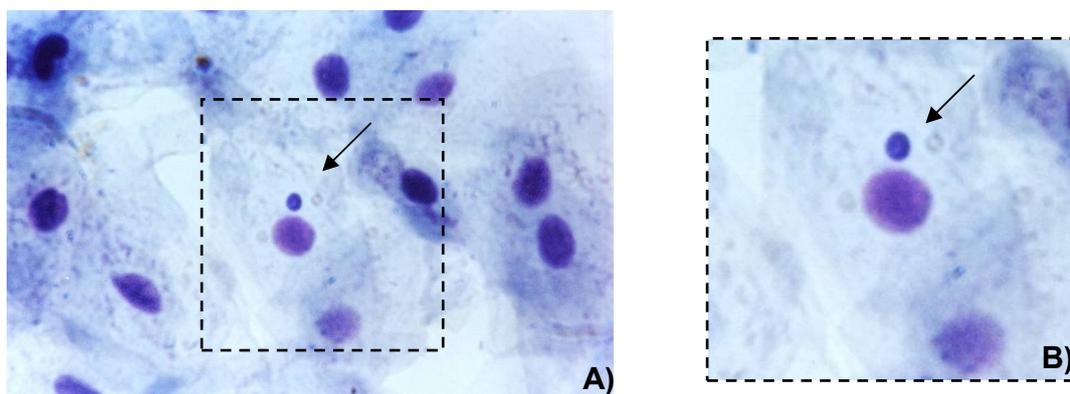
Um índice de dano individual foi obtido pela soma dos produtos resultantes da multiplicação do número de células em cada classe pelo valor correspondente à classe de dano (zero - quatro), segundo a fórmula que se segue: índice de dano = (número de células classe zero X zero) + (número de células classe um X um) + (número de células classe dois X dois) + (número de células classe três X três) + (número de células classe quatro X quatro). O índice de dano poderá variar de zero, quando todas as células apresentam ausência de dano (50 x zero), até 200, quando todas as células apresentam dano máximo (50 x quatro).

#### **4.2.2 Teste de micronúcleos**

O teste de micronúcleos foi realizado no Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da PUCRS e o preparo das lâminas, seguiu o protocolo descrito por Titenko-Holland, Moore e Smith (1994) (Anexo D).

Após preparadas as lâminas, as células da mucosa bucal foram analisadas em microscópio óptico<sup>8</sup> com aumento de 1000 X. Para cada paciente foram realizadas três lâminas, das quais foram avaliadas 1000 células. Apenas as células que não estavam sobrepostas, cobertas, aglomeradas e que apresentaram núcleo intacto foram incluídas na análise. A partir de então, foi realizada a contagem da frequência dos micronúcleos nessas células, com auxílio de um contador, sendo os dados registrados em tabelas. Os micronúcleos duvidosos foram desconsiderados. Em relação à caracterização dos micronúcleos, estes deviam seguir os seguintes critérios, propostos por Sarto et al. (1987) (Figura 5):

- Ser menor que um terço do diâmetro do núcleo principal
- Possuir cor similar, textura e refração do núcleo principal
- Apresentar forma arredondada ou oval
- Estar claramente separado do núcleo principal.



**Figura 5** – A) e B) Presença de micronúcleo (seta) em células epiteliais da mucosa bucal com aumento de 1000 X. B) Maior aumento da região delimitada.

---

<sup>8</sup> Marca comercial: Zeiss.

### **Tratamento estatístico**

Os dados foram organizados em tabelas e gráficos.

Para o teste de contato empregaram-se: Teste Exato de Fisher, McNemar, Wilcoxon e estatística descritiva.

Para o ensaio cometa aplicou-se análise estatística descritiva e para o teste de micronúcleos, o teste de Wilcoxon.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO)

Na avaliação em relação à prevalência de reações positivas e negativas ao teste de contato, observou-se que no período antes e dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico, o níquel apresentou maior número de reações positivas que o cromo, através de análise estatística descritiva. (Tabelas 1 e 2).

**Tabela 1** - Comparação dos resultados do teste de contato entre os materiais níquel e cromo: antes da montagem do aparelho ortodôntico.

<b>Teste de Contato Ni</b>	<b>Teste de Contato Cr</b>		<b>Total (%)</b>
	<i>Negativo (%)</i>	<i>Positivo (%)</i>	
Negativo (%)	19 (82,6)	0 (0)	19 (82,6)
Positivo (%)	3 (13,0)	1 (4,3)	4 (17,4)
Total (%)	22 (95,6)	1(4,3)	23 (100)

**Tabela 2** - Comparação dos resultados do teste de contato entre os materiais níquel e cromo: dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico.

<b>Teste de Contato Ni</b>	<b>Teste de Contato Cr</b>		<b>Total (%)</b>
	<i>Negativo (%)</i>	<i>Positivo (%)</i>	
Negativo (%)	18 (78,3)	0 (0)	18 (78,3)
Positivo (%)	3 (13,0)	2 (8,7)	5 (21,7)
Total (%)	21 (91,3)	2 (8,7)	23 (100)

Através dos resultados do teste não paramétrico McNemar observou-se que não houve alteração significativa das reações de contato aos metais avaliados ( $\chi^2=1,0$ ;  $p>0,05$ ) nos períodos antes e dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico. Portanto verificou-se que o aparelho ortodôntico não apresentou potencial de sensibilização nos indivíduos avaliados (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 3** - Comparação dos resultados do teste de contato ao níquel entre os períodos antes e dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico.

<b>Teste de Contato - Antes</b>	<b>Teste de Contato – Após</b>		<b>Total (%)</b>
	<i>Negativo (%)</i>	<i>Positivo (%)</i>	
Negativo (%)	18 (78,3)	1 (4,3)	19 (82,6)
Positivo (%)	0 (0)	4 (17,4)	4 (17,4)
Total (%)	18 (78,3)	5 (21,7)	23 (100,0)

**Tabela 4** - Comparação dos resultados do teste de contato ao cromo entre os períodos antes e dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico.

<b>Teste de Contato - Antes</b>	<b>Teste de Contato - Após</b>		<b>Total (%)</b>
	<i>Negativo (%)</i>	<i>Positivo (%)</i>	
Negativo (%)	20 (87,0)	2 (8,6)	22 (95,7)
Positivo (%)	1 (4,3)	0 (0)	1 (4,3)
Total (%)	21 (91,3)	2 (8,6)	23 (100,0)

Quando se avaliou a prevalência de reações positivas ao teste de contato entre os gêneros feminino e masculino, os resultados do teste exato de Fisher mostraram que não houve associação significativa entre os resultados positivos do teste de contato e os gêneros para o níquel ( $\chi^2=2,79$ ;  $p=0,13$ ) e cromo ( $\chi^2 =0,96$ ;  $p=0,47$ ) após o tratamento ortodôntico. No entanto todas as reações positivas para ambos os metais foram observadas em mulheres (Tabelas 5 e 6).

**Tabela 5** - Comparação dos resultados do teste de contato após a montagem do aparelho ortodôntico entre os gêneros em relação ao níquel.

<b>Teste de Contato</b>	<b>Gênero</b>		<b>Total (%)</b>
	<i>Masculino (%)</i>	<i>Feminino (%)</i>	
Negativo (%)	7 (100)	11 (68,8)	18 (78,3)
Positivo (%)	-	5 (31,3)	5 (21,7)
Total (%)	7 (100)	16 (100)	23 (100)

**Tabela 6** - Comparação dos resultados do teste de contato após o tratamento ortodôntico entre os gêneros em relação ao cromo.

<b>Teste de Contato</b>	<b>Gênero</b>		<b>Total (%)</b>
	<i>Masculino (%)</i>	<i>Feminino (%)</i>	
Negativo (%)	7 (100)	14 (87,5)	21 (91,3)
Positivo (%)	-	2 (12,5)	2 (8,7)
Total (%)	7 (100)	16 (100)	23 (100)

Quando se avaliou a intensidade das reações ao teste de contato para os metais níquel e cromo verificou-se diferença significativa através da aplicação do teste de Wilcoxon, sendo que o níquel apresentou escores superiores ao cromo antes da montagem do aparelho ortodôntico (Tabela 7) ( $p=0,03$ ).

**Tabela 7** - Comparação dos resultados do teste de contato entre níquel e cromo: antes da montagem do aparelho ortodôntico, de acordo com os diferentes escores.

<b>Teste de Contato Ni</b>	<b>Teste de Contato Cr</b>			<b>Total (%)</b>
	<b>Escore 0 (%)</b>	<b>Escore 1(%)</b>	<b>Escore 2 (%)</b>	
Escore 0 (%)	14 (60,9)	1 (4,3)	-	15 (65,2)
Escore 1 (%)	4 (17,4)	-	-	4 (17,4)
Escore 2 (%)	-	-	1 (4,3)	1 (4,3)
Escore 3 (%)	3 (13,0)	-	-	3 (13,0)
Total (%)	21 (91,3)	1 (4,3)	1 (4,3)	23 (100)

## 5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS)

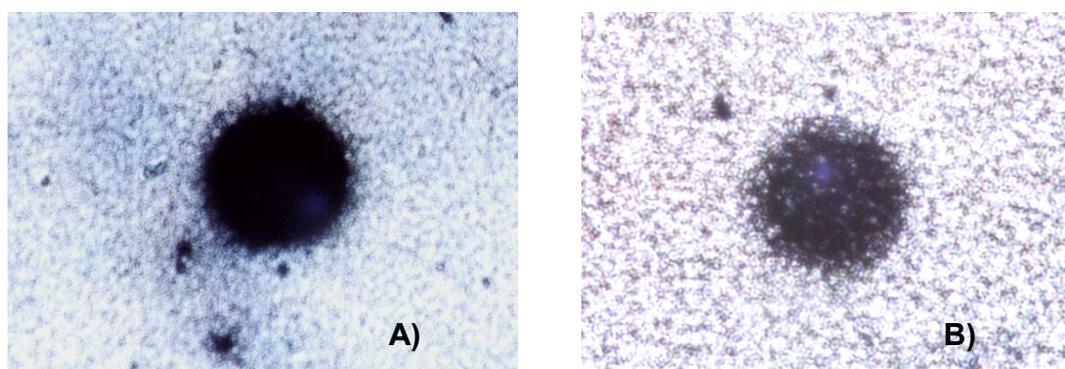
### 5.2.1 Ensaio cometa

Dos 23 pacientes que participaram das coletas, foi possível analisar as lâminas de seis indivíduos. Foi detectado um nível baixo de dano no DNA, como pode ser verificado pelos valores reduzidos de índice de dano, tanto antes ( $1,5 \pm 1,05$ ) quanto após ( $2,5 \pm 3,08$ ) a montagem do aparelho ortodôntico (Tabela 8, página 49). Portanto, a montagem de aparelhos ortodônticos não induziu um aumento significativo no nível de danos primários ao DNA, detectáveis pelo ensaio cometa.

**Tabela 8 –** Índice de dano antes e após 10 dias da montagem do aparelho ortodôntico na amostra estudada.

Períodos Avaliados	ÍNDICE DE DANOS		
	Média	Desvio padrão	Nº casos
Antes	1,5	± 1,05	6
10 dias	2,5	± 3,08	6

A Figura 6 mostra células da mucosa bucal nos dois períodos avaliados, classificadas como grau zero que representaram quase a totalidade dos resultados encontrados.



**Figura 6 –** Células da mucosa bucal (aumento de 1000 X) de paciente gênero masculino, de 11 anos de idade, com classificação classe 0, nos períodos antes (A) e após 10 dias (B) da montagem do aparelho ortodôntico.

### 5.2.2 Teste de Micronúcleos

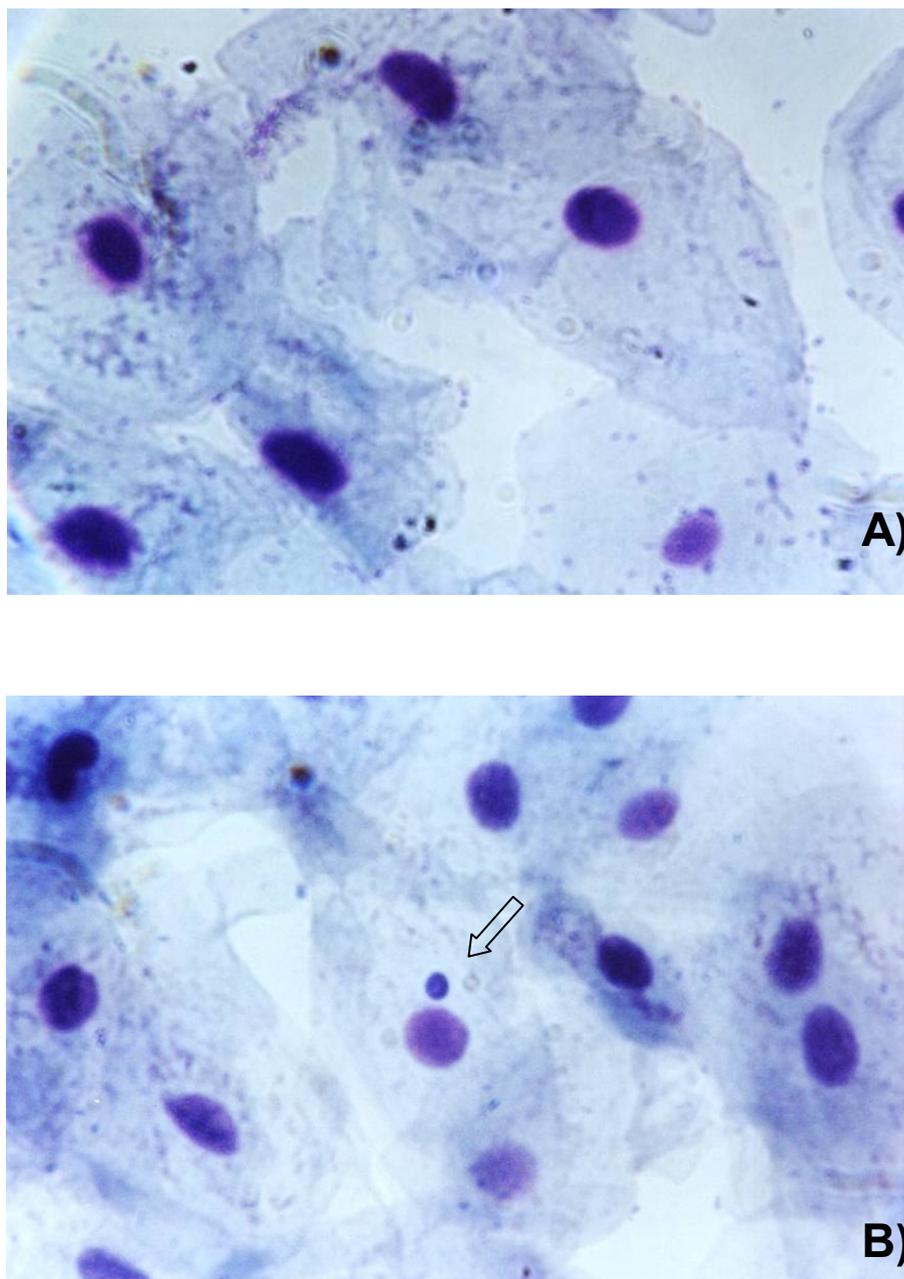
Foram realizadas lâminas dos 23 participantes, sendo possível a avaliação de 20 pacientes. A verificação da frequência de micronúcleos na amostra mostrou que

houve um aumento significativo dos micronúcleos no período de 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico, dados obtidos através da aplicação do teste não paramétrico de Wilcoxon ( $p=0,04$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9** - Comparação das quantidades de micronúcleos nos períodos antes e 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.

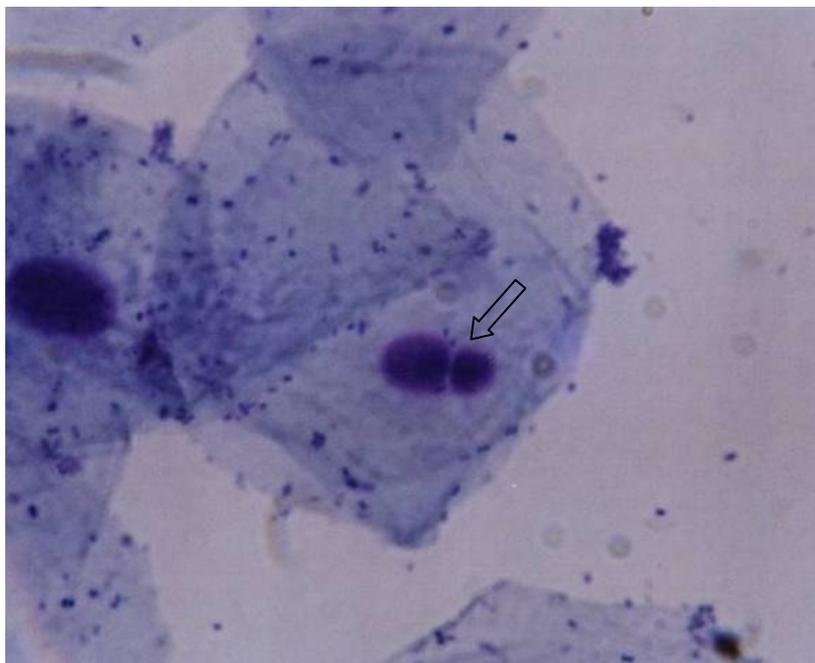
Quantidade MN	Antes		30 dias	
	Nº casos	%	Nº casos	%
<b>0</b>	23	100	15	75,0
<b>1</b>	-	-	1	5,0
<b>2</b>	-	-	2	10,0
<b>3</b>	-	-	2	10,0
<b>Total</b>	23	100	20	100

A Figura 7, na página 51, mostra a presença de micronúcleos no período de 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.



**Figura 7 –** Células da mucosa bucal (aumento 1000X) de paciente do gênero feminino com 24 anos de idade. A) Antes da colocação do aparelho ortodôntico; B) Após 30 dias da montagem do aparelho ortodôntico. Observar a presença de micronúcleo (seta).

Nesta pesquisa observou-se a presença de “broken egg” (Figura 8), após 30 dias da montagem do aparelho ortodôntico, em três lâminas (5%).



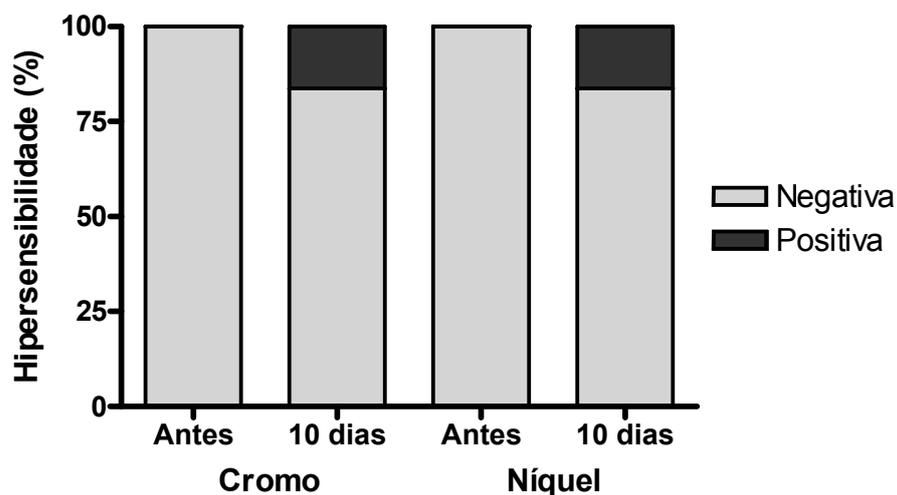
**Figura 8** - Presença de “broken egg” em célula epitelial da mucosa bucal no período de 30 dias após da montagem do aparelho ortodôntico, em paciente do gênero feminino com 16 anos de idade.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO) E TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS)

#### ***5.3.1 Avaliação da associação entre hipersensibilidade a metais (teste de contato) e teste cometa***

Para essa avaliação foi considerada a leitura das lâminas de seis participantes. Em relação à associação dos resultados do ensaio cometa (índice de danos baixo, indicando ausência de danos no DNA) e do teste de contato após a

montagem do aparelho ortodôntico, foi observado que dos pacientes avaliados apenas 16,6%, mostraram reações positivas a ambos os metais (Gráfico 1). Dessa forma, não foi observada associação entre a presença de reações positivas no teste de contato aos metais e aumento de danos no DNA detectados pelo ensaio cometa.



**Gráfico 1** – Reações de hipersensibilidade na amostra que foi avaliada através do teste cometa.

### **5.3.2 Avaliação da associação entre hipersensibilidade a metais (teste de contato) e testes de micronúcleos**

A Tabela 10, página 54 evidencia que não houve associação significativa entre os resultados do teste de contato ao níquel e a presença de micronúcleos após a montagem do aparelho ortodôntico, através do teste de Wilcoxon ( $\chi^2 = 1,67$ ;  $p=0,25$ ). Foi considerada para essa avaliação a leitura de lâminas de 20 pacientes.

**Tabela 10** - Teste de contato ao níquel e presença de micronúcleos 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.

<b>Teste de Contato</b>	<b>Micronúcleos – 30 dias</b>		<b>Total(%)</b>
	<i>Ausente (%)</i>	<i>Presente (%)</i>	
Negativo (%)	13 (86,7)	3 (60,0)	16 (80,0)
Positivo (%)	2 (13,3)	2 (40,0)	4 (20,0)
Total (%)	15 (100)	5 (100)	20 (100)

Para o metal cromo, observou-se que houve associação significativa dos resultados do teste de contato e presença de micronúcleos após a montagem do aparelho ortodôntico. Constatou-se que o resultado do teste de contato positivo ao metal estava associado à presença de micronúcleos, através do teste de Wilcoxon ( $\chi^2=6,67$ ;  $p=0,05$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11** - Teste de contato do cromo e presença de micronúcleos 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.

<b>Teste de Contato</b>	<b>Micronúcleos – 30 dias</b>		<b>Total (%)</b>
	<i>Ausente (%)</i>	<i>Presente (%)</i>	
Negativo (%)	15 (100)	3 (60,0)	18 (90,0)
Positivo (%)	-	2 (40,0)	2 (10,0)
Total (%)	15 (100)	5 (100)	20 (100)

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO)

A verificação das reações de hipersensibilidade aos metais foi obtida através do Teste de Contato (*Patch Test*) que é considerado um método rotineiro e seguro para avaliação de resposta dos tecidos cutâneos (BLANCO DALMAU; CARRAQUILLO-ALBERTY; SILVA PARRA, 1984; VALLYSEVI; MADDOX; LI, 1999).

Os resultados do teste de contato podem variar conforme a leitura do teste e época de sua realização, de acordo com a amostra, concentração do sal, veículo e local de aplicação do teste (JANSON et al., 1998). Como realizado por Menezes et al. (2004), procurou-se padronizar ao máximo os procedimentos, como aplicação e leitura do teste por um único examinador, em ambiente adequado, mantendo-se iluminação constante, utilização de substâncias do mesmo laboratório, e recomendações padronizadas aos participantes. Na pesquisa, as avaliações foram realizadas por um médico dermatologista, o que é recomendado e essencial (GRIMAUDO, 2001; RAHILY; PRICE, 2003), especialmente em relação ao níquel, pois as dermatites alérgicas de contato decorrentes desse metal são de difícil diferenciação de reações tóxicas irritativas (SHUSTER et al., 2004). A eleição do braço, como local para aplicação do teste de contato, está de acordo com a pesquisa de Janson et al. (1998), que afirmam que, ao se utilizar essa área, há uma diminuição na ocorrência de reações com resultados falsos positivos, e que, quando a região das costas é utilizada, são observadas, freqüentemente, reações alérgicas e irritantes.

A aplicação do teste de contato não é unanimidade. Alguns autores alegam que há possibilidade de apresentarem “falsos positivos” e de sensibilizarem o paciente (BISHARA; BARRETT; SELIM, 1993; MATASA, 1995). Em contrapartida, Pimentel e Matta (1998) apontam que a obtenção de resultados falsos positivos é verificada quando existe concentração elevada ou inadequada da substância testada, veículo impróprio, área da pele lesada ou reações à fita adesiva empregada. Jensen et al. (2002) afirmam que o risco de sensibilização primária pelo teste de contato é extremamente baixo.

A prevalência de reações positivas ao níquel observada nessa pesquisa foi de 17,4% e 21,7% (Tabelas 1 e 2, página 45) nos períodos antes e dois meses após a montagem do aparelho, respectivamente. Esses dados concordam com a literatura que mostra que o níquel é o íon mais comum na etiologia da hipersensibilidade a metais (JANSON et al., 1998; RAHILY; PRICE, 2003; KALIMO; MATILLA; KAUTIAINEN, 2004; LEVRINI; LUSVARDI; GENTILE, 2006), provocando mais reações do que todos os metais combinados (BASS; FINE; CISNEROS, 1993; LOWEY, 1993). A prevalência de hipersensibilidade a esse metal é significativa, sendo estimada entre 8 a 30% na população em geral (MENNÉ et al., 1987; GRIMSDOTTIR; GJERDET; HENSTEN-PETERSEN, 1992; BASS; FINE; CISNEROS, 1993; JONES et al. 1996; GRIMAUDO, 2001).

O cromo é a segunda causa mais freqüente de dermatite de contato (PARK; SHEARER, 1983). Sendo considerada a forma mais comum na etiologia das alergias ocupacionais (KANERVA et al., 2000). Na população estudada constatou-se esse dado, uma vez que esse metal mostrou valores de prevalência 4,3% e 8,7% antes e dois meses após o tratamento ortodôntico (Tabelas 1 e 2, página 45). Os valores de prevalência de reações ao cromo encontrados nesse estudo estão de acordo com Wataha (2000) que evidenciou que 8% da população em geral é sensível a esse metal.

Nesta pesquisa objetivou-se avaliar a influência dos aparelhos ortodônticos, na cavidade bucal, sobre a reação de hipersensibilidade aos metais, em dois momentos: antes e depois da montagem do aparelho fixo.

Foi observado que não houve alteração significativa das reações de contato para o níquel e cromo no período antes e dois meses após a montagem do aparelho (Tabelas 3 e 4, página 46). Assim, constatou-se que o aparelho ortodôntico não sensibilizou os pacientes, concordando com achados da literatura (LENZA et al., 1993, 1997; BASS; FINE; CISNEROS, 1993; JANSON et al., 1998; KERUSUO et al., 1996; MENEZES et al., 2004, SAGLAN; BAYSAL; CEYLAN, 2004).

A utilização de aparelhos ortodônticos tem sido associada a algumas reações de hipersensibilidade. O Quadro 2 mostra casos clínicos relacionados a essas reações.

<b>Autores</b>	<b>Gênero, idade do paciente</b>	<b>Aparelho utilizado</b>	<b>Localização da lesão</b>	<b>Sinais e sintomas</b>
Coutns et al. (2002)	Feminino, 11 anos	Barra transpalatina	Mucosa bucal	Hipertrofia gengival
Mancusso, Berdondini (2002)	Feminino, 13 anos	Aparelho removível – aço inoxidável	Região periorbital	Dermatite nas pálpebras e conjuntivite
De Silva, Doherty (2000)	Masculino, 12 anos	Aparelho fixo – níquel titânio	Região bucal, orbital e couro cabeludo	Eczemas peribucais, perda de cabelo
Menezes et al. (1997)	Feminino, 27 anos	Aparelho extrabucal	Pescoço	Urticária, irritação e vesículas
Kerusuo, Kanerva (1997)	Masculino, 14 anos	Aparelho extrabucal	Lábios	Vesículas
Waheidi (1995)	Masculino, 14 anos	Aparelho fixo – níquel Titânio	Lábios e mucosa bucal	Queimação e ulcerações
Bishara (1995)	Feminino, 12 anos	Contenção com solda	Mucosa bucal - bochechas	Irritação e inflamação

**Quadro 2** - Representação de alguns trabalhos que mostraram casos clínicos de reações de hipersensibilidade aos aparelhos ortodônticos.

Na avaliação da intensidade das reações, verificou-se que o níquel apresentou escores superiores ao cromo antes da montagem do aparelho ortodôntico (Tabela 7, página 48). Esses achados concordam com autores como Matasa (1995), Menezes et al. (2004) que afirmam que vários metais podem provocar reações de hipersensibilidade, mas nenhum pode ser comparado ao níquel

em relação à extensão e gravidade dos problemas causados. Menezes et al. (2004) verificaram que o níquel foi a única substância capaz de causar respostas severas em comparação a outros metais que também provocaram reação positiva (cromo e magnésio).

Em relação à frequência de reações positivas nos gêneros feminino e masculino, os dados estatísticos mostraram que não houve associação significativa entre os resultados positivos do teste de contato ao antígeno níquel. Esse fato provavelmente decorreu do número reduzido da amostra, uma vez que dos 40 indivíduos que concordaram em participar da pesquisa, apenas 16 mulheres e 7 homens realizaram de maneira integral as etapas do teste de contato. No entanto, constatou-se que todos os casos de reações positivas (100%) ocorreram em mulheres. A literatura evidencia esses achados mostrando que a prevalência é superior no gênero feminino (BLANCO DALMAU; CARRAQUILLO-ALBERTY; SILVA PARRA, 1984; JONES et al. 1996; NIELSEN; MENNÉ, 1993; KERUSUO et al., 1996; JANSON et al., 1998; GRIMAUDO, 2001; NIELSEN et al., 2002; KALIMO; MATILLA; KAUTIAINEN, 2004; MENEZES et al., 2004; SAGLAN; BAYSAL; CEYLAN, 2004).

Quando se compararam as reações de hipersensibilidade ao cromo entre os gêneros, observou-se que todos os indivíduos sensíveis foram do gênero feminino, apesar de não ter sido verificada associação estatística significativa, provavelmente em função do número reduzido da amostra. Esses achados discordam de Kanerva et al. (2000) e Menezes et al. (2004), que encontraram uma maior prevalência de reações positivas ao cromo em indivíduos do gênero masculino.

## 6.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS)

Sabe-se que os aparelhos ortodônticos, quando presentes na cavidade bucal, demonstram a capacidade de liberação de íons metálicos através do processo corrosivo (WATAHA, 1995). A esses elementos tem-se atribuído ação de mediadores nas respostas mutagênicas e carcinogênicas (CURRENTS CONFERENCES, 1984; OLLER; COSTA; OBERDORSTER, 1997; NOVELLI et al.,

1998; WATAHA, 2000; DAYAN; PAINE, 2001; BURGASZ et al., 2002; ZORODDU et al. 2002).

A presente pesquisa avaliou a toxicidade genética dos aparelhos ortodônticos constituídos de aço inoxidável, por meio do emprego do ensaio cometa e do teste de micronúcleos.

### **6.2.1 Ensaio cometa**

A técnica de aplicação do teste cometa seguiu o protocolo padrão utilizado pelo Laboratório de Radiobiologia Molecular do Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul conforme preconizado por Franke et al. (2005) (Anexo C). Empregou-se a coloração com prata que apresenta as seguintes vantagens em relação à coloração tradicional com agentes fluorescentes: redução de risco à contaminação por não necessitar o uso de brometo de etídeo (carcinógeno), redução do custo e aumento da nitidez da análise por dispensar a necessidade do uso de microscopia de fluorescência e aumento da confiabilidade das análises por permitir que as lâminas sejam armazenadas por longos períodos para conferência dos resultados. Para avaliação dos resultados utilizou-se a classificação visual das células em diferentes classes (Figura 4, página 42) e aplicação da fórmula do índice de dano, que são consideradas maneiras eficientes e rápidas para verificação de danos verificados pelo ensaio cometa (SPEIT; HARTMANN, 1999).

Foram realizadas lâminas das células do epitélio bucal dos 23 participantes da pesquisa. No entanto, as células de apenas seis pacientes puderam ser avaliadas. As lâminas dos demais pacientes não estavam satisfatórias, provavelmente em decorrência do protocolo de preparo empregado, que foi o protocolo padrão para linfócitos. A aplicação do ensaio cometa em células da mucosa bucal foi publicada (SZETO et al., 2005) quando já tinham sido iniciados os experimentos.

A segunda coleta de células, realizada no período de dez dias após a montagem do aparelho ortodôntico, justifica-se pelo fato de que o emprego desse teste está vinculado a uma necessidade de tempo de exposição curto ao agente nocivo (SPEIT; HARTMANN, 1999; SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Existem poucos estudos na Odontologia com a utilização de ensaio cometa (LI; DUNIPACE; STOOKEY, 1988). Há uma maior aplicação desse teste em populações expostas ocupacionalmente a agentes mutagênicos (WATAHA, 2000; DANADEVI et al., 2004; VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005). Nesta pesquisa empregou-se o ensaio cometa em pacientes ortodônticos, sendo que a tendência dos resultados do teste desses seis casos (Tabela 8, página 49) mostrou que os aparelhos ortodônticos fixos não induziram aumento no nível de danos reparáveis no DNA (valores médios de 1,5 e de 2,5, nos períodos antes e 10 dias após a montagem do aparelho). Entretanto esses dados devem ser analisados com cautela, em função do número reduzido da amostra. Faccioni et al. (2003), quando aplicaram o ensaio cometa em 55 pacientes ortodônticos e 30 pacientes-controle, verificaram que os íons metálicos constituintes dos aparelhos ortodônticos (níquel e cobalto) podem produzir quebras no DNA em células da mucosa bucal. Dessa forma, sugere-se que mais pesquisas, com número maior de amostras, e com utilização do protocolo do ensaio cometa em células da mucosa bucal sejam realizadas.

### **6.2.2 Teste de micronúcleos**

A técnica do teste de micronúcleos empregada seguiu o protocolo de Titenko-Holland, Moore e Smith (1994) (Anexo D), que é amplamente utilizado e reconhecido internacionalmente. Foram realizadas três lâminas para cada paciente, com o objetivo de possibilitar a leitura de 1000 células de cada participante, o que está de acordo com as recomendações do protocolo adotado. Dos 23 participantes, 20 puderam ter a contagem de 1000 células em suas amostras. Os três pacientes que não foram incluídos na análise não apresentaram número suficiente de células (1000).

Esse teste encontra ampla utilização em células de linfócitos (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). No entanto, quando o tecido estudado é o epitelial, a técnica de micronúcleos apresenta vantagens sobre o emprego em linfócitos, uma vez que as células do tecido alvo podem ser diretamente estudadas e a coleta não é invasiva. Além disso, Stich, Curtis e Parrida (1982); Sarto et al. (1987) e Bloching et

al. (2000) afirmam que a análise de micronúcleos em células da mucosa bucal apresenta suficiente validade e sensibilidade.

O período de coleta das células epiteliais, além da anterior ao aparelho, foi de aproximadamente 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico, em decorrência do aparecimento de micronúcleos ser detectado após a divisão celular e a um tempo de exposição ao agente nocivo mediano (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Quando se avaliou a freqüência de micronúcleos, observou-se um aumento de células micronucleadas no período de 30 dias após a montagem dos aparelhos ortodônticos. Em um caso houve a presença de um micronúcleo, já o aumento na quantidade de micronúcleos (dois a três) foi observado em quatro casos (Tabela 9, página 50). Esses dados poderiam ser indicativos do papel dos aparelhos ortodônticos como agentes indutores de danos cromossômicos. No entanto, é necessário que mais pesquisas sejam realizadas para confirmar esse potencial. Uma avaliação controlada e a longo prazo dos pacientes ortodônticos, é uma maneira válida de verificar esse efeito.

Embora a técnica de micronúcleos seja uma maneira aceita internacionalmente para avaliação de danos genéticos (FENECH, 2000; RIBEIRO, 2003; SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003), ainda não existem trabalhos com aplicação dessa técnica em pacientes ortodônticos. O emprego desse teste foi observado em técnicos de laboratórios odontológicos a fim de avaliar a genotoxicidade dos elementos metálicos nas células nasais esfoliadas e nos linfócitos desses indivíduos (BURGAZ et al., 2002).

Uma vantagem do teste de micronúcleos é que essa técnica permite analisar, na mesma preparação, além da presença de micronúcleos, anomalias celulares como o “broken egg”, que é descrito como uma forma nuclear bastante anômala, da qual não se sabe a origem ou significado (BOHRER, 2003; SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). A presença dessa alteração pode estar ligada à carcinogênese (BOHRER, 2003). No entanto, Bohrer et al. (2005) observaram uma associação dessa estrutura com presença de mucosa saudável. Nesta pesquisa observou-se a presença de “broken egg” apenas após 30 dias da montagem do aparelho ortodôntico, em poucas lâminas (2%) (Figura 8, página 52), o que está em desacordo com a literatura que afirma que essa estrutura é observada com grande freqüência em esfregaços da mucosa bucal (BOHRER et al., 2005).

O uso concomitante do ensaio cometa e do teste de micronúcleos para avaliação de danos genéticos é extremamente recomendado, uma vez que esses testes apresentam características complementares e singulares indicando danos específicos no DNA (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). Observa-se que o emprego simultâneo de ambos os testes não é encontrado em pesquisas ligadas à Ortodontia. Em contrapartida, verifica-se a aplicação de testes *in vitro* (teste de troca de cromátides irmãs e aberrações cromossômicas e teste de Ames) na avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade de materiais ortodônticos como as ligas de aço inoxidáveis convencionais e livres de níquel (MONTANARO et al., 2005).

Quando se avaliaram os resultados dos dois testes (Tabela 8, página 49 e Tabela 9, página 50), observou-se que o ensaio cometa apresentou resultados negativos em relação à presença de danos reparáveis no DNA, no entanto o teste de micronúcleos mostrou presença de possíveis injúrias que permanecem após o ciclo mitótico. Assim, sugere-se um acompanhamento desses pacientes a longo prazo, a fim de avaliar os danos cromossômicos observados nessa população.

Eliades et al. (2004) afirmam que não há um consenso em relação às propriedades biológicas das substâncias liberadas pelos aparelhos ortodônticos, assertiva que foi evidenciada neste estudo. Dessa forma, é necessário que mais pesquisas na área da genotoxicidade dos materiais ortodônticos sejam realizadas, o que é importante para a avaliação da biocompatibilidade desses materiais na clínica.

### 6.3 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE HIPERSENSIBILIDADE A METAIS (TESTE DE CONTATO) E TOXICIDADE GENÉTICA (TESTES GENÉTICOS)

Outro ponto abordado na pesquisa foi a associação das reações alérgicas com a presença de danos genéticos. Foi observado que os pacientes sensíveis ao cromo mostraram presença de micronúcleos após a montagem do aparelho ortodôntico (Tabela 11, página 54). A carcinogenicidade do cromo é bastante caracterizada e associada à formação de pontes DNA–proteína, DNA-DNA quando em comparação ao níquel (VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005). De outra maneira, quando se avaliou a presença de danos genéticos reparáveis através do ensaio

cometa nos pacientes sensíveis aos metais, não foram observadas alterações (Gráfico 1, página 53). Parece que o aumento de danos no DNA pode ter alguma relação com a resposta de hipersensibilidade; e, mais, que os aparelhos ortodônticos podem disparar esses danos. No entanto deve-se considerar que o número da amostra reduzido, faz que se interpretem esses dados com cautela. Embora os danos sejam reduzidos, estudos adicionais são necessários, tanto de natureza experimental quanto de base epidemiológica. A existência de poucos dados e a controvérsia sobre o tema da literatura, somados ao risco dos metais, devem ser enfocados no futuro. Deve-se, por outro lado, observar a limitação dos estudos e das possíveis variáveis interferentes nos resultados. Talvez o risco seja maior para os hipersensíveis, que, como se sabe pela sua característica hiperinflamatória, já sofrem com outras substâncias. Pode ser também que outros agentes associados à terapia ortodôntica sejam responsáveis pelas alterações, como as resinas e os materiais elásticos que são, muitas vezes, confeccionados à base de derivados do petróleo, e, portanto, ricos em hidrocarbonetos, poderosos agentes mutagênicos.

#### 6.4 CONSIDERAÇÕES

Conforme se observou anteriormente, as reações de hipersensibilidade são passíveis de ocorrer durante a terapia ortodôntica. A melhor maneira de evitá-las é tomar medidas preventivas, como a realização de uma anamnese criteriosa com perguntas referentes à história prévia de alergias (JANSON et al., 1998; SAGLAM; BAYSAL; CEYLAN, 2004). Quando o paciente apresentar história prévia de alergia a metais recomenda-se a utilização de materiais metálicos livres de níquel (RAHILY; PRICE, 2003) ou emprego de bráquetes estéticos confeccionados com cerâmica ou policarbonato. No entanto, quando não for detectada a hipersensibilidade aos metais previamente ao tratamento e houver a presença de reações, recomenda-se a realização de teste de contato com um dermatologista a fim de verificar a causa das reações alérgicas (SCHUSTER et al., 2004). Quando se observar relação com os elementos do aparelho ortodôntico, recomenda-se a substituição da aparelhagem por um material que seja inócuo à saúde desse paciente, como materiais livres de

níquel ou estéticos, associado ao acompanhamento do caso pelo dermatologista responsável.

A questão da toxicidade genética relacionada ao uso de aparelhos ortodônticos é um tema extremamente relevante dados os possíveis efeitos no organismo, de ser um tópico de recente estudo na Ortodontia e que necessita de muito critério na interpretação de seus dados.

Nesta pesquisa, o aumento verificado de células micronucleadas após a montagem de aparelhos ortodônticos sugere que essa amostra seja acompanhada por um longo prazo a fim de monitorar a saúde dos pacientes, visto que a presença de micronúcleos pode estar associada a alterações celulares (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003). Os dados provenientes do ensaio cometa devem ser interpretados com cautela, em função do número reduzido de amostra, decorrente de limitações laboratoriais e por ser uma pesquisa pioneira na linha de pesquisa de biocompatibilidade dos materiais no Curso de Mestrado em Ortodontia da PUCRS. Recomenda-se a aplicação dos testes empregados nesta pesquisa em amostras maiores, a fim de se obter dados mais conclusivos em relação aos efeitos genotóxicos dos materiais ortodônticos.

## **7 CONCLUSÕES**

### **7.1 Avaliação da hipersensibilidade a metais (teste de contato)**

- O níquel foi o metal que apresentou mais reações positivas ao teste de contato nos períodos antes e dois meses após a montagem do aparelho ortodôntico fixo e com maior intensidade.
- Não houve alteração significativa das reações de contato para o níquel e cromo entre os dois períodos avaliados. Portanto, o aparelho ortodôntico não provocou reações de hipersensibilidade nos pacientes avaliados.
- Não houve associação significativa entre os gêneros feminino e masculino e os resultados positivos do teste de contato aos dois metais avaliados. No entanto, todos os casos de reações positivas foram verificados em mulheres.

### **7.2 Avaliação da toxicidade genética (testes genéticos)**

- Observou-se um incremento no nível de dano primário do DNA, através do ensaio cometa, embora não significativamente, 10 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.
- A frequência de micronúcleos aumentou significativamente 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico.

### **7.3 Avaliação da associação entre hipersensibilidade a metais (teste de contato) e toxicidade genética (testes genéticos)**

- Resultados positivos do teste de contato ao cromo estiveram associados à presença de micronúcleos 30 dias após a montagem do aparelho ortodôntico. Para o níquel não foi observada essa associação.
- Como todos os pacientes apresentaram baixos níveis de danos primários ao DNA, detectados pelo ensaio cometa, não se observou associação entre esse teste e o teste de contato.

REFERÊNCIAS<sup>9</sup>

AĞAOLĞU, G. et al. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances. **Angle Orthod.**, Appleton, v. 71, p. 375-379, Oct., 2001.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). **ToxFAQs for Nickel**. 2005. Disponível em: <[www.atsdr.cdc.gov/tfacts15.html](http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts15.html)>. Acesso em: 10 out. 2005.

ALBERT R. E. Allergic Contact Sensitizing Chemicals as Environmental Carcinogens. **Environ Health Perspect.**, Raleigh, v. 105, n. 9, p. 940-948, Sep., 1997.

AL-WAHEIDI, E. M. H. Allergic reaction to nickel orthodontic wires: A case report. **Quintes Int.**, Carol Stream, v. 26, n. 6, p. 385-387, June., 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 14724**: Informação e documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação. Rio de Janeiro: 2005.

BARRETT, R. D.; BISHARA, S. E.; QUINN, J. K. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium *in vitro*. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 103, n. 1, p.8-14, Jan. 1993.

BASS, J. K.; FINE, H.; CISNEROS, G. J. Nickel hypersensitivity in the orthodontic patients. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 103, n. 3, p. 280-285, Mar, 1993.

BESERATI N. A. et al. Immunoperoxidase detection of polycyclic aromatic hydrocarbon – DNA adducts in mouth floor and buccal mucosa cells of smokers and nonsmokers. **Environ Mol Mutagen.**, New York, v. 36, n. 2, p. 127-133, 2000.

BISHARA, S. E.; BARRETT, R. D.; SELIM, M. I. Biodegradation of orthodontic appliances. Part II. Changes in the blood level of nickel. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 103, n. 2, p. 115-119, Mar.1993.

---

<sup>9</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 6023**: Informação e documentação – referências – apresentação. Rio de Janeiro: 2002.

BLANCO DALMAU, L.; CARRAQUILLO-ALBERTY, H.; SILVA PARRA, J. A study of nickel allergy. **J Prosthet Dent.**, Saint Louis, v. 52, n. 1, p. 116-119, Jul., 1984.

BLOCHING, M. et al. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. **Oral Oncology**, Oxford, v. 36, n. 6, p. 550-555, Nov. 2000.

BOUR, H. Establishment of nickel-specific T cell lines from patients with allergic contact dermatitis: comparison of different protocols. **Clin Immunology Immunopathology**, New York, v. 73, n. 1, p. 142-145, Oct., 1994.

BOHRER, P. L. **Avaliação das alterações citopatológicas da mucosa bucal clinicamente normal exposta a carcinógenos**. 2003. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BOHRER, P. L. et al. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. **Acta Cytol.**, Chicago, v. 49, n. 3, p. 265-72, May-Jun., 2005.

BISHARA, S. E. Oral lesions caused by an orthodontic retainer: A case report. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 108, p. 115-117, Aug., 1995.

BURGAZ, S. et al. Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt, and nickel. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 521, p. 47-56. Aug., 2002.

BURROWS, D. Hypersensitivity to mercury, nickel and chromium in relation to dental materials. **Int Dent J.**, Den Haag, v. 36, n. 1, p. 30-4. Mar., 1986.

CARRANO, A. V.; NATARAJAN, A. T. International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. ICPEMC publication 14. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 204, n. 3, p. 379-406, Mar., 1988.

CAVALLO, D. et al. DNA damage and TNF $\alpha$  cytokine production in hairdressers with contact dermatitis. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 53, n. 3, p. 125-129, Sep., 2005.

COUNTS, A. L. et al. Nickel allergy associated with a transpalatal arch appliance. **J Orofac Orthop.**, Berlin, v. 63, n. 6, p. 509-515, Nov., 2002.

COSTA, M. Molecular mechanism of nickel carcinogenesis. **Biol. Chem.**, Berlin, v. 383, n. 6, p. 961-967, Jun., 2002.

COLLINS, A. R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 375, n. 2, p.183-193, Apr. 1997.

COMET assay interested group. 2005. Disponível em: <[www.cometassay.com](http://www.cometassay.com)>. Acesso em: 15 out. 2005.

CURRENTS CONFERENCES. Workshop: Biocompatibility of metals in dentistry. **J Am Dent Assoc.**, Chicago, v. 109, p. 469-971, Sep., 1984.

DE SILVA, B. D.; DOHERTY, V. R. Nickel allergy from orthodontic appliances. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 42, n. 2, p. 102-103, Feb., 2000.

DANADEVİ, G. D. et al. Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. **Mutagenesis**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 35-41, Jan., 2004.

DAYAN, A. D.; PAINE, A. J. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. **Hum Exp Toxicol.**, London, v. 20, n. 9, p. 439-51, Sep., 2001.

ELIADES, T. et al. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontics alloys. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 125, p. 24-9, Jan., 2004.

EL AGROUDI, A. M. M.; EL MOTAYAM, K. M.; AWAD, H. A. Allergic reaction to nickel. **Egyptian Dent J.**, Cairo, v. 32, n. 2, p. 101-107, Apr., 1986.

FACCIONI, G. D. et al. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 124, n. 6, p. 687-694, Dec., 2003.

FARRONATO, G. et al. Titanium appliances for allergic patients. **J Clin Orthod.**, Boulder, v. 36, n. 12, p. 676-679, Dec., 2002.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 455, n.1-2, p. 81–95, Nov., 2000.

FENECH, M. et al. The human micronucleus project – An International collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 428, n.1-2, p. 271-283, Jul., 1999.

FRANKE, S.I.; PRA, D.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.; DA SILVA, J. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis. **Mutagenesis**, Oxford, v.20, n.2, p.279-83, Jul., 2005.

GENELHU, M. C. et al. Characterization of nickel-induced allergic contact stomatitis associated with fixed orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 128, p. 378-81, Sep., 2005.

GRIMAUDO, N. J. Biocompatibility of nickel and cobalt dental alloys. **Gen Dent.**, Chicago, v. 49, n. 5, p. 498-503, Sep./Oct., 2001.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra; 2003. p. 247-279.

GRIMSDOTTIR, M. R.; GJERDET, N. R.; HENSTEN-PETERSEN, H. A. Composition and *in vitro* corrosion of orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 101, p. 525-532, Jun., 1992.

JANSON, G. R. P. et al. Nickel hypersensitivity reaction before, during, and after orthodontic therapy. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 113, n. 6, p. 655-660. Jun., 1998.

JANSON, G. R. P. et al. Avaliação clínica da reação de hipersensibilidade ao níquel nos pacientes em tratamento ortodôntico. **Ortodontia**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 31-37, Mai/Ago., 1994.

JENSEN C. S. et al. Decrease in nickel sensitization in a Danish schoolgirl population with ears pierced after implementation of nickel-exposure regulation. **Brit J Dermatol.**, Oxford, v. 146, n. 4, p. 636-642, Apr., 2002.

JENSEN, C. S. et al. Release of nickel ions from stainless steel alloys used in dental braces and their patch test reactivity in nickel-sensitive individuals. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 48, n. 6, p. 300-304, Jun., 2003.

JONES, T. K. et al. Dental implication of nickel hypersensitivity. **J. Prosthet Dent.**, Saint Louis, v. 56, n. 4, p. 507-509, Oct. 1996.

JONES, A. C.; PINK, F. E.; SANDOW, O. L. The cytobrush plus cell collector in oral cytology. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 77, n. 1, p. 101-104, Jan., 1994.

KALIMO, K.; MATTILA, L.; KAUTIAINEN, H. Nickel allergy and orthodontic treatment. **J Eur Acad Dermatol Venereol.**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 543-545, Sep., 2004.

KANERVA, L. et al. Incidence rates of occupational allergic contact dermatitis caused by metals. **Am J Contact Dermat.**, Toronto, v. 11, n. 3, p. 155-60, Sep., 2000.

KEROSUO, H.; KANERVA, L. Systemic contact dermatitis caused by nickel in a stainless steel orthodontic appliance. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 36, p. 112-113, Feb., 1997.

KERUSUO, H. et al. Nickel allergy in adolescents in relation to orthodontic treatment and piercing of ears. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 109, n. 2, p. 148-154, Feb., 1996.

LINDSTEN, R. KUROL, J. Orthodontic Appliances in relation to nickel hypersensitivity. **J Orf Orthop.**, Berlin, v. 58, n. 2, p. 100-108, 1997.

LEVRINI, L.; LUSVARDI, G.; GENTILE, D. Nickel ions release in patients with fixed orthodontic appliances. **Minerva Stomatol.**, Turim, v. 55, p. 115-121. March. 2006.

LENZA, M. A. et al. Nickel sensitivity to orthodontic archwires. **J Dent Res.**, Washington, v. 72 (abstracts special issue), n. 368, Mar., 1993.

\_\_\_\_\_. Prevalência de hipersensibilidade ao níquel em pacientes sob tratamento ortodôntico. **Rev Facul Odontol Univ Federal Goiás**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 13-17, Jul-dez., 1997.

LI, Y.; DUNIPACE, A. J.; STOOKEY, G. K. Genotoxic effects of fluoride: a controversial issue. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 195, p.127-36,1998.

LOWEY, M. N. Allergic contact dermatitis associated with the use of an Interlandi headgear in a patient with a history of atopy. **Br Dent J.**, Ribeirão Preto, v. 175, p. 67-72, Jul.,1993.

MARIGO, M. et al. Evaluation of immunologic profile in patients with nickel sensitivity due to use of fixed orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 124, n. 1, p. 46–52, Jul., 2003.

MANCUSO, G.; BERDONDINI, R. M. Eyelid dermatitis and conjunctivitis as sole manifestations of allergy to nickel in an orthodontic appliance. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 46, n. 4, p. 245, Apr., 2002.

MATASA, C. G. Attachment corrosion and its testing. **J Clin Orthod.**, Boulder, v. 29, n. 1, p.16-23. Jan. 1995

MENNÉ, T. et al. Patch test reactivity to nickel alloys. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 16, n. 5, p. 255-259, May., 1987.

MENEZES, L. M. Reação alérgica em paciente ortodôntico: um caso clínico. **Ortodontia Gaúcha**, Porto Alegre, v. 1, n. 1, p. 51-56, Abr.,1997.

\_\_\_\_\_. **Reações a metais utilizados em ortodontia**. 2000. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro; Rio de Janeiro, 2000.

MENEZES, L. M. et al. Hypersensitivity to metals in orthodontics. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 126, n. 1, p. 58 – 64, Jul., 2004.

MIGNOGNA, M. D. et al. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence? **Oral Oncology.**, Oxford, v. 40, p. 120-130, Feb., 2004.

MINANG, J. T. et al. Nickel elicits concomitant and correlated in vitro production of Th1-, Th2-type and regulatory cytokines in subjects with contact allergy to nickel. **Scand J Immunol.**, Oxford, v. 62, n. 3, p. 289-96, Sep., 2005.

- MORAES, S. et al. In vitro osteoblastic differentiation of human bone marrow cells in the presence of metals ions. **J Biomed Mater Res.**, Hoboken, v. 44, n. 2, p. 176-90, Feb., 1999.
- MONTANARO, L. et al. No genotoxicity of a new nickel-free stainless steel. **Int J Artif Organs.**, v. 28, n. 1, p. 58-65, Jan., 2005.
- MUNKSGAARD, E. M. Toxicology versus allergy in restorative dentistry. **Adv Dent Res.**, Alexandria, v. 6, p. 17-21, Sep., 1992.
- NIELSEN, B. W. et al. Incidence of allergic contact sensitization in Danish adults between 1990 and 1998: the Copenhagen allergy study. Denmark. **British Journal of Dermatology**, London, v. 147, n. 3, p. 487-92, Sep., 2002.
- NIELSEN, N. H.; MENNÉ, T. Nickel sensitization and ear piercing in an unselected Danish population. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 29, p. 16-21, Jul., 1993.
- NIKI, Y. et al. Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophages. **Biomaterials**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 1447-57, Apr., 2003.
- NOVELLI, E. L. B. et al. Differential/combined effect of water contamination with cadmium and nickel on tissues of rats. **Environ Pollution**, Barking, v. 103, n. 2-3, p. 295-300, Nov., 1998.
- OLLER, A. R.; COSTA, M.; OBERDÖRSTER, G. Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. **Toxicol Appl Pharmacol.**, San Diego, v. 143, n. 5, p. 152-166. Mar. 1997.
- PARK, H. Y.; SHEARER, T. R. In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.**, Saint Louis, v. 84, n. 2, p. 156-159, Aug., 1983.
- PHILLIPS Materiais Dentários. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- PIMENTEL, M. I. F.; MATTA, V. F. Dermatoses ocupacionais de contato. **An Bras Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 4, p. 361-6, Jul./Ago., 1998.

RAMADAN, A. A. Effect of nickel and chromium on gingival tissues during orthodontic treatment: a longitudinal study. **World J Orthod.**, Carol Stream, v. 5, n. 3, p. 230-4, Fall; 2004.

RAHILLY, G.; PRICE, N. Nickel allergy and orthodontics. **J Orthod.**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 171-174. Jun. 2003.

RASANEN L. et al. Lymphocyte proliferation test as a diagnostic aid in chromium contact sensitivity. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 25, n. 1, p. 25 –29. Jul; 1991.

RIBEIRO, L. R. Teste de micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L. R, SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra; 2003. p. 173-200.

RIBEIRO, D. A. et al. Fluoride does not induce DNA breakage in chinese hamster ovary cells *in vitro*. **Braz Oral Res.**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 192-193, Jul./Sep., 2004.

SARTO, F. et al. The micronucleus assay in exfoliated cells of human buccal mucosa. **Mutagenesis.**, Oxford, v. 2, p. 11-7, Jan., 1987.

SAGLAM, A. M.; BAYSAL, V.; CEYLAN, A. M. Nickel and cobalt hypersensitivity reaction before and after orthodontic therapy in children. **J Contemp Dent Prat.**, Diamondhead, v. 5, n. 4, p. 79-90, Nov., 2004.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra; 2003. p. 201-223.

SCHMALZ, G.; GARHAMMER, P. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. **Dent Mater**, Kidlington, v. 18, p. 396-406, Jul., 2002.

SCHUSTER, G. et al. Allergies induced by orthodontic alloys: Incidence and impact on treatment. **J Orofac Orthop.**, Berlin, v. 65, p. 48-59, Jan., 2004.

SILVA, J.; ERDTAMNN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance; 2003.

STAERKJAER, L.; MENNÉ, T. Nickel allergy and orthodontic treatment. **Eur J Orthod**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 284-9, Feb. 1990.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test) – A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Met Mol Biol.**, Clifton, v. 113, p. 203-212, 1999.

STICH, H. F.; CURTIS, R.; PARRIDA, B. B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. **Int J Cancer.**, New York, v. 30, n. 5, p. 553-559. Nov., 1982.

SZETO Y. T. et al. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. **Mutat Res.**, Amsterdam, v. 578, n. 1-2, p. 371-381, Oct., 2005.

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

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. **Curr Med Chem.**, Schiphol, v. 12, n. 10, p. 1161-208, 2005.

VALYASEVI, M. A.; MADDOX, D. E.; LI, J. T. C. Systemic reactions to allergy skin tests. **Ann Allergy Asthma Immunol.**, Arlington, v. 83, n. 2, p. 132-136, Aug. 1999.

VAN HOOGSTRAATEN I. M. W. et al. Reduced frequency of nickel allergy upon oral nickel contact at an early age. **Clin Exp Immunol.**, Oxford, n. 85, p. 441-445, Sep., 1991.

VAN NOORT, R. **Introdução aos materiais dentários**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

VILAPLANA, J.; ROMAGUERA, C., CORNELLANA, F. Contact dermatitis and adverse oral mucous membrana reactions related to the use of dental prostheses. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 30, p. 80-84. Feb., 1994.

VREEBURG, K. J.; GROOT, K.; VON BLOMBERG, M. Induction of immunological tolerance by oral administration of nickel and chromium. **J Dent Res.**, Washington, v. 63, n. 2, p.124-128. Feb., 1984.

WATAHA, J. C. Biocompatibility of dental casting alloys: A review. **J Prosthet Dent.**, Saint Louis, v. 83, n. 2, p. 223-34. Feb. 2000.

ZORODDU M. A. et al. Molecular mechanisms in nickel carcinogenesis: Modeling Ni (II) binding site in histone H4. **Environ Health Perspect.**, Raleigh, v. 110, n. 51, p. 719-723, Oct., 2002.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Pesquisa: Avaliação de hipersensibilidade a metais e toxicidade genética associadas ao uso de aparelhos ortodônticos fixos.**

#### **I. Objetivos e justificativa da pesquisa:**

Atualmente, muito tem-se pesquisado em relação aos efeitos biológicos dos aparelhos ortodônticos. Alguns estudos mostram que os componentes dos aparelhos ortodônticos podem causar alergia, assim como podem estar relacionados a determinados efeitos nas células humanas. A presente pesquisa tem, como objetivo verificar os efeitos no material genético de células da mucosa bucal e realizar teste de contato para verificação de alergia a determinados metais antes e após a colocação de aparelhos ortodônticos.

#### **II. Procedimentos a serem utilizados:**

A pesquisa será realizada através de:

Testes de contato com metais cromo (bicromato de potássio) e níquel (sulfato de níquel) na região do antebraço: o exame será realizado por um médico especialista em Dermatologia antes e após a colocação do aparelho ortodôntico.

Coletas de células da mucosa bucal: essas células serão coletadas com auxílio de uma escova interdental que será aplicada na bochecha de cada participante. As coletas serão realizadas antes e após (dez dias e um mês) a colocação do aparelho ortodôntico.

#### **III. Os desconfortos ou riscos esperados**

A aplicação do teste de contato mostrará o risco do participante ser sensível aos metais aplicados, nesse caso o indivíduo receberá devidas orientações médicas. Na coleta de células da mucosa bucal, os desconfortos que poderão existir será em relação à escovação da bochecha, que será mínima. As escovas utilizadas serão de uso exclusivo de cada paciente e descartadas após o uso, evitando qualquer risco de contaminação.

#### **IV. Os benefícios que se podem obter**

A partir dos resultados dessa pesquisa, poderá ser verificado se o paciente é sensível a alguma substância componente do aparelho ortodôntico. Esse fato é importante, pois, se o indivíduo for sensível a um dos metais testados, deve ser sugerida a troca de componentes do aparelho. Além dos testes de contato, será avaliado o material genético das células da mucosa bucal durante a utilização do aparelho ortodôntico.

#### **V. Garantia de resposta a qualquer pergunta**

Qualquer dúvida em relação à pesquisa estamos inteiramente disponíveis a questionamentos, nesse caso entrar em contato com a Dra. Graziela Henriques Westphalen ao telefone: 8424 7276.

#### **VI. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si**

Caso desejar abandonar a pesquisa, não haverá qualquer prejuízo ao participante ou modificações no tratamento realizado.

### **VII. Garantia de privacidade**

Ressaltamos, também, que a concordância em participar desse estudo não implica necessariamente em qualquer modificação no tratamento que já está sendo feito. Da mesma forma, a não concordância em participar desse estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido.

### **VIII. Compromisso com informação atualizada do estudo**

Os resultados da pesquisa serão transmitidos de forma atualizada aos participantes e meios científicos.

### **IX. Disponibilidade de tratamento médico**

Nos casos verificados de sensibilidade a metais, serão tomadas medidas para substituição da aparelhagem ortodôntica, assim como tratamento específico realizado pelo médico dermatologista.

### **X. Garantia de que custos adicionais serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa**

Eu, .....(paciente ou responsável) fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do tratamento recebido e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A Dr<sup>a</sup>. Graziela Westphalen certificou-me de que todos os dados referentes aos exames realizados serão confidenciais, bem como o respectivo tratamento não será modificado em razão desse estudo, e terei liberdade de não mais retirar consentir em participar da pesquisa, face a essas informações.

Fui informado que não existirão danos à minha saúde causados diretamente pela pesquisa. Também sei que, caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

Caso tiverem novas perguntas sobre este estudo, posso chamar Graziela Henriques Westphalen ao telefone (51) 8424 7276 para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Dra. Luciane Menezes (51) 3320 3538.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente

\_\_\_\_\_  
Nome do Paciente

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
Nome do Pesquisador

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_  
(nome do paciente) em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ (data) pelo  
\_\_\_\_\_ (nome do pesquisador) enquanto eu estava presente.

**APÊNDICE B****QUESTIONÁRIO DE SAÚDE**

Nome: \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA PESSOAL**

Data de hoje: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_\_

Sexo: ( ) Feminino ( ) Masculino

**HISTÓRIA DE FUMO**

Você fuma? SIM NÃO

Se SIM:

Há quanto tempo você fuma?

Quantas carteiros você fuma por dia? Menos de 1/2 carteira 1/2 - 1 carteira  
mais de uma carteira**HISTÓRIA DE ALCÓOL**

Você toma bebidas alcoólicas? nunca de vez em quando sempre

Quantidade: \_\_\_\_\_

**HÁBITOS DIETÉTICOS**

Quantas frutas você come por dia? Nenhuma, 1 a 2, 3 ou mais

Quanta salada você come nas refeições? Nenhuma, 1/6 do prato, 1/4 do prato  
ou mais

Quantos pedaços de carne você come por dia? Nenhum, 1 a 2, mais de dois

Marque abaixo quais os alimentos que você consome **diariamente**:

Bolachas recheadas Salgadinhos Batatas fritas Sorvetes

**HISTÓRIA GENÉTICA**Você é portador de defeito de nascimento ou de outra desordem genética ou doença  
inerente que afetou seus pais, irmãos ou filhos? SIM NÃO

Se SIM, favor especificar: \_\_\_\_\_

**DOENÇAS**

Outro tipo de doença: \_\_\_\_\_

**DOENÇAS NA CAVIDADE BUCAL**

Outro tipo de doença: \_\_\_\_\_

**HISTÓRIA DE EXPOSIÇÃO**

Você foi exposto a algum dos elementos químicos (amianto, radiação, produtos do carvão, pesticidas, herbicidas, produtos do petróleo, tinturas, solventes, outros químicos)? (se positivo, responda às seguintes questões abaixo)

\* Quando você foi exposto pela primeira vez? (mês e ano) \_\_\_\_\_

\* Quando foi a última exposição? (mês e ano) \_\_\_\_\_

Por quanto tempo em termos de dias, meses ou anos no total você tem sido exposto?

---

---

---

**HISTÓRIA REFERENTE À PELE**

Dermatite de contato:       SIM   NÃO

Dermatite atópica:         SIM   NÃO

Urticária:                   SIM   NÃO

Angioedema:                SIM   NÃO

Outros:

Uso de brincos:   SIM   NÃO Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Uso de piercing:  SIM   NÃO Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Uso de cosméticos: SIM   NÃO Há quanto tempo? \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

OBS.: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**APÊNDICE C****TESTE DE CONTATO  
(DERMATOLOGIA/ORTODONTIA)  
EXAME**

DATA:  
HORA:  
LOCAL:  
FONE:

**RETORNO**

DATA:  
HORA:

**OBSERVAÇÕES**

O teste de contato será realizado no antebraço. Sugere-se o uso de roupa que facilite o acesso a essa região.

**RECOMENDAÇÕES**

Após o exame, não molhar a região do teste. Evitar exercícios físicos e outras situações que favoreçam a transpiração.

**TELEFONE PARA CONTATO**

Graziela (51) 8424 7276

## **ANEXOS**

## ANEXO A

	<p style="text-align: right;"><b>Dental Morelli Ltda.</b></p> <p style="text-align: center;">Ficha de Segurança – FISPQ / Ficha de Datos de Seg</p>
---	---

**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 Jundiáí, 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 88/379/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](mailto:info.morelli@euroconexao.com)  
Tel. +351 214439292 / Fax +351 214439294  
Nos Estados Unidos da América:  
Sr. Yesid Arias Urrea  
[ariasint@bellsouth.net](mailto:ariasint@bellsouth.net)  
Telefone: 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 Jundiáí, 230 / 250  
Jardim Saira  
CEP 18085-090 – Sorocaba – São Paulo – Brasil.  
Responsable Técnico: Eng. Roger Morelli  
Teléfono de emergencia de la empresa o responsal artículo 12 del Directivo 88/379/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](mailto:info.morelli@euroconexao.com)  
Tel. +351 214439292 / Fax +351 214439294  
En los EE.UU.  
Sr. Yesid Arias Urrea  
[ariasint@bellsouth.net](mailto:ariasint@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%

**ANEXO B**

<b>Assunto:</b>	Informações de brackets
<b>Para:</b>	"Graziela Henriques Westphalen" <grazihw@yahoo.com.br>
<b>De:</b>	emalves@mmm.com  <a href="#">Adicionar endereço</a>
<b>Data:</b>	Thu, 19 Oct 2006 09:37:30 -0300

Prezada Dra Graziela

Segue abaixo a composição do aço do Dyna-Lock:

Aço 17-4:

.07% max Carbon, 1.0% max Manganese, 1.0% max Silicon, 15.5-17.5% Chromium, 3-5% Nickel, 3-5% Copper, 0.15-0.45% Niobium + Tantalum

Atenciosamente

Elizandro Monteoliva Alves  
Marketing - 3M Unitek  
[emalves@3m.com](mailto:emalves@3m.com)  
Tel: + 55 19 3838-6754  
Cel: +55 19 9266 8739

## ANEXO C

### **Preparação das lâminas para o ensaio cometa**

#### **Material:**

Lâminas pré-cobertas, lamínulas (27 x 50 mm), agarose LMP (0,7 %), micropipetadores e ponteiros, micro-tubos (eppendorfs) (1,5-2 mL) e banho-maria (37° C).

#### **Procedimento:**

1. Derreter uma alíquota de agarose LMP e incubar em banho-maria a 37°C. É importante não utilizar a agarose LMP antes que a temperatura esteja estabilizada a 37°C, para não danificar as células.
2. Aliquotar 5-10 µL da suspensão celular (10.000 células) em um eppendorf.
3. Adicionar 90-95 µL de agarose LMP sobre a alíquota de suspensão celular e misturar.
4. Adicionar, rapidamente, a mistura sobre uma lâmina pré-coberta; e, imediatamente, cobrir com uma lamínula.
5. Manter as lâminas a 4°C até que o gel se solidifique (5 minutos aproximadamente).

Observação: as lâminas devem ser identificadas a lápis na extremidade fosca. Os códigos utilizados não devem permitir ao analisador reconhecer a amostra contida na lâmina, para evitar interferência no resultado do teste.

### **Lise**

#### **Material:**

Tampão de lise (uso) gelado (89 mL de solução de lise estoque, 10 ml de DMSO e 1 ml de Triton 100, mantida em geladeira por pelo menos 1 h antes do uso); cubetas de vidro (100 ml) cobertas com papel laminado.

#### **Procedimento:**

1. Remover as lamínulas cuidadosamente.
2. Imergir as lâminas em tampão de lise gelado.
3. Manter as lâminas nesta solução por no mínimo 1 hora

Observação: as lâminas podem ser mantidas na solução de lise por tempos mais longos (até 4 semanas). Contudo, o resultado do teste pode variar em função da difusão do DNA na lâmina.

Portanto, recomenda-utilizar um tempo similar em solução de lise para as lâminas de um mesmo teste.

### **Desnaturação e eletroforese**

#### **Material:**

Gelo, cuba de eletroforese horizontal, tampão de eletroforese (uso) gelado (30 ml de solução A e 5 mL de Solução B para cada L de H<sub>2</sub>O destilada, mantidas em geladeira por pelo menos 1h antes do uso), fonte de eletroforese (25 V, 300 mA).

**Procedimento:**

1. Dispor a cuba de eletroforese em um recipiente contendo gelo.
2. Retirar as lâminas da solução de lise, uma a uma, removendo com papel toalha o excesso de solução da parte de baixo das lâminas e dispô-las, imediatamente, na cuba de eletroforese. As lâminas podem ser lavadas com H<sub>2</sub>O destilada ou PBS antes de serem dispostas na cuba de eletroforese.
3. Ligar os fios da fonte na cuba, de modo que a identificação das lâminas fique direcionada para o pólo positivo (cátodo).
4. Adicionar o tampão de eletroforese gelado até um nível de 2 mm acima da superfície das lâminas; e aguardar 20-60 minutos para desnaturar o DNA. O tempo de desnaturação utilizada em nosso laboratório para estudos de genotoxicidade em humanos e camundongos é de 20 minutos.
5. Ajustar a fonte de eletroforese para 20-60 minutos, 250-300 mA e 0,7-1 V por cm (voltagem dividida pela distância em cm entre os dois eletrodos). A condição de eletroforese utilizada em nosso laboratório para a detecção de genotoxicidade em células sanguíneas de camundongos e de humanos é de 15 ou 20 minutos, 300 mA e 0,97 V/cm.
6. Submeter às lâminas à eletroforese.
7. Retirar tampão de eletroforese se a voltagem estiver menor que a programada. Acrescentar tampão de eletroforese se a amperagem estiver menor que a programada. Ajustar a voltagem e a amperagem apenas no início da eletroforese.

Observação: a eletroforese deve ser conduzida em um ambiente de temperatura controlada.

Manter a temperatura da solução de eletroforese constante ao longo de um mesmo teste.

**Neutralização**

**Material:** solução de neutralização (Tris 0,4, pH 7,5) e bandejas.

**Procedimento:**

1. Retirar as lâminas da cuba de eletroforese, removendo o excesso de tampão; e dispor as lâminas sobre uma bandeja.
2. Adicionar o tampão de neutralização até cobrir a superfícies das lâminas; e esperar 5 minutos.
3. Escorrer o tampão e repetir o processo por mais 2 vezes.

Observação: todo o procedimento, desde a preparação da suspensão celular até o fim da eletroforese, deve ser executado no escuro ou sob lâmpada de cor amarela ou vermelha de baixa intensidade, para evitar fotólise e dano ao DNA das células.

**Protocolo de coloração com nitrato de prata****Material:**

Cubetas forradas com papel alumínio; bandejas.

Reagentes:

Solução fixadora Para 1l: Ácido tricloroacético (tóxico) 150 g;

Sulfato de zinco heptahidratado 50 g;

Glicerina 50 ml;

Solução A (coloração) para 1l: Carbonato de sódio (tóxico) 50 g;

Solução B (coloração) para 0,5 l: Nitrato de amônio (tóxico) 0,5 g;

Nitrato de prata (tóxico) 0,5 g;

Ácido tungstosilícico 1,25 g;

Formaldeído (cancerígeno) 0,75 ml; e Solução de coloração

A solução corante deve ser preparada imediatamente antes do uso em capela de exaustão e protegida da luz.

Solução de parada para 1l: Ácido acético 10 ml

### **Procedimento**

Ao término da neutralização, deve-se fixar e corar as lâminas.

### **Fixação**

1. Lavar as lâminas 2 vezes com água destilada ou deionizada em bandeja.
2. Secar por 1½-2 h a 37°C (por 5 h ou mais à temperatura ambiente).
3. Transferir as lâminas para uma cubeta e adicionar solução fixadora; aguardar 10 minutos.
4. Remover a solução fixadora da cubeta. A solução fixadora pode ser reaproveitada várias vezes.
5. Lavar cuidadosamente as lâminas 3 vezes com água destilada ou deionizada, na cubeta.
6. Transferir as lâminas para uma bandeja e deixar por 1½-2 h a 37°C (por 5 h ou mais a temperatura ambiente). As lâminas podem ser secas na cubeta, embora a secagem seja mais lenta. É importante observar se as lâminas estão completamente secas antes de iniciar a coloração.

### **Coloração**

1. Transferir as lâminas para uma cubeta forrada com papel alumínio.
2. Reidratar as lâminas por 5 minutos com água destilada ou deionizada.
3. Remover a H<sub>2</sub>O destilada da cubeta e adicionar a solução de coloração, no escuro e em capela de exaustão.
4. Incubar a solução de coloração por 35 min, no escuro. Melhores resultados são obtidos quando a cubeta contendo as lâminas é mantida sob agitação a 37°C.
5. Descartar a solução de coloração e lavar as lâminas 3 vezes com água destilada ou deionizada, na cubeta.
6. Adicionar cuidadosamente a solução de parada e incubar por 5 min.
7. Remover a solução de parada. A solução de parada pode ser reaproveitada várias vezes.
8. Lavar cuidadosamente as lâminas 3 vezes com água destilada ou deionizada.
9. Transferir as lâminas para uma bandeja e deixar por 1½ - 2 h a 37°C (por 5 h ou mais, à temperatura ambiente).

Observação: todos os procedimentos devem ser executados com cuidado para evitar o despreendimento dos géis das lâminas. A vidraria utilizada no procedimento de coloração pode ser limpa com ácido nítrico 50% volume/volume. Após a limpeza, a vidraria deve ser lavada abundantemente e enxaguada com água destilada.

## ANEXO D

### **Preparo das lâminas para o teste de micronúcleos**

Preparar uma suspensão celular e colocá-la sobre a lâmina

#### **Lavagens**

Após a coleta do material realizar duas lavagens com a solução de buffer. Essa lavagem é feita através de centrifugação a 1500 rpm durante 10 min cada. Depois da última lavagem, retirar de 50-100 $\mu$ l ( $1,5 \times 10^{-6}$  -  $2 \times 10^{-6}$  mL) de suspensão celular e colocar sobre as lâminas em forma de gotas. Essa quantidade equivale a 3000 - 5000 células por lâmina.

#### **Lâminas**

As lâminas devem estar pré-aquecidas (37<sup>0</sup> C).

\* Secagem do Material

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

\* Fixação do Material

A fixação é feita em metanol 80% (gelado) por 30 min. Após, deixar secando durante a noite em temperatura ambiente.

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

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

Fazer a coloração dessas lâminas durante aproximadamente 3 minutos;

Colocar as lâminas em água destilada por 1 minuto;

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

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

Secar à temperatura ambiente.

## ANEXO E



*Comissão Científica e de Ética  
Faculdade de Odontologia da PUCRS*

---

Porto Alegre 14 de outubro de 2005

**O Projeto de: Dissertação**

**Protocolado sob nº:** 0074/05

**Intitulado:** Avaliação de hipersensibilidade a metais e toxicidade genética associadas ao uso de aparelhos ortodônticos fixos

**do(a) aluno(a):** Graziela Henriques Westphalen

**Programa de:** Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial

**do curso de:** Ortodontia e Ortopedia Facial

**Nível:** Mestrado

**Orientado pelo(a):** Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 14 de outubro de 2005.

**Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira**  
Presidente da Comissão Científica e de Ética da  
Faculdade de Odontologia da PUCRS

## ANEXO F



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício nº 1168/05-CEP

Porto Alegre, 06 de dezembro de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Avaliação de hipersensibilidade a metais e toxicidade genética associadas ao uso de aparelhos ortodônticos fixos".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Caio Coelho Marques  
COORDENADOR EM EXERCÍCIO

Ilmo(a) Sr(a)  
Mest Graziela Henriques Westphalen  
N/Universidade