



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



JOÃO PEDRO PEDROSA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE RESINAS
ACRÍLICAS DE USO ODONTOLÓGICO POR MEIO DO
TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA
MUCOSA BUCAL**

Feira de Santana, BA

2019

JOÃO PEDRO PEDROSA CRUZ

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE RESINAS
ACRÍLICAS DE USO ODONTOLÓGICO POR MEIO DO
TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA
MUCOSA BUCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Feira de Santana, BA

2019

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

C963a Cruz, João Pedro Pedrosa
Avaliação da genotoxicidade de resinas acrílicas de uso odontológico por meio do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal./ João Pedro Pedrosa Cruz. – Feira de Santana, 2019. 122f.: il.

Orientadora: Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.

1.Resinas acrílicas. 2.Genotoxicidade. 3.Apoptose. 4.Micronúcleo. 5.Danos ao DNA. I.Cerqueira, Eneida de Moraes Marcílio, orient. II.Universidade Estadual de Feira de Santana. III.Título.

CDU: 616.314

Maria de Fátima de Jesus Moreira – Bibliotecária – CRB5/1120

Dedico este trabalho a minha esposa, Paula, por todo amor, paciência e cuidado de sempre com a nossa família, especialmente durante a minha necessária ausência no processo de execução desta tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, por ser fonte de segurança maior em momentos de aflição.

À minha orientadora, Profa. Eneida, obrigado pelo acolhimento, orientação incansável e pela enorme disponibilidade. As lições sem dúvida me transformaram como profissional e, especialmente, como pessoa.

A meu amor, Paula, sem a qual a vida não teria a mesma graça. É imensurável o tamanho da sorte de ter você ao meu lado. Obrigado por tudo! Sobretudo pelo fruto maior do nosso amor, Alice.

Aos meus pais, Pedro e Tereza, pelo exemplo de sempre e presença constante. Devo tudo a vocês.

Aos meus sogros, Washington e Bel, um agradecimento especial, por todo o incentivo para a realização deste doutorado.

As minhas irmãs, Idy e Marla, cunhadas e cunhados, agradeço por todas as palavras de estímulo.

Ao laboratório de Genética Toxicológica da UEFS, na pessoa do Prof. José Roberto pela disponibilidade, espaço e apoio e, especialmente, da Profa. Maíza, por toda paciência e solicitude durante as colorações.

Aos amigos Leandro Barros e Raildo Coqueiro pelas precisas sugestões na estatística.

À Profa. Valéria Freitas por incentivar sempre o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À amiga Jeane e a Profa. Tarsila, pela pronta disponibilização do Laboratório de Patologia Oral da UEFS.

Ao Departamento de Polícia Técnica da Bahia, agradeço a todos os colegas nas pessoas do Dr. Elson Jeferson, Dr. Alex, Dr. Jorge Borges, Dr. Renato Lacerda e do amigo Celso Danilo pela compreensão e incentivo.

Aos colegas da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em especial aos amigos Nilton Cesar, Lívia, Ricardo e Mateus pela grande contribuição nas coletas e, particularmente, pelas palavras de apoio.

Aos amigos Ismar Eduardo e Sérgio por toda a disponibilidade para o andamento da disciplina de Odontologia Legal da UESB.

Aos discentes do Curso de Odontologia da UESB que passaram pela disciplina de Odontologia Legal durante este período, pela compreensão nos momentos de ajustes.

A todos os meus amigos e familiares, que estão sempre na torcida por mim.

Só aquele que se consagra a uma causa, com toda a sua força e alma pode ser um verdadeiro mestre. Por esta razão, ser mestre exige tudo de uma pessoa.

(Albert Einstein)

RESUMO

As resinas acrílicas são amplamente utilizadas em odontologia tanto como materiais restauradores quanto auxiliares. Pouco é conhecido, no entanto, sobre sua genotoxicidade. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, com o emprego do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal, o potencial genotóxico de resinas acrílicas utilizadas em odontologia. Foi investigada, além da ocorrência de micronúcleos, alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose (picnose, cariorréxis e cromatina condensada) e necrose (cariólise, adicionalmente), em células de dois grupos distintos de indivíduos: 1) profissionais ocupacionalmente expostos e; 2) crianças e adolescentes em uso de aparelhos ortodônticos confeccionados com resinas acrílicas. Para avaliação no grupo de profissionais expostos, foram analisadas células esfoliadas da bochecha de 60 indivíduos, de ambos os sexos, divididos igualmente em 3 grupos: profissionais expostos às resinas acrílicas, profissionais não expostos e não profissionais da odontologia. E para avaliação no grupo de crianças e adolescentes foram analisadas células esfoliadas das mucosas da bochecha e do palato de 30 destes indivíduos, de ambos os sexos, na faixa etária entre seis e 12 anos de idade. As coletas foram realizadas antes da instalação dos aparelhos e após um período de 15 a 21 dias. As análises citológicas foram feitas, em teste cego, sob microscopia óptica, segundo os protocolos sugeridos por Tolbert; Shy; Allen (1991; 1992) e Thomas et al. (2009). Um mínimo de 2.000 células por região coletada para cada indivíduo foi considerado para análise. Em relação à exposição ocupacional, não foi observada diferença entre os grupos quanto à ocorrência de micronúcleos ($p > 0,05$) e cariólise ($p > 0,05$). A avaliação isolada das alterações indicativas de apoptose revelou que cariorréxis, cromatina condensada e picnose foram de ocorrência significativamente maior entre os profissionais expostos quando comparados aos não profissionais, mas não foram observadas diferenças quando comparados aos profissionais não expostos. Estes, contudo, diferiram dos não profissionais apenas na ocorrência de cariorréxis. A avaliação conjunta destas alterações revelou, no entanto, diferenças entre os grupos de profissionais expostos e não expostos comparativamente aos não profissionais. Quanto à avaliação das crianças e adolescentes em uso de aparelhos ortodônticos, não foi observada diferença entre os dois momentos quanto à ocorrência de micronúcleos e de alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose e necrose nas células da bochecha ($p > 0,05$). A avaliação das células do palato revelou aumento significativo na ocorrência de micronúcleos e de alterações nucleares indicativas de apoptose ($p < 0,01$), mas não de cariólise ($p > 0,05$). É possível concluir que os profissionais estão expostos a agentes capazes de provocar genotoxicidade expressa pelo aumento nas taxas de alterações

nucleares indicativas de apoptose. A exposição ocupacional aos monômeros das resinas acrílicas poderia *a priori* contribuir para o aumento da apoptose, mas os resultados aqui obtidos não permitem tal afirmação, vez que profissionais não expostos não diferiram dos expostos. Além disso, foi possível observar, no caso das crianças e adolescentes, que o contato direto com os aparelhos ortodônticos induz aumento na ocorrência de danos cromossômicos e de alterações nucleares degenerativas. É importante considerar que, adicionalmente ao metilmetacrilato, principal monômero das resinas acrílicas, é possível que tenha havido trauma local provocado pelos aparelhos, o que pode ter estimulado o processo de renovação celular, interferindo nas diferenças observadas. Os resultados encontrados suscitam a realização de novos estudos para avaliação do real potencial genotóxico das resinas acrílicas.

Palavras-chave: resinas acrílicas, genotoxicidade, micronúcleo, danos ao DNA, apoptose.

ABSTRACT

Acrylic resins are widely used in dentistry as both restorative and auxiliary materials. However, little is known about their genotoxicity. Thus, the aim of this work was to evaluate the genotoxic potential of acrylic resins used in dentistry with the Micronucleus Test in exfoliated buccal mucosal cells. In addition to the occurrence of micronuclei, degenerative nuclear alterations indicative of apoptosis (pycnose, karyorrhexis, and condensed chromatin) and necrosis (karyolysis, additionally) were investigated in cells of two distinct groups of individuals: 1) occupationally exposed professionals; 2) children and adolescents using orthodontic appliances made with acrylic resins. For evaluation in the group of exposed professionals, exfoliated cheek cells from 60 individuals of both sexes were equally divided into 3 groups: professionals exposed to acrylic resins, professionals non-exposed to acrylic resins and non-dental professionals. For evaluation in the group of children and adolescents, exfoliated cells from the cheek and palate mucosa of 30 individuals of both sexes in the age group of 6-12 years were evaluated. Collections were performed before the installation of appliances and after a period of 15 to 21 days. Cytological analyses were blindly performed under optical microscopy according to protocols suggested by Tolbert; Shy; Allen (1991, 1992) and Thomas et al. (2009). A minimum of 2,000 cells per region collected for each individual was considered for analysis. Regarding occupational exposure, no difference was observed between groups regarding the occurrence of micronuclei ($p > 0.05$) and karyolysis ($p > 0.05$). The isolated evaluation of alterations indicative of apoptosis revealed that karyorrhexis, condensed chromatin and pycnose were significantly more frequent among exposed professionals when compared to non-dental professionals, but no differences were observed when compared to non-exposed professionals. These, however, differed from non-dental professionals only for the occurrence of karyorrhexis. The combined evaluation of these changes revealed differences between groups of exposed and non-exposed professionals compared to non-dental professionals. Regarding the evaluation of children and adolescents using orthodontic appliances, no difference was observed between the two moments regarding the occurrence of micronuclei and degenerative nuclear alterations indicative of apoptosis and necrosis in cheek cells ($p > 0.05$). The evaluation of palate cells revealed a significant increase in the occurrence of micronuclei and nuclear alterations indicative of apoptosis ($p < 0.01$), but not of karyolysis ($p > 0.05$). It could be concluded that professionals are exposed to agents capable of causing genotoxicity expressed by the increase in nuclear alteration rates indicative of apoptosis. Occupational exposure to acrylic resin monomers could a priori contribute to increased apoptosis, but the results obtained here do not

allow such a conclusion, since non-exposed professionals did not differ from exposed ones. In addition, direct contact with orthodontic appliances induces an increase in the occurrence of chromosomal damage and degenerative nuclear alterations. It is important to consider that in addition to methylmethacrylate, the main monomer of acrylic resins, it is possible that local trauma caused by the devices may have stimulated the cell renewal process, interfering with differences observed. The results obtained encourage the conduction of further studies to evaluate the real genotoxic potential of acrylic resins.

Keywords: acrylic resins, genotoxicity, micronucleus test, DNA damage, apoptosis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
	REFERÊNCIAS	41
3	CAPÍTULO 1	49
3.1	INTRODUÇÃO	51
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.3	RESULTADOS	56
3.4	DISCUSSÃO	61
	REFERÊNCIAS	65
		72
4	CAPÍTULO 2	74
4.1	INTRODUÇÃO	76
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	80
4.3	RESULTADOS	84
4.4	DISCUSSÃO	88
	REFERÊNCIAS	88
5	CONCLUSÃO GERAL	95
	ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os materiais dentários constituem uma gama de produtos utilizados na prevenção e tratamento de doenças bucais. Estes materiais podem ser didaticamente classificados em três grupos: preventivos, restauradores e auxiliares (ANUSAVICE, SHEN, RAWLS, 2013). Algumas substâncias podem fazer parte de mais de um desses grupos, a exemplo das resinas acrílicas. Estas resinas são utilizadas tanto como materiais restauradores (bases de próteses dentárias, coroas dentárias temporárias, aparelhos ortodônticos e próteses bucomaxilofaciais) quanto auxiliares (moldeiras para clareamento e moldagem, protetores bucais e placas mio-relaxantes) (LEGGAT, KEDJARUNE, 2003; MORAIS et al., 2007; ANUSAVICE, SHEN, RAWLS, 2013).

Em se tratando de reabilitações protéticas e em indicações de uso de dispositivos intra-orais, como aparelhos ortodônticos, removíveis ou fixos, e placas mio-relaxantes, as resinas acrílicas ainda são consideradas insubstituíveis na clínica odontológica (LOPES et al., 2011).

Com o aumento da duração dos tratamentos e a ampliação da utilização dessas resinas, questionamentos relacionados à sua biocompatibilidade têm sido feitos com frequência (GOIATO et al., 2001; AYDIN et al., 2002; SILVA et al., 2004; CHAVES et al., 2012; SOUTO-LOPES et al., 2013; PREMARAJ, 2014, TOPAJICHE et al., 2015).

A maior parte dos materiais acrílicos utilizados em Odontologia é modificação do metilmetacrilato. Apesar do emprego corriqueiro, os metacrilatos estão entre os materiais dentários que mais causam reações em profissionais ocupacionalmente expostos (QUEIROZ, 2010). Seus monômeros residuais podem ser liberados das resinas e causar efeitos tóxicos também em pacientes (LEGGAT, KEDJARUNE, 2003; GONÇALVES et al., 2006; CHAVES et al., 2012). Dentre estes efeitos, são citados na literatura: reação imunológica ao material, parestesia das pontas dos dedos, toxicidade pulmonar, necrose de tecido pulmonar, dermatites de contato e estomatites (JORGE et al., 2003; CHAVES et al., 2012; AZHAR et al., 2013; CAMACHO et al., 2014; TOPAJICHE et al., 2015).

O potencial genotóxico do metilmetacrilato não está ainda inteiramente estabelecido e há diversos registros na literatura em que foi investigado e destacada a necessidade de estudos adicionais (SCHWEIKL, SCHMALZ, SPRUSS, 2001; YANG et al., 2003; QUEIROZ, 2010; AZHAR et al., 2013; TOPAJICHE et al., 2015), mas segundo Premaraj et al. (2014) monômeros não polimerizados podem provocar efeitos tóxicos em sistemas biológicos que têm potencial de induzir distúrbios no ciclo celular, apoptose e, ainda, mutagênese ou carcinogênese.

Dada a relação íntima entre danos genéticos e câncer, é importante realizar estudos que avaliem a genotoxicidade dos materiais empregados na prática odontológica (CERQUEIRA et al., 2008; ROCHA, 2011; LORENZONI et al., 2013). O câncer é considerado doença genética porque resulta de alterações (mutações gênicas e/ou aberrações cromossômicas) que ocorrem em genes comprometidos com mecanismos de reparo do DNA, com a apoptose e com o controle da proliferação e diferenciação celular.

O estabelecimento do potencial genotóxico de produtos utilizados em jovens assume uma importância ainda maior, dada a maior expectativa de vida que oportuniza ainda mais, do que no adulto, a ocorrência de mutações adicionais, propiciando a transformação maligna (NERI et al., 2005; SOBOL, BEZRUKOV, 2007; HOLLAND et al., 2011).

Adicionalmente, avaliar os riscos ocupacionais a que estão expostos profissionais das diversas áreas é imprescindível. O indivíduo que lida continuamente com determinados produtos pode ter comprometida sua saúde, limitadas as possibilidades de evolução de suas competências e restritas sua capacidade laboral e de ampliação de sua experiência profissional (BENOVA et al., 2002; ÇELIK, ÇAVAS, ERGENE-GOÖZÜKARA, 2003; BORTOLI et al., 2009; BENEDETTI et al., 2013; ANDRADE et al., 2017).

Dentre os muitos testes disponíveis para avaliação dos efeitos mutagênicos de um dado agente o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas é considerado valiosa ferramenta (BONASSI, et al., 2009; THOMAS et al., 2009; HOLLAND et al., 2009). Micronúcleos são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que, por não se ligarem às fibras do fuso, não são incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (DOREA et al., 2012; MOTGI et al., 2014). Revelam, portanto, a ocorrência de danos cromossômicos induzidos por agentes aneugênicos e clastogênicos. Este teste é recomendado como parte do arsenal de testes regulares adotados na prática da Genética Toxicológica, aceito pelas instituições governamentais e pelas agências internacionais de registros de novas drogas (BONASSI et al., 2009).

Como parte do protocolo para o Teste de Micronúcleo, é indicado o cômputo de alterações nucleares degenerativas que, quando em ocorrência excessiva, são indicadoras de apoptose (cromatina condensada, picnose e cariorréxis) e necrose (cariólise, adicionalmente), associadas, respectivamente, a efeitos genotóxicos e citotóxicos. A sensibilidade do teste é, portanto, incrementada quando além de micronúcleos são analisadas estas alterações (TOLBERT et al., 1991, 1992; THOMAS et al. 2009).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo geral avaliar, com o emprego do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal, o potencial genotóxico de resinas

acrílicas utilizadas na prática clínica odontológica visando à identificação de biomarcadores de risco para o desenvolvimento de câncer. Especificamente, foram objetivos deste estudo investigar, em células esfoliadas deste epitélio, a ocorrência de danos cromossômicos, traduzidos como micronúcleos, bem como alterações nucleares degenerativas indicadoras de necrose e apoptose, em dois grupos distintos: 1) crianças em uso de dispositivos intra-orais confeccionados com resinas acrílicas e; 2) profissionais ocupacionalmente expostos a estes materiais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 APROVAÇÃO E APLICAÇÃO DAS RESINAS ACRÍLICAS EM ODONTOLOGIA

As metodologias e padrões para testes de segurança dos materiais dentários foram inicialmente discutidos, em 1930, pela American Dental Association (ADA). Para tal, foram criados grupos de estudos com o intuito de definir especificações para manutenção do controle de qualidade destes materiais. Os trabalhos da ADA culminaram no desenvolvimento do documento “Especificação N° 41 – Práticas recomendadas para a avaliação biológica de materiais dentários” (ANUSAVICHE, SHEN, RAWLS, 2013). No mesmo sentido, foi criado o *Dental Products Panel*, um comitê da *Food and Drug Administration* (FDA), constituído por profissionais com o compromisso de revisar e avaliar os dados relativos à segurança e eficácia de produtos de uso odontológico.

No Brasil, os materiais dentários são especificamente regulados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Lei nº 6.360 de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos. As resinas acrílicas utilizadas em odontologia são classificadas pela ANVISA como correlatos, definidos na lei nº 5.991 de 1973 como substância, produto, aparelho, ou acessório não enquadrado como droga, medicamento ou insumo farmacêutico, cujo uso ou aplicação esteja ligado à defesa ou proteção da saúde individual ou coletiva, à higiene pessoal ou de ambientes, ou a fins diagnósticos e analíticos (BRASIL, 1973).

No que diz respeito aos correlatos, a lei 6.360 determina que somente poderão ser fabricados, ou importados, para consumo e venda, após o pronunciamento do Ministério da Saúde sobre a obrigatoriedade ou não de registro (BRASIL, 1976).

Além disso, por meio de Resolução da Diretoria Colegiada (RDC nº 185 de 2001), a ANVISA tratou da classificação de risco dos produtos médicos correlatos para fins de registro. Assim, as empresas responsáveis pelos produtos devem enquadrá-los de acordo com o risco intrínseco que representam à saúde do consumidor, paciente, operador ou terceiros envolvidos (ANVISA, 2001). Considerando os critérios apresentados nesta norma, as resinas acrílicas de uso odontológico têm sido enquadradas como produto correlato da classe II, ou seja, de médio risco.

As resinas acrílicas surgiram entre os anos de 1937 e 1940 como uma excelente alternativa para confecção de próteses odontológicas. Dentre suas características, são enfatizadas a ausência de sabor e odor, propriedades térmicas satisfatórias, estabilidade dimensional, boa capacidade de polimento, possibilidade de pigmentação e caracterização, aparência agradável e simplicidade técnica (LOPES et al., 2011; CAMACHO et al., 2014). Como desvantagens, são destacadas a contração de polimerização e a influência das marcas comerciais na acurácia dimensional, o que pode provocar distorções (LOPES, 2011). Apesar disso, as resinas monoméricas têm ampla utilidade na odontologia devido à possibilidade de serem moldadas e transformadas em estruturas sólidas permanentes e estáveis após a polimerização (ANUSAVICHE, SHEN, RAWLS, 2013).

Atualmente, além do uso em próteses parciais e totais, as resinas acrílicas têm sido largamente utilizadas em procedimentos odontológicos relacionados a tratamentos de maloclusões ou de ronco e apnéia. Estas resinas são utilizadas também para confecção de: placas miorelaxantes, moldeiras individuais, padrões de fundição, próteses provisórias imediatas, coroas provisórias, reparo de próteses totais, acrilização de aparelhos ortodônticos e confecção de dentes artificiais (MORONI et al, 2005; CHAVES, 2012; CAMACHO et al., 2014). Ademais, uma outra aplicação clínica é a confecção de dispositivos como próteses ou mesmo enxertos na substituição de perdas ósseas ou de tecidos moles da face, dentre outros (MORONI et al, 2005; FILHO et al., 2007).

As resinas acrílicas são compostos orgânicos classificados como polímeros à base de carbono, hidrogênio e outros elementos não metálicos. Elas são normalmente fornecidas ao profissional em um sistema pó (polímero) e líquido (monômero), tendo o polimetilmetacrilato como componente químico principal. A depender da morfologia molecular, podem apresentar características fibrosas, borrachóides, resinosas e rígidas (CAMACHO et al., 2014).

Há pelo menos dois grupos de resinas acrílicas de interesse odontológico, ambos polimerizados por adição. Um dos grupos é proveniente do ácido acrílico e o outro do ácido metacrílico. Os monômeros derivados deste último apresentam facilidade técnica, podendo ser polimerizados de diferentes formas, o que os torna particularmente úteis (ANUSAVICE, SHEN, RAWLS, 2013). Tais formas de polimerização foram consideradas para a classificação das resinas acrílicas. Assim, de acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO nº 1567), elas podem ser classificadas em: tipo 1 – polímeros termo polimerizáveis; tipo 2 – polímeros autopolimerizáveis; tipo 3 – polímeros termoplásticos; tipo 4 – materiais fotoativados; e tipo 5 – materiais polimerizados através de micro-ondas (FILHO et al., 2007).

No caso das resinas autopolimerizáveis, antes da polimerização propriamente dita, o líquido é misturado ao pó, com a função de dissolver parcialmente o polímero e promover uma massa plástica a ser moldada. O pó é composto de microesferas pré-polimerizadas de polimetilmetacrilato, que se dissolvem no monômero. Além disso, contém também peróxido de benzoíla, que é o iniciador da reação de polimerização. O monômero, por sua vez, compõe-se basicamente de metilmetacrilato ou metacrilato de metila e hidroquinona (0,006%), sendo a hidroquinona um inibidor de polimerização que garante a estabilidade durante a armazenagem (CAMACHO et al., 2014).

Particularmente, para as resinas acrílicas quimicamente ativadas, o grau de polimerização alcançado não é completo, restando uma quantidade em torno de 3% a 5% de monômero livre, em comparação a 0,2% a 0,5 % nas resinas ativadas termicamente (CAMACHO et al., 2014). Este monômero residual pode ser um irritante para os tecidos em contato com a peça acrílica, comprometendo a biocompatibilidade de aparelhos confeccionados (JORGE et al., 2003; MORONI et al., 2005; FILHO et al., 2007; ROSE et al., 2000, PREMARAJ, 2014).

2.2 MUTAGÊNESE AMBIENTAL E CARCINOGÊNESE

A ocorrência de alterações no DNA durante o processo de divisão celular, especialmente durante a duplicação desta molécula, é um evento comum ao longo da vida dos seres (SALMAN, 2007). Tais modificações, conhecidas como mutações, são essenciais ao processo evolutivo e estão relacionadas à diversidade das espécies. Muitas destas mutações não implicam em mudanças nas atividades metabólicas celulares e, por isso, nem são percebidas (RIBEIRO,

MARQUES, 2003). No entanto, algumas delas determinam transtornos ao organismo como, por exemplo, o crescimento desordenado de células (PEREIRA et al., 2008).

As mutações são classificadas, quanto ao tipo celular, em somáticas, quando ocorrem em células outras que não as reprodutivas e germinativas, quando afetam as gônadas, podendo repercutir nas gerações futuras (mutações em células que originam gametas) (TARGA, RABELLO-GAY, 1983). As consequências mais comuns das mutações ocorridas em células somáticas são a morte celular, o envelhecimento precoce e a formação de tumores benignos ou malignos, entre outros (DUSMAN et al., 2012).

Além disso, as mutações são classificadas em gênicas, quando ocorrem diretamente na molécula do DNA, ou cromossômicas, quando a modificação se dá no número ou estrutura dos cromossomos. Estas alterações ocorrem de maneira espontânea, resultantes de processos celulares próprios, ou são induzidas pela exposição a agentes químicos, físicos ou virais, denominados agentes mutagênicos.

Os agentes mutagênicos são capazes, portanto, de incrementar as taxas de mutação produzindo, assim, aumento na ocorrência de alterações, gênicas e/ou cromossômicas, que quando envolvem genes comprometidos com o controle da proliferação e diferenciação celular, com os mecanismos de reparo e/ou com o processo de apoptose, podem levar ao processo de transformação maligna (RIBEIRO, MARQUES, 2003). Tal processo tem início, assim, pela replicação de alterações irreversíveis no DNA (ALBERTINI et al., 2000; PEREIRA, 2008; DUSMAN et al., 2012), evidenciando que os processos de mutagênese e carcinogênese estão intimamente associados.

Dentre as principais fontes de exposição humana a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos estão: a dieta, pela própria composição dos alimentos ou utilização de aditivos como, por exemplo, corantes; o consumo de determinadas substâncias, como o tabaco e bebidas alcoólicas; a exposição a agentes ambientais, como a radiação solar; e a exposição a agentes de natureza ocupacional, como produtos químicos industriais, os derivados do petróleo, as radiações ionizantes, entre outros (KHLIFI et al., 2013; KHAN et al., 2015; TERZIC et al., 2015).

Como os testes de carcinogênese possuem um custo muito elevado e consomem um tempo muito longo para sua aplicação, a identificação da atividade mutagênica é uma forma de controle do uso de produtos químicos pelos seres humanos (TARGA, RABELLO-GAY, 1983).

Neste contexto, a genotoxicidade, apesar de não ser uma medida direta de carcinogenicidade, é frequentemente utilizada como um indicador, uma vez que os dados

acumulados suportam a genotoxicidade como preditora para o risco de câncer humano (LOUREIRO, DI MASCIO, MEDEIROS, 2002; DÜSMAN et al., 2012).

Assim, a Genética Toxicológica tem por objetivo a avaliação do potencial genotóxico de agentes diversos, por meio das análises de danos genômicos, uma vez que a instabilidade genômica é parte importante no processo de carcinogênese (RIBEIRO, MARQUES, 2003; KHLIFI et al., 2013).

A necessidade de identificação dos efeitos genotóxicos associados a fatores exógenos, tem levado à crescente aplicação de testes de biomonitoramento como medida preventiva de desenvolvimento de câncer (ÇELIK et al., 2013; DEMIRCIGIL et al., 2014). Além disso, há interesse também no monitoramento da genotoxicidade humana independente do câncer, (ALBERTINI et al., 2000).

O *International Program on Chemical Safety* (IPCS) elaborou um guia com protocolos dos principais testes para biomonitoramento de efeitos genotóxicos em humanos. O protocolo considerou entre os métodos citogenéticos aplicados em larga escala a análise de aberrações cromossômicas, a hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e a análise de micronúcleos nos diferentes tipos celulares (ALBERTINI et al., 2000).

2.3. ORIGEM E SIGNIFICADO DOS MICRONÚCLEOS

A compreensão do modo como ocorre a formação dos micronúcleos requer o entendimento do processo de mitose. Tal processo faz parte do ciclo celular dos seres vivos e é por meio dele que uma célula-mãe se divide dando origem a duas células geneticamente idênticas entre si e à célula original (COSTA et al., 2006; ERGENE et al., 2007). Para tal, é preciso que o DNA seja integralmente duplicado previamente e que, no decorrer do processo, os cromossomos sejam equitativamente distribuídos para as células filhas. É através deste processo que ocorre o crescimento organizado, o reparo tecidual e a substituição de células perdidas por apoptose.

A mitose é didaticamente dividida em cinco etapas: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase. Na prófase, fase mais longa da mitose, o nucléolo e a carioteca desaparecem, tem início a condensação da cromatina e os pares de centríolos começam a se separar. Na prometáfase os centríolos dirigem-se aos polos. Na metáfase, os filamentos de cromatina alcançam o grau máximo de condensação, dando origem a cromossomos bem individualizados, dispostos em posição mediana nas células e ligados pelo centrômero às fibras do fuso. A anáfase

é a etapa em que ocorre divisão longitudinal do centrômero, com migração dos cromossomos-filhos para os polos. E, por fim, é na telófase que acontece o desaparecimento das fibras do fuso, com organização da carioteca e do nucléolo e descondensação dos cromossomos (Figura 1).

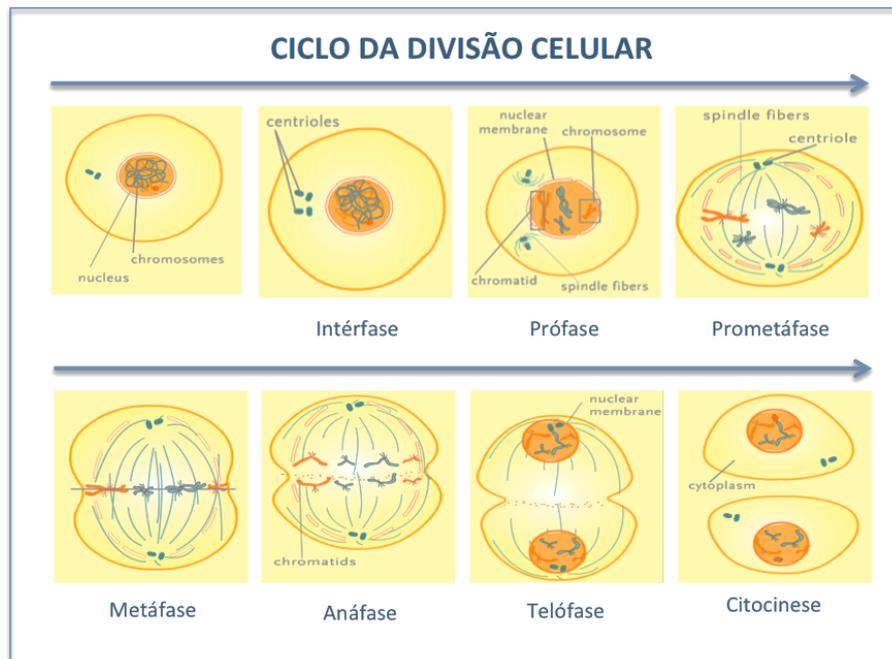


Figura 1: Ciclo da divisão celular
Fonte: <http://www.pbs.org/wgbh/nova>

Micronúcleos têm origem pela perda de um cromossomo que falha em sua ligação ao fuso (evento aneugênico) ou pela quebra de um fragmento cromossômico, ou cromatídico, que por não possuir centrômero não pode se ligar às fibras do fuso (evento clastogênico). Em ambas as situações permanecem fora do núcleo, sendo visualizados no citoplasma das células interfásicas como estruturas de aspecto similar à do núcleo principal, distintamente dele separado, medindo de 1/3 a 1/5 de seu tamanho (PALANIKUMAR, PANNEERSELVAM, 2011). A figura 2 apresenta esquematicamente o modo pelo qual os micronúcleos são formados.

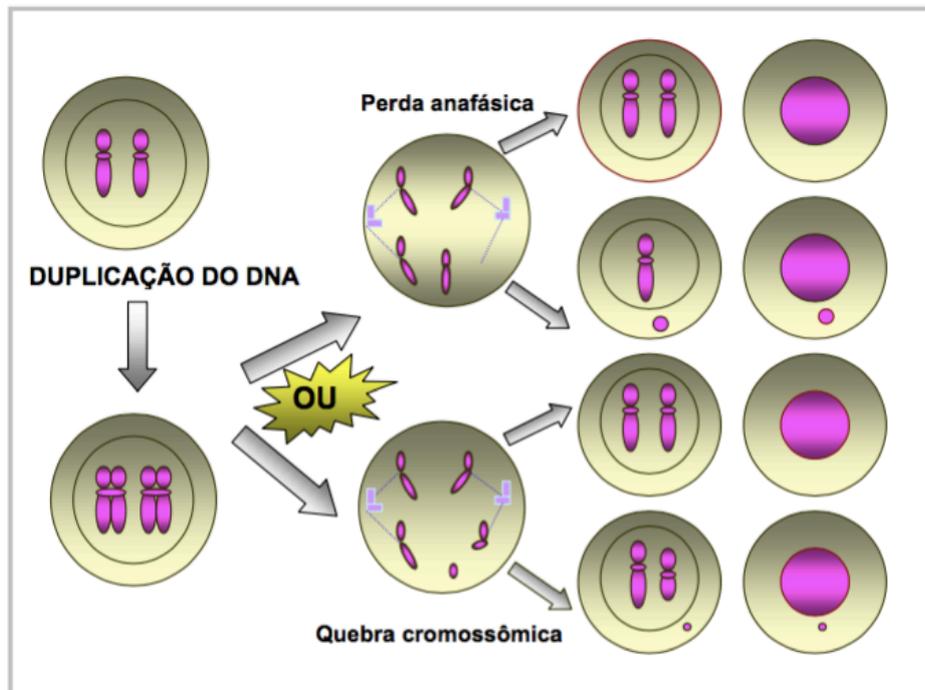


Figura 2: Desenho esquemático ilustrando a formação de micronúcleo por perda e fragmentação cromossômica

Fonte: Imagem gentilmente cedida por Encida de Moraes Marcílio Cerqueira

A formação de micronúcleo varia a depender do tipo de célula e é determinada pelas propriedades mecânicas da mesma, como também pelo tamanho e forma dos cromossomos (HEDDLE et al., 1991; CARRARD, 2007; BONASSI et al., 2009). Fato é que a presença de micronúcleo é indicativa da existência de alterações cromossômicas (AGOSTINI, 1993; PALANIKUMAR, PANNEERSELVAM, 2011; CUELLO-ALMARALES, 2017). E tais alterações estão relacionadas a danos cromossômicos espontâneos, induzidos ou a erros de segregação.

No epitélio oral, os micronúcleos ocorrem durante a divisão de células da camada basal e, por isso, representam alterações ocorridas durante a proliferação das células da camada basal. No entanto, como consequência do processo de maturação deste epitélio, são visualizados na camada mais superficial (AGOSTINI et al., 1993; BURGAZ et al., 2002; KAUSAR et al., 2014; ANDRADE et al., 2017).

O teste do micronúcleo tem sido bastante aplicado em estudos de biomonitoramento primário em genética toxicológica devido à sua capacidade de avaliação da genotoxicidade (HEDDLE, 1991; ERGENE et al., 2007; FEKI-TOUNSI et al., 2014). Trata-se de um teste relativamente simples, de fácil e amplo entendimento, podendo ser aplicado em diferentes amostras de células *in vitro* e, de maneira particular, *in vivo*, a exemplo dos linfócitos do sangue,

dos fibroblastos e de células epiteliais esfoliadas (GATTÁS et al., 2001; GONZALEZ-YEBRA et al., 2009; GANDHI, TUNG, 2017). Sendo assim, pode ser utilizado com sucesso para a detecção de efeitos citogenéticos em humanos expostos cronicamente a agentes mutágenos e/ou carcinogênicos (AGOSTINI, 1993; GONZALEZ-YEBRA et al., 2009; HINTZSCHE, STOPPER, 2010).

2.3.1 O Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal segundo o protocolo proposto por Tolbert, Shy e Allen (1991; 1992) e Thomas et al. (2009)

O teste de micronúcleo em células esfoliadas é considerado valiosa ferramenta na avaliação da ocorrência de danos cromossômicos pelas muitas vantagens que apresenta. Tais sejam: detecção de agentes com atividade clastogênica e aneugênica, custo relativamente baixo, simplicidade na análise, rapidez, procedimentos de coleta minimamente invasivos, dispensa de cultura de células, facilidade de transporte, armazenamento e possibilidade de preparação das lâminas à temperatura ambiente (UNAL et al., 2005; TORRES-BUGARÍN et al., 2014; KHAN et al., 2015; VIDYALAKSHMI et al., 2016). A possibilidade de subestimativa por inclusão de fragmentos ao núcleo principal, bem como a não detecção de trocas e outros rearranjos cromossômicos são as principais limitações do teste (CERQUEIRA, MEIRELES, 2014).

A mucosa bucal é um dos tecidos primeiramente expostos a agentes com efeitos tóxicos ao organismo. Ela funciona como uma barreira contra potenciais agentes carcinógenos e, por isso, é susceptível a danos passíveis de observação antes mesmo de uma manifestação sistêmica (TORRES-BUGARÍN et al., 2014).

As vantagens do teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal são sensivelmente aumentadas quando feito sob o protocolo proposto inicialmente por Tolbert, Shy e Allen (1991; 1992) e, posteriormente, por Thomas et al. (2009).

De acordo com o protocolo proposto por Tolbert, Shy e Allen (1991; 1992), quando da realização do teste de micronúcleo, além destas estruturas, devem ser computadas as alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose (cariorréxis, cromatina condensada e picnose) e necrose (cariólise adicionalmente às outras alterações) porque quando de sua maior ocorrência revelam efeitos genotóxicos e citotóxicos de uma dada exposição (YANG et al., 2017). Além destas alterações, o protocolo sugere ainda a contagem de células binucleadas e *broken eggs* (figura 3). Maioria das vezes, genotoxicidade está associada à iniciação do processo de

transformação maligna e a citotoxicidade à promoção do câncer via estimulação da proliferação celular (TOLBERT, SHY, ALLEN, 1992; ÇELIK et al., 2013; AYKANAT et al., 2016).

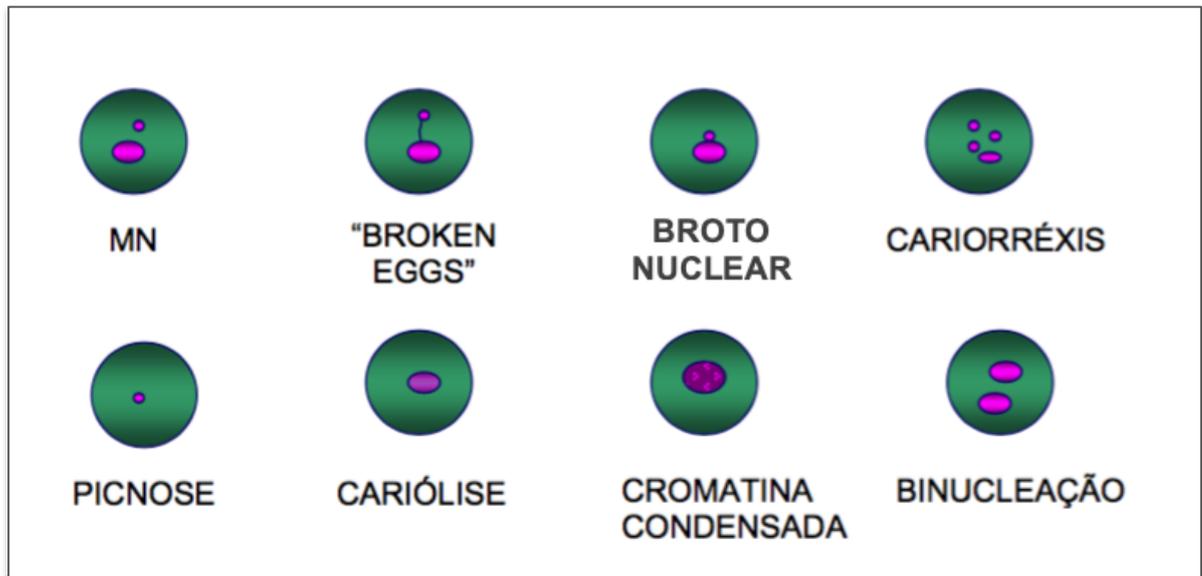


Figura 3: Desenho esquemático ilustrando micronúcleo (MN) e demais fenômenos nucleares degenerativos. Protocolo de Tolbert, Shy e Allen (1991; 1992)

Fonte: Imagem gentilmente cedida por Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira

A apoptose consiste na principal forma de morte celular e, sob controle fisiológico, faz parte dos mecanismos de renovação tecidual natural. No entanto, o excesso de apoptose pode ser um indicador de dano genotóxico. Já a necrose é uma outra forma de morte celular que ocorre em consequência de danos provocados por agentes promotores de citotoxicidade como resultado do desequilíbrio no ambiente celular (TOLBERT, SHY, ALLEN, 1992; GALLUZZI et al., 2018).

A cromatina condensada e a picnose estão relacionadas à diferenciação celular e maturação do epitélio, como parte do processo de morte celular e da descamação (CARRARD et al., 2007). Elas têm suas frequências aumentadas diante de danos celulares e são visualizadas, ao microscópio, com uma coloração mais intensa em relação ao núcleo, sendo que, na picnose, a estrutura nuclear se apresenta reduzida e as células com cromatina condensada apresentam um padrão nuclear em formato de estria (THOMAS et al., 2009).

A cariorréxis é caracterizada pela fragmentação do núcleo em pequenos corpos arredondados ou ovalados dentro do citoplasma intacto. E a cariólise se traduz na dissolução do núcleo e, visualmente, é marcada pela ausência do mesmo. Enquanto a primeira pode estar relacionada à necrose ou à apoptose, a última está presente apenas no processo de necrose (CARRARD et al., 2007).

As células binucleadas apresentam, como o próprio nome sugere, dois núcleos e parecem estar relacionadas a um erro durante a citocinese, como parte do processo de divisão celular. As consequências da binucleação ainda não são completamente conhecidas (TOLBERT, SHY, ALLEN, 1992; AQUINO et al., 2016; GANDHI, TUNG, 2017).

Os *broken eggs* e os brotos nucleares são estruturas arredondadas, de coloração e distribuição cromatínica semelhante a do núcleo apresentando continuidade com este. Enquanto o *broken egg* está ligado ao núcleo por um filamento de cromatina, o broto nuclear é uma projeção que resulta do estrangulamento em uma pequena área da superfície nuclear de onde uma protuberância arredondada desponta (CARRARD et al., 2007, CERQUEIRA, MEIRELES, 2014). O registro da literatura acerca destas estruturas é controverso, com alguns estudos apontando para associação com genotoxicidade (SELLAPPA et al., 2010, TAK et al., 2014) e outros não (BOHRER et al., 2005; NERSESYAN, 2005; CERQUEIRA, MEIRELES, 2014).

Ainda de acordo com o protocolo de Tolbert, Shy e Allen (1991; 1992), para que as células sejam contabilizadas na computação global devem ter as seguintes características: 1 - citoplasma intacto e posicionado de maneira relativamente plana; 2 - pequena ou nenhuma sobreposição com células adjacentes; 3 - poucos ou nenhum detrito; 4 - núcleo normal e intacto, perímetro nuclear suave e distinto.

O mesmo protocolo define os critérios de inclusão dos micronúcleos como: 1 - perímetro circular e suave, sugestivo de membrana; 2 - medindo até 1/3 do diâmetro do núcleo, mas grande o suficiente para discernir cor e forma; 3 - Feulgen-positivo (coloração rósea); 4 - intensidade da coloração similar a do núcleo; 5 - textura similar a do núcleo; 6 - visualizado no mesmo plano focal do núcleo e; 7 - ausência de sobreposição ou ponte com o núcleo. Aquelas células que corresponderem a todos os critérios são pontuadas como de alta certeza, as com estrutura sugestiva de micronúcleo, no entanto, com deficiência no preenchimento de todos os requisitos, são pontuadas como de baixa certeza (YANG et al., 2017). Os autores consideram que uma fotografia deve ser realizada sempre que uma célula for pontuada como apresentando micronúcleo (TOLBERT, SHY, ALLEN, 1992).

Thomas et al. (2009) ratificaram os critérios de contagem propostos por Tolbert, Shy e Allen (1991; 1992) em um protocolo detalhado do teste de micronúcleo em células da mucosa bucal, denominado pelos mesmos como *Buccal Micronucleus Cytome Test* (BMCyt). Neste protocolo, os autores recomendam a medida de biomarcadores de: danos ao DNA (micronúcleos e/ou brotos nucleares); defeitos na citocinese (células binucleadas) e potencial

proliferativo da mucosa (frequência de células basais); e/ou morte celular (cromatina condensada, cariorréxis, picnose e cariólise).

2.3.2 Biomonitoramento de populações com a utilização do Teste do Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal

O biomonitoramento de populações feito com o uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal tem amplo registro na literatura, e tem sido utilizado para avaliação de danos cromossômicos em diversas condições. A saber:

1) hábitos de vida, como fumar (SUHAS, GANAPATHY, RAMESH, 2004; KAUSAR et al., 2014; JOSHI et al., 2011; NERSESYAN et al., 2011; BARBON et al., 2014; MOTIGI et al., 2014; SILVA et al., 2015; ADHIKARI, DE, 2016; DOSI et al., 2016; EKER, KOYUNCU, DILER, 2016; GANGADHARAN, MOHAN, ADILAKSHMI, 2016; DASH et al., 2018; JEYARAJ, SEHGAL, 2018; SHARMA et al., 2018; AMIN, PATEL, CHATTOO, 2019), ingerir bebidas alcoólicas (STICH, ROSIN, 1984; RAMIREZ, SALDANHA, 2002; REIS et al., 2002; ROCHA, 2011; DUTTA, BAHADUR, 2016), uso de colutórios (ROS-LLOR, LOPEZ-JORNET, 2014; KHAN, HASAN, KHAN, 2015), de aparelho celular (HINTZSCHE, STOPPER, 2010; OLIVEIRA, CARMONA, LADEIRA, 2017), de esteroides anabolizantes (TORRES-BUGARÍN et al., 2007).

2) avaliação dos efeitos da idade e sexo (SOBOL, BEZRUKOV, 2007; RIBEIRO et al., 2008; HOLLAND et al., 2011; JONES et al., 2011; ROSSNEROVA et al., 2016);

3) efeitos da depleção de nutrientes da dieta (THOMAS et al., 2011; MÜLLNER et al., 2013; TORRES-BUGARIN et al., 2014);

4) avaliação da ação protetora de antioxidantes e outros antimutagênicos (HOLLAND et al., 2007; GOMEZ-MEDA et al., 2016);

5) identificação dos danos genéticos induzidos em determinadas doenças (NERSESYAN et al., 2002; UNAL et al., 2005; THOMAS et al., 2007; ROTH et al., 2008; FERREIRA, PRÁ, GARCIAS, 2009; BURGAZ et al., 2011; DÓREA et al., 2012; KHLIFI et al., 2013; FEKI-TOUNSI et al., 2014; KATARKAR et al., 2014; ZAMORA-PEREZ et al., 2014; BRANDÃO et al., 2015; PRASANNA et al., 2015; VIDYALAKSHMI, 2016; CUELLO-ALMARALES et al., 2017; GANDHI, TUNG, 2017; KOHLI et al., 2017; IDOLO et al., 2018; KIRAN et al., 2018);

6) avaliação dos efeitos de drogas quimioterápicas e da radioterapia (NERSESYAN, 2007; MINICUCCI et al., 2008; TAK et al., 2014; SOUZA et al., 2016);

7) biomonitoramento de populações não ocupacionalmente expostas a mutágenos (CERQUEIRA et al., 2004; BLOCHING et al., 2008; RIBEIRO, ANGELIERI, 2008; RIBEIRO et al., 2008; WESTPHALEN et al., 2008; RIBEIRO, 2012; OLIVEIRA et al., 2014; SHEKHAWAT et al., 2015; CASTAÑEDA-YSLAS et al., 2016; YANG et al., 2017; ANTONIAZZI et al.; 2018; BASARAN et al., 2019; FEDERICO et al., 2019; MARY et al., 2018; TADIN et al., 2019).

8) biomonitoramento de populações ocupacionalmente expostas

O teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal vem sendo largamente empregado no biomonitoramento de populações ocupacionalmente expostas a diversos agentes mutagênicos e sob as mais diferentes formas. No quadro 1 estão resumidamente listados alguns dos estudos realizados nos últimos dez anos.

Quadro 1. Estudos em que foi utilizado o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal no biomonitoramento de indivíduos ocupacionalmente expostos.

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra	Alterações Analisadas	Principais Resultados
GONZÁLEZ-YEBRA et al. (2009)	Trabalhadores de fábrica de sapatos expostos a solventes. Cidade de Leon, México.	Transversal.	34 expostos. 34 controles.	micronúcleo, cariorréxis, <i>broken eggs</i> , célula binucleada, picnose, cariólise cromatina condensada.	Frequência significativamente maior de micronúcleo ($p=0,0015$), cariorréxis ($p=0,04$) e <i>broken eggs</i> ($p=0,04$) em expostos comparados ao controle.

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra	Alterações Analisadas	Principais Resultados
SELLAPPA et al. (2010)	Frentistas. Sul da Índia.	Transversal.	110 expostos (30 fumantes, 30 não fumantes, 31 fumantes e etilistas e 19 fumantes e mascadores de tabaco). 100 controles (30 fumantes, 30 não fumantes, 26 fumantes e etilistas e 14 fumantes e mascadores de tabaco).	micronúcleo, célula binucleada e <i>broken eggs</i> .	Houve diferença significativa nas frequências de micronúcleo entre expostos fumantes ($12,61 \pm 0,39$) em relação aos controles fumantes ($2,79 \pm 0,16$). $p < 0,001$. Os fumantes em relação aos controles apresentaram diferenças significativas ($2,79$ vs $1,63$). $p < 0,001$. A média da frequência de micronúcleo dos expostos não fumantes foi de $11,17 \pm 1,06$ e dos controles não fumantes $1,63 \pm 0,05$ ($p < 0,001$). As frequências de micronúcleo nos expostos fumantes e etilistas foi de $13,94 \pm 0,09$ e dos controles fumantes e etilistas $3,64 \pm 0,02$ ($p < 0,001$).

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
DILER, ÇELİK (2011)	Trabalhadores de uma fábrica de carpetes. Diferentes regiões da Turquia.	Transversal.	50 expostos (25 fumantes e 25 não fumantes). 50 controles (25 fumantes e 25 não fumantes).	micronúcleo, cariorréxis, cariólise, <i>broken eggs</i> e célula binucleada.	Houve diferença significativa nas frequências de micronúcleo entre trabalhadores ($11,7 \pm 4,39$) em relação aos controles ($3,4 \pm 0,84$) ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre os trabalhadores fumantes ($12,8 \pm 3,89$) e os trabalhadores não fumantes ($10,6 \pm 4,63$) ($p > 0,05$).
BENEDETTI et al. (2013)	Colhedores de soja expostos a pesticidas. Espumoso, Brasil.	Transversal	81 expostos. 46 controles.	micronúcleo, broto nuclear, célula binucleada, cariólise, cromatina condensada, picnose e cariorréxis.	Observada frequência significativamente maior de micronúcleo ($p < 0,001$), brotos nucleares ($p < 0,01$), célula binucleada ($p < 0,01$), cromatina condensada ($p < 0,05$), cariorréxis ($p < 0,01$) e cariólise ($p < 0,05$) nos expostos comparativamente aos não expostos.

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
ÇELİK et al. (2013)	Trabalhadores de pavimentação asfáltica. Província de Mersin, Turquia.	Transversal.	40 expostos (20 fumantes e 20 não fumantes). 40 controles (20 fumantes e 20 não fumantes).	micronúcleo, cariorréxis, cariólise, <i>broken egg</i> , célula binucleada, cromatina condensada e células picnóticas.	Aumento significativo na frequência de micronúcleo do grupo exposto em relação ao grupo controle ($p<0,001$). Não foram encontradas diferenças entre os grupos de fumantes e não fumantes em relação à frequência de micronúcleo e alterações nucleares no grupo exposto ($p>0,05$).
BRUSCHWEILER et al. (2014)	Trabalhadores expostos a pó de madeira. Suíça.	Transversal.	31 homens expostos. 19 homens controles.	micronúcleo, broto nuclear, <i>broken eggs</i> , célula binucleada, cariólise, cromatina condensada, picnose e cariorréxis.	O grupo exposto apresentou frequências significativamente maiores de micronúcleo ($2,8\pm 1,5$) em relação ao controle ($1,6\pm 0,8$) ($p<0,001$). Foram observadas frequências significativamente maiores de cariorréxis, picnose e cariólise também nos trabalhadores expostos comparados com o grupo controle ($p<0,001$).

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
KAUSAR et al. (2014)	Jardineiras de fábrica de chá, mascadoras de tabaco e expostas a pesticidas. Assam, Índia.	Transversal.	90 jardineiras mascadoras expostas 90 não jardineiras não mascadoras 70 não jardineiras, mascadoras.	micronúcleo, broto nuclear, célula binucleada, cariólise, cromatina condensada, picnose e cariorréxis.	As jardineiras apresentaram frequências significativamente maiores de micronúcleos ($p<0,001$) e de brotos nucleares ($p<0,05$) em relação ao grupo de não mascadoras. As frequências de cariólise, cromatina condensada, picnose e cariorréxis também foram significativamente mais altas nesta comparação ($p<0,001$). O grupo de mascadoras não jardineiras apresentou frequência significativamente maior de micronúcleos ($0,9\pm 0,05$) e brotos nucleares ($0,13 \pm 0,02$) comparado ao grupo de não mascadoras ($p<0,001$).
AQUINO et al. (2016)	Técnicos de laboratório de patologia expostos a solventes. Santa Cruz do Sul, Brasil.	Transversal e longitudinal	18 técnicos expostos; 11 controles. Coletas realizadas em uma segunda-feira e na sexta-feira subsequente, ao final da semana de trabalho.	micronúcleo, célula binucleada, broto nuclear, cromatina condensada, picnose, cariólise e cariorréxis.	As frequências de cariólise e células apoptóticas (cromatina condensada, cariorréxis e picnose) das amostras dos técnicos coletadas na sexta-feira foram significativamente maiores que no grupo controle ($p<0,001$), como também quando comparadas com as coletas dos técnicos realizadas na segunda-feira ($p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente).

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
JARA-ETTINGER et al. (2015)	Soldadores. Morélia e Guadalajara, México.	Transversal.	33 expostos; 33 controles.	micronúcleo, célula binucleada, broto nuclear, cromatina condensada, picnose, cariólise e cariorréxis.	A ocorrência de células binucleadas e com cromatina condensada foi significativamente maior nos expostos ($p<0,001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na ocorrência de micronúcleos, picnose, cariólise e cariorréxis ($p>0,05$).
WULTSCH et al. (2015)	Trabalhadores expostos a baixos níveis de pó de madeira. Viena e Graz, Áustria.	Transversal.	51 trabalhadores – fábrica de compensados; 38 carpinteiros; 65 controles.	micronúcleo, brotos nucleares, célula binucleada, picnose, cariorréxis, cariólise e cromatina condensada.	Não houve diferença significativa na ocorrência de micronúcleos ($p>0,05$). A ocorrência de todas as outras alterações nucleares, com exceção de picnose, foi significativamente maior nos dois grupos expostos em relação ao controle ($p<0,05$).
KHAN et al. (2015)	Trabalhadores fábrica de tecidos expostos a poeira de algodão. Faisalabad, Paquistão.	Transversal.	51 trabalhadores expostos, sexo masculino; 51 controles, sexo masculino.	micronúcleo, cariólise, cariorréxis, cromatina condensada, picnose, brotos nucleares e <i>broken eggs</i> .	A ocorrência de micronúcleos foi significativamente maior entre os trabalhadores expostos com mais de 20 anos de exposição ($p<0,001$) Houve ocorrência significativamente maior de cariólise, cariorréxis, cromatina condensada e picnose no grupo de trabalhadores em relação ao controle ($p<0,001$).

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
DUTTA, BAHADUR (2016)	Pulverizadores de pesticidas e colhedores de chá. Região de Terai, Bengala Ocidental, Índia.	Transversal.	47 expostos fumantes e etilistas; 47 não expostos, não fumantes e não etilistas; 35 fumantes não expostos; 30 etilistas não expostos.	micronúcleos, brotos nucleares, células binucleadas, cariorréxis, picnose e cariólise.	Houve ocorrência significativamente maior de micronúcleos, brotos nucleares, células binucleadas, cariorréxis, cariólise ($p<0,001$) e picnose ($p<0,05$) no grupo de pulverizadores quando comparado aos não pulverizadores. Foi encontrada maior ocorrência de micronúcleos ($p<0,01$), brotos nucleares ($p<0,05$), células binucleadas ($p<0,001$), cariorréxis ($p<0,001$) e cariólise ($p<0,001$) nos fumantes em relação aos não fumantes. Células binucleadas, brotos nucleares, cariorréxis, picnose ($p<0,05$) e cariólise ($p<0,001$) tiveram ocorrência significativamente maior em etilistas quando comparados com os não etilistas.
ANDRADE et al. (2017).	Coletores de lixo. Salvador, Brasil.	Transversal.	47 homens coletores. 30 homens controles.	micronúcleos, picnose, cariólise e cariorréxis.	Ocorrências significativamente maiores de picnose e cariólise foram encontradas nos coletores de lixo quando comparados com o grupo controle ($p<0,05$).

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
WULTSCH et al. (2017).	Operadores de galvanoplastia expostos ao cromo e ao cobalto. Viena, Áustria.	Transversal	42 expostos. 43 controles	micronúcleo, broto nuclear, cariólise, cromatina condensada, picnose e cariorréxis.	Houve aumento significativo de brotos nucleares ($p<0,05$) e cariorréxis ($p<0,001$) entre os expostos.
BRINA et al. (2018)	Coletores de lixo e recicladores. Dois municípios no Rio Grande do Sul, Brasil.	Transversal.	44 expostos. 45 controles.	micronúcleos, brotos nucleares, <i>broken eggs</i> , células binucleadas, cariorréxis,	O grupo exposto apresentou valores significativamente maiores ($p<0,001$) em relação ao controle dos seguintes <i>endpoints</i> : Micronúcleos - $0,59\pm0,84$ x $0,07\pm0,18$ Células binucleadas - $2,54\pm2,86$ x $0,46\pm0,58$ Cariorréxis - $4,45\pm2,95$ x $0,86\pm0,90$
CLAUDIO et al. (2019)	Trabalhadores em plantações de bananas expostos a pesticidas. Registro, Brasil.	Transversal.	21 expostos. 20 controles.	micronúcleos, picnose, cariorréxis, cariólise.	O grupo exposto, comparado ao controle, apresentou valores significativamente maiores de micronúcleos ($0,95\pm1,5$ x $0,1\pm0,2$) e cariorréxis ($61,3\pm49,7$ x $2,0\pm1,7$). $p<0,05$

9) Biomonitoramento de crianças e adolescentes sob diferentes tipos de exposição.

Tem sido crescente a realização de estudos incorporando biomarcadores de exposição e de efeito em crianças (NERI et al., 2003; NERI et al., 2005; SOBOL e BEZRUKOV, 2007; HOLLAND et al., 2011). A relevância de tais estudos está no fato de que as crianças podem ter maior sensibilidade aos agentes genotóxicos (SCHEUPLEIN et al., 2002) e também porque os danos genéticos em idades tenras podem levar ao desenvolvimento de agravos à saúde ao longo da vida (NERI et al., 2003). As crianças, particularmente recém-nascidas, podem ser mais sensíveis a mesma exposição ambiental, tóxica ou medicamentosa que um adulto exposto nas mesmas condições (SCHEUPLEIN, CHARNLEY, DOURSON, 2002; HOLLAND et al., 2011). Além disso, fatores de confusão frequentes entre adultos, como o hábito de fumar, etilismo, exposição ocupacional a genotóxicos e mesmo fatores nutricionais, habitualmente não atuam sobre as crianças e adolescentes (SCHEUPLEIN, CHARNLEY, DOURSON, 2002).

Entre os métodos de biomonitoramento nesses indivíduos, o teste de micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal tem sido uma escolha frequente, tendo em vista o maior conforto na coleta e a eficiência. Vários fatores são importantes na variabilidade dos micronúcleos em crianças, incluindo a especificidade do tecido, idade, sexo, estado de saúde e fatores ambientais e nutricionais (HOLLAND et al., 2011).

Assim, as crianças e adolescentes expostos a mutágenos merecem especial atenção, haja vista a maior susceptibilidade a genotóxicos e maior expectativa de vida oportunizando o acúmulo de danos ao DNA. Neste contexto, o registro na literatura também é amplo. No quadro 2 são resumidamente apresentados alguns dos estudos realizados nos últimos dez anos.

Quadro 2. Pesquisas em que foi utilizado o Teste de Micronúcleo (MN) em células esfoliadas da mucosa bucal de crianças.

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
EL-ASHIRY, ABO-HAGER, GAWISH (2010).	Radiografias panorâmicas da face em crianças. Cairo, Egito.	Longitudinal.	20 crianças (coletas feitas antes e 10 ± 2 dias depois da exposição).	micronúcleo, cromatina condensada, cariorréxis, picnose e cariólise.	Frequências de micronúcleo e cariólise foram maiores após exposição, porém sem diferença estatística ($p < 0,792$ e $p < 0,099$). As frequências de cromatina condensada, cariorréxis e picnose foram significativamente maiores após a exposição $p < 0,001$.
LORENZONI et al. (2012).	Radiografias odontológicas para planejamento ortodôntico. Rio de Janeiro, Brasil.	Longitudinal.	25 crianças e adolescentes (coletas feitas antes e 10 dias depois da exposição). Idade média de 11,2 ± 1,4 anos.	MN, picnose, cariólise e cariorréxis.	A frequência de MN antes da exposição foi de 0,08%. Não foi encontrada diferença estatística após a radiação. Um aumento significativo pós exposição foi observado nas outras alterações nucleares ($p = 0,007$).

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
DEMIRCIGIL et al. (2014).	Efeitos da poluição do ar em crianças. Eskişehir, Turquia.	Transversal.	101 crianças expostas ao tráfego urbano (50) e suburbano (51) durante o verão; 93 das mesmas crianças expostas ao tráfego urbano (46) e suburbano (47) durante inverno.	MN	Não houve diferença estatística na ocorrência de micronúcleos em função da estação nas crianças do subúrbio ($p>0,05$). As ocorrências de micronúcleos das crianças expostas ao tráfego urbano e do grupo total de crianças foram significativamente maiores no verão ($p<0,05$).
LORENZONI et al. (2013).	Crianças submetidas à tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) da face e crianças submetidas a protocolo radiográfico para ortodontia avaliadas antes e 10 dias após a exposição. Rio de Janeiro, Brasil	Longitudinal	24 crianças submetidas a TCFC; 25 crianças submetidas ao protocolo radiográfico para ortodontia.	MN, picnose, cariólise e cariorréxis.	As frequências de picnose, cariólise e cariorréxis foram significativamente maiores após a exposição em ambos os grupos ($p<0,05$).

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
CERETTI et al. (2014).	Efeitos da poluição do ar em crianças. Brescia, Itália.	Transversal.	181 crianças (3-6 anos) durante inverno em 2012 e em 2013.	MN, brotos nucleares, células binucleadas, cromatina condensada, cariorréxis, picnose e cariólise.	Nenhuma diferença significativa entre as frequências foi observada de acordo com o sexo e idade ($p>0,05$). Foi encontrado um aumento discreto, porém estatisticamente significativo, das frequências das anomalias nucleares (MN, brotos e células binucleadas) no inverno, em função do aumento da concentração de poluentes ($p<0,05$).
AYKANAT et al. (2016).	Crianças com doença renal crônica. Ankara, Turquia.	Transversal.	17 crianças em pré-diálise 14 crianças em hemodiálise 17 crianças transplantadas 20 crianças saudáveis grupo controle	MN, brotos nucleares, células binucleadas, cromatina condensada, cariorréxis e picnose.	A frequência de MN nas crianças portadoras de doença renal crônica foi cinco a sete vezes mais elevada que a do grupo controle ($p<0,001$). Entre as outras alterações nucleares estudadas, apenas os brotos nucleares não apresentaram frequências significativamente maiores entre as crianças com doença renal crônica em relação ao controle.

(Continua)

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
CASTAÑEDA-YSLAS et al. (2016).	Crianças expostas a pesticidas. Baja Califórnia, México.	Transversal.	34 crianças expostas; 38 crianças não expostas.	MN, cariorréxis, cromatina condensada, picnose, cariólise, broto nuclear.	O grupo de crianças expostas apresentou valores significativamente maiores de MN, cromatina condensada e picnose em relação ao controle ($p < 0,0001$).
CAVALCANTE et al. (2017).	Crianças de uma escola pública expostas passivamente à fumaça do cigarro e a poluentes. Dourados, Brasil	Transversal.	24 crianças expostas a poluentes do ar e à fumaça. 19 crianças de uma área com baixa circulação de veículos e não expostas à fumaça	MN, cariorréxis, cariólise, picnose, <i>broken eggs</i> .	Apenas a frequência de cariólise foi maior nas meninas expostas ($4,35 \pm 1,59$) ($p < 0,05$).

Autor/Ano	Exposição/Local estudo	Tipo de Estudo	Amostra / Local	Alterações Analisadas	Principais Resultados
IDOLO et al. (2018)	<p>Crianças vivendo em uma área de alta incidência de câncer de pulmão.</p> <p>Região meridional da Itália.</p>	Transversal.	<p>94 crianças entre 6 e 8 anos de idade.</p> <p>*213 crianças residentes em Lecce, região com baixos níveis de poluentes analisadas em estudo anterior</p>	<p>MN, broto nuclear, cromatina condensada, cariorréxis, picnose e cariólise.</p>	<p>O grupo das crianças do presente estudo apresentaram valores significativamente maiores em relação às crianças de Lecce ($p<0,01$):</p> <p>MN - $0,49\pm0,65$ x $0,24\pm0,32$</p> <p>Brotos nucleares - $0,10\pm0,33$ x $0,09\pm0,26$</p> <p>Cromatina Condensada - $51,20\pm17,97$ x $26,60\pm18,59$</p> <p>Picnose - $0,64\pm1,00$ x $0,11\pm0,31$</p> <p>E apresentaram valores significativamente menores em relação a ($p<0,01$):</p> <p>Cariólise - $16,00\pm4,76$ x $28,62\pm21,05$</p> <p>Cariorréxis - $8,50\pm5,74$ x $13,29\pm13,90$</p>

3. Potencial citotóxico e genotóxico das resinas acrílicas

Apesar dos variados métodos adotados para a polimerização das resinas acrílicas, a conversão do monômero em polímero nunca é completa, especialmente naquelas ativadas quimicamente (BAKER, BROOKS e WALKER, 1988; LEGGAT, KEDJARUNE, 2003; FILHO et al., 2007; CAMACHO, 2014). Resultados de diversos estudos indicam que quantidades variadas de monômeros do metilmetacrilato podem ser liberadas na cavidade bucal durante o uso de dispositivos intra-orais ou de recursos protéticos como coroas e pontes provisórias (JORGE et al., 2003; LEGGAT, KEDJARUNE, 2003; MORONI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2006; FILHO et al., 2007; CHAVES et al., 2012).

O monômero residual, além de alterar as propriedades físicas finais das resinas, quando em contato com a saliva e tecidos moles, leva ao aparecimento de reações teciduais locais e sistêmicas (ROSE et al., 2000; YANG et al., 2003; JORGE et al., 2003; MORONI et al., 2005; GONÇALVES et al., 2006; FILHO et al., 2007; PREMARAJ et al., 2014).

Além das reações diretas à mucosa bucal, efeitos adversos ocupacionais são comuns e os profissionais expostos podem apresentar várias formas de dermatites nas mãos ou face, como também doenças respiratórias (LEGGAT, KEDJARUNE, 2003; ANUSAVICE, SHEN, RAWLS, 2013).

Chaves et al. (2012) realizaram uma revisão sistemática sobre a citotoxicidade de materiais utilizados em bases protéticas e encontraram algumas evidências de que as resinas autopolimerizáveis apresentam efeitos citotóxicos ainda maiores que as termopolimerizáveis.

Rose et al. (2000) pesquisaram as propriedades citotóxicas de resinas acrílicas autopolimerizáveis e termopolimerizáveis utilizadas em ortodontia através do teste de proliferação-inibição de Mosmann, aplicado em uma cultura de fibroblastos de ratos. Neste teste, é avaliada a vitalidade de células proliferativas incubadas e expostas ao agente que se deseja avaliar. Os pesquisadores evidenciaram a inter-relação entre o maior nível de monômero residual e a atividade citotóxica.

Além dos efeitos citotóxicos potenciais descritos, o contato com monômeros não polimerizados pode levar a uma reação imunológica ao material, a distúrbios nos ciclos celulares, apoptose, além de indução de mutagênese e/ou de carcinogênese (YANG et al., 2003; PREMARAJ et al., 2014).

Apesar de algumas agências internacionais classificarem o metilmetacrilato como não carcinogênico (ALBERTINI, 2017), em estudo longitudinal em que foi investigada a mortalidade por câncer entre cirurgiões gerais expostos a esta substância, foi observado um

aumento nas mortes por esta doença quando feita comparação com cirurgiões gerais não expostos (DIAZ, 2011). O autor concluiu que profissionais de saúde expostos ao metilmetacrilato podem ter maior risco de morte prematura por tumores malignos.

Os resultados dos estudos em que foi avaliado o potencial genotóxico de resinas acrílicas ou dos monômeros de metilmetacrilato, seus principais constituintes, são conflitantes (GIGOLA, 2001; SCHWEIKL, SCHMALZ, SPRUSS, 2001; LEGGAT, KEDJARUNE, 2003; YANG et al., 2003). Yang et al. (2003) avaliaram *in vitro* os efeitos citotóxicos e citogenéticos do metilmetacrilato em células de hamsters. Para tal, aplicaram os testes de eficiência de formação de colônias celulares, síntese de DNA e aberrações cromossômicas. Os pesquisadores concluíram que o metilmetacrilato se mostrou não apenas um agente citotóxico, mas também genotóxico.

Topajiche et al. (2015) avaliaram os efeitos genotóxicos do metilmetacrilato e de metais (níquel, cobalto e cromo) manipulados por técnicos de laboratórios odontológicos utilizando o teste de micronúcleo em células esfoliadas do epitélio bucal. Neste estudo, 28 técnicos fizeram parte do grupo de exposição (11 expostos apenas às resinas acrílicas, 8 apenas ao metal e 9 a ambos) e 28 indivíduos sem histórico de exposição foram avaliados como grupo-controle. Foram encontradas frequências significativamente mais altas de micronúcleos nos indivíduos expostos ($13,5 \pm 2,5$) em relação aos controles ($2,57 \pm 1,3$). A comparação entre os 3 grupos expostos não revelou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,632$).

Por outro lado, Azhar et al. (2013) não detectaram maior ocorrência de micronúcleos em estudo realizado com a utilização do Teste do Micronúcleo para avaliação dos efeitos genotóxicos do metilmetacrilato na mucosa bucal de 13 técnicos de laboratórios odontológicos ($5,21 \pm 2,20$) e 14 indivíduos não expostos como grupo controle ($6,23 \pm 2,42$).

Maior ocorrência de micronúcleos, consequentes à exposição a doses clínicas de diversos componentes de materiais dentários resinosos, não foi também descrita por Schweikl, Schmalz e Spruss (2001) ao analisarem estas estruturas em fibroblastos de pulmões de hamsters chineses. Os resultados obtidos apontaram para uma maior ocorrência delas apenas em doses elevadas, isto é, acima das aplicações clínicas.

São, portanto, escassos e conflitantes os estudos em que o potencial genotóxico das resinas acrílicas de uso odontológico foi avaliado suscitando, assim, a realização de novos estudos com este objetivo.

REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, A.; DE, M. Micronuclei (oral cancer biomarker) study in buccal mucosal cell with betel quid chewers among indian population. *ARC Journal of Cancer Science*, v. 2, n. 1, p. 36–39, 2016.
- AGOSTINI, J.M.S. O teste do micronúcleo: seu uso no homem. *Biotemas*, v. 6, n. 2, p. 1-19, 1993.
- ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research*, v. 463, n. 2, p. 111–172, 2000.
- ALBERTINI, R.J. The lower alkyl methacrylates: genotoxic profile of non-carcinogenic compounds. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 84, p.77–93, 2017.
- AMIN, S.; PATEL, N.; CHATTOO, B. Oral cancers – Micronuclei as biomarker of genotoxicity a population-based study to establish usable dynamic cut off limits in tobacco users. *International Journal of Molecular & Immuno Oncology*, v. 4, n. 1, p. 9–12, 2019.
- ANDRADE, M. C. et al. Cytogenetic biomonitoring in buccal mucosal cells from municipal solid waste collectors. *Anticancer Research*, v. 37, n. 2, p. 849–852, 2017.
- ANTONIAZZI, R. P. et al. Impact of crack cocaine use on the occurrence of oral lesions and micronuclei. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 47, n. 7, p. 888-895, 2018.
- ANUSAVICE, K.J.; SHEN, C.S.; RAWLS, H.R. *Phillips' Science of Dental Materials*. 12 ed. Missouri: Elsevier, 2013, 571 p.
- ANVISA, RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA Nº 185, DE 22 DE OUTUBRO DE 2001, BRASÍLIA, DF, out 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_185_2001_COMP.pdf. Acesso em: 10 fev 2019.
- AQUINO, T. DE et al. DNA damage and cytotoxicity in pathology laboratory technicians exposed to organic solvents. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 88, n. 1, p. 227–236, 2016.
- AYDIN, O. et al. The effects of methyl methacrylate on nasal cavity, lung, and antioxidant system (An Experimental Inhalation Study). *Toxicologic Pathology*, v. 30, n. 3, p. 350–356, 2002.
- AYKANAT, B. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal epithelial cells of children with chronic kidney disease. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju*, v. 67, n. 4, p. 317–325, 2016.
- AZHAR, D. A. et al. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dental Materials Journal*, v. 32, n. 3, p. 519–521, 2013.

- BAKER, S.; BROOKS, S.C.; WALKER, D.M. The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: an assay for monomer in saliva. *Journal of Dentistry Research*, v. 67, n. 10, p. 1295-1299, 1988.
- BARBON, F. J. et al. Micronúcleos em fumantes e etilistas. *Journal of Oral Investigations*, v. 3, n. 2, p. 42–45, 2014.
- BASARAN, N. B. et al. Environmental boron exposure does not induce dna damage in lymphocytes and buccal cells of females: DNA damage in lymphocytes and buccal cells of boron exposed females. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 53, p. 150-153, 2019.
- BENEDETTI, D. et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 752, n. 1–2, p. 28–33, 2013.
- BENOVA, D. et al. Cytogenetic effects of hexavalent chromium in Bulgarian chromium platers. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 514, n. 1–2, p. 29–38, 2002.
- BLOCHING, M. et al. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. *Oral Oncology*, v. 44, n. 3, p. 220–226, 2008.
- BOHRER, P. L. et al. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytologica*, v. 49, n. 3, p. 265–272, 2005.
- BONASSI, S. et al. State of art survey of the buccal micronucleus assay – a first stage in the HUMN_{XL} project initiative. *Mutagenesis*, v. 24, n. 4, p. 295-302, 2009.
- BORTOLI, G. M.; AZEVEDO, M. B.; SILVA, L. B. Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 675, n. 1–2, p. 1–4, 2009.
- BRANDÃO, P. et al. Can periodontal infection induce genotoxic effects? *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 73, n. 3, p. 219–225, 2015.
- BRASIL, LEI Nº 5991, DE 17 DE DEZEMBRO DE 1973, BRASÍLIA, DF, dez 1973.
Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/15991.htm. Acesso em: 10 fev 2019.
- BRASIL, LEI Nº 6360, DE 23 DE SETEMBRO DE 1976, BRASÍLIA, DF, set 1976.
Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L6360.htm. Acesso em: 10 fev 2019.
- BRINA, K. R. et al. Chemosphere Micronuclei and other nuclear anomalies in exfoliated buccal cells of urban solid waste collectors and recyclers in southern Brazil. *Chemosphere*, v. 193, p. 1058–1062, 2018.
- BRUSCHWEILER, E. D. et al. Workers exposed to wood dust have an increased micronucleus frequency in nasal and buccal cells: results from a pilot study. *Mutagenesis*, v. 29, n. 3, p. 201–207, 2014.

- 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. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 521, n. 1–2, p. 47–56, 2002.
- BURGAZ, S. et al. Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal epithelial cells from patients having head and neck cancer and their first-degree relatives. *Mutagenesis*, v. 26, n. 2, p. 351–356, 2011.
- CAMACHO, D.P. et al. Resinas acrílicas de uso odontológico à base de polimetilmetacrilato. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v. 6, n. 3, p. 63-72, mar-mai, 2014.
- CARRARD, V. et al. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal Micronucleus Assay – A Biomarker Of Genotoxic Damage In Exfoliated Oral Mucosa Cells. *Revista Faculdade Odontológica Porto Alegre*, v. 48, n. 1-3, p. 77–81, 2007.
- CASTAÑEDA-YSLAS, I.J. et al. Biomonitoring with micronuclei test in buccal cells of female farmers and children exposed to pesticides of Maneadero Agricultural Valley, Baja California, Mexico. *Journal of Toxicology*, v. 2016, p. 1–8, 2016.
- CAVALCANTE, D.N. et al. Genotoxic and mutagenic effects of passive smoking and urban air pollutants in buccal mucosa cells of children enrolled in public school. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 27, n. 5, p. 346–351, 2017.
- ÇELİK, A. et al. Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 92, p. 265–270, 2013.
- ÇELİK, A.; ÇAVAŞ, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: Micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis*, v. 18, n. 5, p. 417–421, 2003.
- CERETTI, E. et al. DNA damage in buccal mucosa cells of pre-school children exposed to high levels of urban air pollutants. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, 2014.
- CERQUEIRA, E. M. et al. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 562, n. 1–2, p. 111–117, 2004.
- CERQUEIRA, E. M. et al. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofacial Radiology*, v. 37, p.398-403, 2008.
- CERQUEIRA, E. M.; MEIRELES, J.R.C. The use of the Micronucleus Test to Monitor Individuals at Risk of Oral Cancer. In: Concept Press Admin Team. (Org.). *The Research and Biology of Cancer*. 1ed. Hong Kong: iConcept Press Ltd., 2014, p. 33-58.
- CHAVES, C. A. et al. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: a systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 107, n. 2, p. 114-127, 2012.
- CLAUDIO, S. R. et al. Genomic instability and cytotoxicity in buccal mucosal cells of workers in banana farming evaluated by micronucleus test. v. 39, n. 3, p. 1283–1286, 2019.

- COSTA, C. et al. Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis*, v. 21, n. 5, p. 343–350, 2006.
- CUELLO-ALMARALES, D. A. et al. Buccal cell micronucleus frequency is significantly elevated in patients with Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Archives of Medical Research*, v. 48, n. 3, p. 297–302, 2017.
- DASH, K.C. et al. Comparative study of micronuclei count in patients with different tobacco-related habits using exfoliated buccal epithelial cells: a tool for assessment of genotoxicity. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. v. 19, n. 9, 1076–1081, 2018.
- DEMIRCIGIL, G. Ç. et al. Cytogenetic biomonitoring of primary school children exposed to air pollutants: Micronuclei analysis of buccal epithelial cells. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 2, p. 1197–1207, 2014.
- DIAZ, J.H. Proportionate cancer mortality in methyl methacrylate-exposed orthopedic surgeons compared to general surgeons. *Journal of Medical Toxicology*, v. 7, n 11, p. 125–32, 2011.
- DILER, S. B.; ÇELIK, A. Cytogenetic biomonitoring of carpet fabric workers using micronucleus frequency, nuclear changes, and the calculation of risk assessment by repair index in exfoliated mucosa cells. *DNA and Cell Biology*, v. 30, n. 10, p. 821–827, 2011.
- DOREA, L. et al. Chromosomal damage and apoptosis in exfoliated buccal cells from individuals with oral cancer. *International Journal of Dentistry*, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- DOSI, T. et al. Assessment of micronuclei frequency in individuals with a habit of tobacco by means of exfoliated oral buccal cells. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, v.6, p. 143–147, 2016.
- DÜSMAN, E. et al. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*, n. 72, p. 66–81, 2012.
- DUTTA, S.; BAHADUR, M. Cytogenetic analysis of micronuclei and cell death parameters in epithelial cells of pesticide exposed tea garden workers. *Toxicology Mechanisms and Methods*, v. 26, n. 8, p. 627–634, 2016.
- EKER, E. D.; KOYUNCU, H.; DILER, S. B. Determination of genotoxic effects of hookah smoking by micronucleus and chromosome aberration methods. *Medical Science Monitor*, v. 22, p. 4490–4494, 2016.
- EL-ASHIRY, E. A.; ABO-HAGER, E. A.; GAWISH, A. S. Genotoxic effects of dental panoramic radiograph in children. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, v. 35, n. 1, p. 69–74, 2010.
- ERGENE, S. et al. Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. *Environment International*, v. 33, n. 7, p. 877–885, 2007.
- FEDERICO, C. Buccal micronucleus assay in human populations from Sicily (Italy) exposed to petrochemical industry pollutants. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 7, p. 7048–7054, 2019.

- FEKI-TOUNSI, M. et al. Cytogenetic damage in the oral mucosa cells of bladder cancer patients exposed to tobacco in Southern Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n. 22, p. 12922–12927, 2014.
- FERREIRA, F. L.; PRÁ, D.; GARCÍAS, G. L. Buccal micronucleus frequency is associated with age in Down syndrome. *Genetics and Molecular Research*, v. 8, n. 4, p. 1231–1237, 2009.
- FILHO, R.R. et al. Avaliação de monômero residual em resinas acrílicas de uso ortodôntico e protético: análise por espectroscopia. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*, v. 12, n. 2, p. 96-104, 2007.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, p. 486–541, 2018.
- GANDHI, G.; TUNG, G. Sensitivity and specificity prediction of the buccal micronucleus cytome assay in end-stage renal disease patients on dialysis: A case-control study. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 822, p. 1–9, 2017.
- GANGADHARAN, V.; MOHAN, K. V. M.; ADILAKSHMI, M. U. Evaluation of Micronuclei in Buccal Mucosa – Comparing Smokers And Non Smokers. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, v. 15, n. 9, p. 8–12, 2016.
- GATTÁS, G. J. et al. Frequency of oral mucosa micronuclei in gas station operators after introducing methanol. *Occupational Medicine*, v. 51, n. 2, p. 107–113, 2001.
- GIGOLA, P. Evaluation of the castogenic activity of some resins used in the prosthodontics field. *Minerva Stomatologica*, v. 50, n. 11-12, p. 361-72, 2001.
- GÓMEZ-MEDA, B. C. et al. Nuclear abnormalities in buccal mucosa cells of patients with type I and II diabetes treated with folic acid. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 797, p. 1–8, 2016.
- GOIATO, M.C. et al. Prótese parcial removível obturadora – uma reabilitação oral que devolve o bem estar físico e mental. *Revista Regional de Araçatuba – APCD*, v. 22, n.1, p. 01-04. 2001.
- GONÇALVES, T. S. et al. Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 129, n. 3, p. 431–435, 2006.
- GONZÁLEZ-YEBRA, A. L. et al. Exposure to organic solvents and cytogenetic damage in exfoliated cells of the buccal mucosa from shoe workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, v. 82, n. 3, p. 373–380, 2009.
- HEDDLE, J. A. et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. v. 18, n. 4, p. 277–291, 1991.
- HINTZSCHE, H.; STOPPER, H. Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicology Letters*, v. 193, n. 1, p. 124–130, 2010.

- HOLLAND, N. et al. Cytogenetic damage in blood lymphocytes and exfoliated epithelial cells of children with inflammatory bowel disease. *Pediatric Research*, v. 61, n. 2, p. 209–214, 2007.
- HOLLAND, N. et al. Micronuclei in neonates and children: Effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 51–56, 2011.
- HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project prospective on current status and knowledge gaps. *Mutation Research*, v. 659, p. 93-108, 2009.
- IDOLO, A. et al. Micronuclei in exfoliated buccal cells of children living in a cluster area of Salento (Southern Italy) with a high incidence of lung cancer: The IMP.AIR study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 15, n. 8, p. 1659, 2018.
- JARA-ETTINGER, A. C. et al. Genotoxic evaluation of mexican welders occupationally exposed to welding-fumes using the micronucleus test on exfoliated oral mucosa cells: A cross-sectional, case-control study. *PLoS ONE*, v. 10, n. 8, p. 1–12, 2015.
- JEYARAJ, P.; SEHGAL, S. Value of micronuclei count as a predictor of cytotoxic damage in smoked and smokeless tobacco users. *Journal of Cytology & Histology*, v. 9, n. 1, p. 9–11, 2018.
- JONES, K. H. et al. Genetic and environmental influences on spontaneous micronuclei frequencies in children and adults: a twin study. *Mutagenesis* v. 26, n. 6, p. 745–752, 2011.
- JORGE, J. H. et al. Citotoxicity of denture base acrylic resins: A literature review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*; v. 90, n. 2, p 190-193. 2003.
- JOSHI, M. S. et al. Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Archives of Oral Biology*, v. 56, n. 1, p. 63–67, 2011.
- KATARKAR, A. et al. Comparative evaluation of genotoxicity by micronucleus assay in the buccal mucosa over comet assay in peripheral blood in oral precancer and cancer patients. *Mutagenesis*, v.29, n. 5, p. 325-334, 2014.
- KAUSAR, A. et al. Changes in buccal micronucleus cytome parameters associated with smokeless tobacco and pesticide exposure among female tea garden workers of Assam, India. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 217, n. 2–3, p. 169-175, 2014.
- KHAN, A. W. et al. Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in Pakistani cotton weavers. *Mutagenesis*, v. 30, n. 5, p. 613–619, 2015.
- KHAN, S.; HASAN, S.; KHAN, A.U. Genotoxic effects of chlorhexidine mouthwash on buccal epithelial cells. *International Journal of Dentistry and Oral Health*, v. 2, n. 2, 2015.
- KHLIFI, R. et al. Cytogenetic abnormality in exfoliated cells of buccal mucosa in head and neck cancer patients in the Tunisian population: Impact of different exposure sources. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-10, 2013.
- KIRAN, K. et al. Micronuclei as a predictor for oral carcinogenesis. *Journal of Cytology*, v. 35, p. 233–236, 2018.

- KOHLI, M. et al. Micronucleus assay: an early diagnostic tool to assess genotoxic changes in patients with tobacco use, oral leukoplakia and oral submucous fibrosis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 11, n. 9, p. 28–32, 2017.
- LEGGAT, P. A.; KEDJARUNE, U. Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *International Dental Journal*, v. 53, n. 3, p. 126–131, 2003.
- LOPES, M.C. et al. Effect of monomer content in the monomer-polymer ratio on complete denture teeth displacement. *Brazilian Dental Journal*, v. 22, n.3, p. 238-244. 2011.
- LORENZONI, D. C. et al. Cytogenetic biomonitoring in children submitting to a complete set of radiographs for orthodontic planning. *Angle Orthodontist*, v. 82, n. 4, p. 585–590, 2012.
- LORENZONI, D. C. et al. Mutagenicity and cytotoxicity in patients submitted to ionizing radiation. A comparison between cone beam computed tomography and radiographs for orthodontic treatment. *Angle Orthodontist*. v. 83, n. 1, p. 104-109, 2013.
- LOUREIRO, A. P.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 777–793, 2002.
- MARY, S. J. et al. Genotoxic effects of silver amalgam and composite restorations: micronuclei - based cohort and case – control study in oral exfoliated cells. *Contemporary Clinical Dentistry*, v. 9, n. 2, p. 250-254, 2018.
- MINICUCCI, E. M. et al. DNA damage in lymphocytes and buccal mucosa cells of children with malignant tumours undergoing chemotherapy. *Clinical and Experimental Medicine*, v. 8, n. 2, p. 79–85, 2008.
- MORAIS, F. A. et al. Polímeros a base de metil metacrilato: importância em odontologia. *International Journal of Dentistry*, v. 6, n. 2, p. 63–66, 2007.
- MORONI, P. A. et al. Avaliação do monômero residual de resinas arílicas utilizadas para prótese ocular, polimerizadas convencionalmente e por energia de microondas. *Revista Odonto Ciência*, v. 20, n. 50, p. 330–334, 2005.
- MOTIGI, A. A. et al. Assessment of cytogenic damage in the form of micronuclei in oral epithelial cells in patients using smokeless and smoked form of tobacco and non-tobacco users and its relevance for oral cancer. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 10, n. 1, p. 165–170, 2014.
- MÜLLNER, E. et al. Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in healthy and diabetic individuals and the impact of a dietary intervention. *Mutagenesis*, v. 29, n. 1, p. 1–6, 2013.
- NERI, M. et al. Baseline micronuclei frequency in children: Estimates from meta- and pooled analyses. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 9, p. 1226–1229, 2005.
- NERI, M. et al. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, v. 544, n. 2–3, p. 243–254, 2003.
- NERSESYAN, A.K. et al. Micronucleus level in exfoliated buccal mucosa cells of cancer patients. *Archive of Oncology*, v. 10, n. 1, p. 35–36, 2002.

NERSESYAN, A.K. Nuclear buds in exfoliated human cells. (Letter to the Editor). *Mutat Res.*, v. 588, p. 64-68, 2005.

NERSESYAN, A. K. Biomonitoring of the cytogenetic effect of antitumor therapy by means of micronucleus assay in exfoliated epithelial cells. *Cytology and Genetics*, v. 41, n. 6, p. 385–390, 2007.

NERSESYAN, A. et al. Impact of smoking on the frequencies of micronuclei and other nuclear abnormalities in exfoliated oral cells: a comparative study with different cigarette types. *Mutagenesis*, v. 26, n. 2, p. 295–301, 2011.

OLIVEIRA, M. G. et al. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells of crack cocaine users. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 2 n. 8, p. 5760–5764, 2014.

OLIVEIRA, F. M. DE; CARMONA, A. M.; LADEIRA, C. Genotoxicity assessment data for exfoliated buccal cells exposed to mobile phone radiation. *Data in Brief*, v. 15, p. 344–347, 2017.

PALANIKUMAR, L.; PANNEERSELVAM, N. Micronuclei assay: A potential biomonitoring protocol in occupational exposure studies. *Russian Journal of Genetics*, v. 47, n. 9, p. 1033–1038, 2011.

PEREIRA, J et al. Papel da célula endotelial em neoplasias malignas hematológicas. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, n. 11, p. 223–228, 2008.

PRASANNA, M. D. et al. Micronuclei as a biomarker in monitoring genetic damage in down syndrome. *Indian Journal of Dental Advancements*, v. 7, n. 1, p. 32–35, 2015.

PREMARAJ, T.; SIMET, S.; BEATLY, M.; PREMARAJ, S. Oral epithelial cell reaction after exposure to Invisalign plastic material. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*; v. 145, n. 1, p. 64-71. 2014.

QUEIROZ, F. T. H. Riscos e Cargas no trabalho do Técnico em Prótese Dentária (Protético). Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca / Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

RAMIREZ, A.; SALDANHA, P. H. Micronucleus investigation of alcoholic patients with oral carcinomas. *Genetics and Molecular Research*, v. 1, n. 3, p. 246–260, 2002.

REIS, S.R. et al. Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, v. 16, n. 3, p. 221-225, 2002.

RIBEIRO, D.A.; ANGELIERI, F. Cytogenetic biomonitoring of oral mucosa cells from adults exposed to dental X-rays. *Radiation Medicine*, v. 26, n. 6, p. 325–30, 2008.

RIBEIRO, D. A. et al. Cytogenetic biomonitoring in patients exposed to dental X-rays: comparison between adults and children. *Dentomaxillofacial radiology*. v. 37, p. 404–407, 2008.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: *Mutagênese Ambiental*. Rio Grande do Sul: Editora da ULBRA, 2003, p. 21-27.

- RIBEIRO, D. A. Cytogenetic biomonitoring in oral mucosa cells following dental X-ray. *Dentomaxillofacial Radiology*. British Institute of Radiology, v.41, n. 3, p. 181–4, 2012.
- ROCHA, R.S. Avaliação do uso do teste de micronúcleo em células esfoliadas como biomarcador para o desenvolvimento do câncer oral em usuários de bebidas alcoólicas e anti-sépticos bucais. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2011.
- ROS-LLOR, I.; LOPEZ-JORNET, P. Cytogenetic analysis of oral mucosa cells, induced by chlorhexidine, essential oils in ethanolic solution and triclosan mouthwashes. *Environmental Research*, v. 132, p. 140–145, 2014.
- ROSSNEROVA, A. et al. Mapping the factors affecting the frequency and types of micronuclei in an elderly population from Southern Bohemia. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 793–794, p. 32–40, 2016.
- ROSE, E.C. et al. Contribution to the Biological Assessment of Orthodontic: Acrylic Materials. *Journal of Orofacial Orthopedics*, v. 61, n. 4, p. 246–257, 2000.
- ROTH, J. M. et al. Genotoxicity evaluation in chronic renal patients undergoing hemodialysis and peritoneal dialysis, using the micronucleus test. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 2, p. 433–443, 2008.
- SALMAN, A. K. D. Conceitos básicos de genética de populações. Porto Velho: Embrapa, 2007.
- SCHEUPLEIN, R.; CHARNLEY, G.; DOURSON, M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 35, n. 3, p. 429–447, 2002.
- SCHWEIKL, H.; SCHMALZ, G.; SPRUSS, T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *Journal of Dentistry Research*, v. 80, n. 7, p. 1615-1620, 2001.
- SELLAPPA, S. et al. Evaluation of genotoxicity in petrol station workers in South India using micronucleus assay. *Industrial Health*, v. 48, n. 6, p. 852–856, 2010.
- SHARMA, S. et al. Quantitative and qualitative analysis of micronuclei in the buccal mucosal cells of individuals associated with tobacco introduction. *Journal of Medical Sciences*, v. 4, n. 1, p. 12–17, 2018.
- SHEKHAWAT, S. et al. Cytogenetic effects of exposure to formalin vapours in buccal and nasal mucosae: a study in the students of anatomy and embalmers. *Advances in Medical and Dental Research*, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2015.
- SILVA, D. P. et al. Reabilitação protética de pacientes maxilectomizados. Uma contribuição da Odontologia e um convite à reflexão. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, v. 4, n. 2, p. 125-130, maio/ago. 2004.
- SILVA, V. H. et al. Cytogenetic biomonitoring in buccal mucosa cells from young smokers. *Acta Cytologica*, v. 59, p. 474-478, 2015.

- SOBOL, M. V.; BEZRUKOV, V. F. Frequency of micronuclei in the cells of buccal epithelium in ukrainian schoolchildren of various age and sex. *Cytology and Genetic*, v. 41, n. 4, p. 243–244, 2007.
- SOUTO-LOPES, M. et al. Cytotoxicity of acrylic based resin compounds in a human gingival fibroblast cell line. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, v. 54, n. 2, p. 87–90, 2013.
- SOUZA, A. C. et al. Cytogenetic Biomonitoring in buccal mucosa cells from women submitted to chemotherapy after mastectomy for breast cancer. *Anticancer Research*, v. 36, p. 1955–1958, 2016.
- STICH, H. F.; ROSIN, M. P. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and cancer intervention. *Cancer Letters*, v. 22, p. 241–253, 1984.
- SUHAS, S.; GANAPATHY, K. S.; RAMESH, C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutation Research*, v. 561, p. 15–21, 2004.
- TADIN, A. et al. In vivo evaluation of fluoride and sodium lauryl sulphate in toothpaste on buccal epithelial cells toxicity. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 77, n. 5, p. 386–393, 2019.
- TAK, A. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in normal human buccal mucosa cells of oral cancer patients undergoing radiotherapy: a field effect. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 89, n. 6, p. 464–469, 2014.
- TARGA, H. J.; RABELLO-GAY, M. N. Mutagênese, teratogênese, carcinogênese e o uso de alguns praguicidas. *Revista do Serviço Público*, v.40, n. 4, p. 193-200, 1983.
- TERZIC, S. et al. New models for prediction of micronuclei formation in nuclear medicine department workers. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, v. 10, n. 1, p. 1–8, 2015.
- THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome biomarkers may be associated with Alzheimer's disease. *Mutagenesis*, v. 22, n. 6, p. 371–379, 2007.
- THOMAS, P. et al. E. Buccal micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, v. 4, n. 6, p. 825-837, 2009.
- THOMAS, P. et al. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Genetics and Molecular Research*, v. 26, n. 1, p. 69–76, 2011.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: a field test in snuff users. *Am. J. Epidemiol*, v. 134, p. 840-50, 1991.
- TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; ALLEN, J.W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, v. 271, p. 69-77, 1992.
- TOPAJICHE, S. S. et al. Genotoxic effect of methyl methacrylate and nickelcobalt-chromium in dental lab technicians: a micronuclei and cytomorphometric study of buccal mucosal cells. *Toxicology International (Formerly Indian Journal of Toxicology)*, v. 22, n. 2, p. 46, 2015.

- TORRES-BUGARÍN, O. et al. Anabolic androgenic steroids induce micronuclei in buccal mucosa cells of bodybuilders. *British Journal of Sports Medicine*, v. 41, n. 9, p. 592–596, 2007.
- TORRES-BUGARÍN, O. et al. Micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa cells in patients with anorexia and bulimia nervosa. *Mutagenesis*, v. 29, n. 6, p. 427–431, 2014.
- UNAL, M. et al. Cytogenetic biomonitoring in children with chronic tonsillitis: Micronucleus frequency in exfoliated buccal epithelium cells. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, v. 69, n. 11, p. 1483–1488, 2005.
- VIDYALAKSHMI, S. et al. Buccal micronuclei assay as a tool for biomonitoring DNA damage in oral lichen planus. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 10, n. 7, p. 5–7, 2016.
- WESTPHALEN, G. H. et al. In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genetics and Molecular Research*, v. 7, n. 4, p. 1259–1266, 2008.
- WULTSCH, G. et al. Genotoxic and cytotoxic effects in exfoliated buccal and nasal cells of chromium and cobalt exposed electroplaters. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v.80, n. 13-15, p. 651–660, 2017.
- WULTSCH, G. et al. Impact of exposure to wood dust on genotoxicity and cytotoxicity in exfoliated buccal and nasal cells. *Mutagenesis*, v. 30, n. 5, p. 701–709, 2015.
- YANG, H.W. et al. Assessment of genetic damage by methyl methacrylate employing in vitro mammalian test system. *Biomaterials*, n. 24, p. 2909–2914, 2003.
- YANG, P. et al. Cytogenetic biomonitoring in individuals exposed to cone beam CT: Comparison among exfoliated buccal mucosa cells, cells of tongue and epithelial gingival cells. *Dentomaxillofacial Radiology*, v. 46, n. 5, 2017.
- ZAMORA-PEREZ, A L. et al. Increased micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa and oxidative damage in saliva from patients with chronic and aggressive periodontal diseases. *Journal of Periodontal Research*, v. 50, n. 1, p. 28–36, 2014.

3 CAPÍTULO 1

Avaliação da genotoxicidade de resinas acrílicas em indivíduos ocupacionalmente expostos por meio do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal¹

RESUMO

Objetivos: Investigar, em células esfoliadas da mucosa bucal, a ocorrência de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas indicadoras de necrose e apoptose em profissionais expostos a resinas acrílicas de uso odontológico. **Materiais e métodos:** Foram computados micronúcleos e alterações nucleares em 60 indivíduos divididos igualmente em 3 grupos: profissionais expostos às resinas acrílicas, profissionais não expostos e não profissionais da odontologia. **Resultados:** Não foi observada diferença entre os grupos quanto à ocorrência de micronúcleos ($p > 0,05$) e cariólise ($p > 0,05$). A avaliação isoladamente das alterações indicativas de apoptose revelou que cariorréxis, cromatina condensada e picnose foram de ocorrência significativamente maior entre os profissionais expostos quando comparados aos não profissionais, mas não foram observadas diferenças quando comparados aos profissionais não expostos. Estes, contudo, diferiram dos não profissionais apenas na ocorrência de cariorréxis. A avaliação conjunta destas alterações revelou, no entanto, diferenças entre os grupos de profissionais expostos e não expostos comparativamente aos não profissionais. **Conclusões:** Os profissionais estão expostos a agentes capazes de provocar genotoxicidade expressa pelo aumento nas taxas de alterações nucleares indicativas de apoptose. A exposição ocupacional aos monômeros das resinas acrílicas poderia *a priori* contribuir para o aumento da apoptose, mas os resultados aqui obtidos não permitem tal afirmação, vez que profissionais não expostos não diferiram dos expostos.

Palavras-chave: resinas acrílicas; genotoxicidade; danos ao DNA; micronúcleo; apoptose.

1. Artigo formatado de acordo com as instruções para autores do periódico Acta Odontologica Scandinavica (anexo II)

ABSTRACT

Aims: To investigate, in exfoliated oral mucosa cells, the occurrence of micronuclei and degenerative nuclear alterations indicative of necrosis and apoptosis in professionals exposed to acrylic resins of dental use. **Materials and methods:** Micronuclei and nuclear alterations were investigated in 60 individuals equally divided into 3 groups: professionals exposed to acrylic resins, non-exposed professionals and non-dental professionals. **Results:** No difference was observed among groups regarding the occurrence of micronuclei ($p > 0.05$) and karyolysis ($p > 0.05$). The isolated evaluation of apoptosis-indicative alterations revealed that karyorrhexis, condensed chromatin and pycnose were significantly higher among exposed professionals when compared to non-dental professionals, but no differences were observed when compared to non-exposed professionals. However, the latter differed from non-dental professionals only for the occurrence of karyorrhexis. The joint evaluation of these alterations revealed, however, differences between groups of exposed and non-exposed professionals compared to non-dental professionals. **Conclusions:** Professionals are exposed to agents capable of causing genotoxicity expressed by the increase in nuclear alteration rates indicative of apoptosis. Occupational exposure to monomers from acrylic resins could contribute to increased apoptosis, but the results obtained here did not allow reaching this conclusion, since non-exposed professionals did not differ from those exposed to acrylic resins.

Keywords: acrylic resins; genotoxicity; DNA damage; micronucleus; apoptosis.

Introdução

As resinas acrílicas são utilizadas em odontologia tanto como materiais restauradores (bases de próteses dentárias, coroas dentárias temporárias, aparelhos ortodônticos e próteses bucomaxilofaciais) quanto auxiliares (moldeiras para clareamento e moldagem, protetores bucais e placas mio-relaxantes) [1,2].

Apesar do desenvolvimento de novos materiais, em se tratando de reabilitações protéticas e em indicações de uso de dispositivos intra-orais, como aparelhos ortodônticos removíveis e placas mio-relaxantes, as resinas acrílicas ainda são consideradas insubstituíveis na clínica odontológica [2].

A maior parte dos materiais acrílicos utilizados em odontologia deriva de modificações do metilmetacrilato. Apesar do emprego corriqueiro, os metacrilatos estão entre os materiais dentários que mais causam reações em profissionais ocupacionalmente expostos [1,3]. Seus monômeros residuais podem ser liberados das resinas e causar efeitos tóxicos também em pacientes [1,3,4]. Dentre esses efeitos, são citados na literatura: reação imunológica ao material, parestesia das pontas dos dedos, toxicidade pulmonar, necrose de tecido pulmonar, dermatites de contato e estomatites [4-6].

O potencial genotóxico do metilmetacrilato não está ainda inteiramente estabelecido e há registros na literatura em que foi investigado e destacada a necessidade de estudos adicionais [5-7].

Dada a relação íntima entre danos genéticos e câncer, é importante a realização de estudos que avaliem a genotoxicidade dos materiais empregados na prática odontológica [8,9]. O câncer é considerado doença genética porque resulta de alterações (mutações gênicas e/ou aberrações cromossômicas) que ocorrem em genes comprometidos com mecanismos de reparo do DNA, com a apoptose e/ou com o controle da proliferação e diferenciação celular.

Além disso, avaliar os riscos ocupacionais a que estão expostos profissionais das diversas áreas é necessário. O indivíduo que lida continuamente com determinados produtos pode ter comprometida sua saúde e restritas sua capacidade laboral e de ampliação de sua experiência profissional [10-12].

Dentre os muitos testes disponíveis para avaliação dos efeitos mutagênicos de um dado agente, o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas é considerado valiosa ferramenta [13-15]. Micronúcleos são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que, por não se ligarem às fibras do fuso, não são incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas [16]. Este teste é recomendado como parte do arsenal de testes regulares adotados na prática da Genética Toxicológica, aceito pelas instituições governamentais e pelas agências internacionais de registros de novas drogas [13].

A sensibilidade do teste é incrementada quando além de micronúcleos são computadas alterações nucleares degenerativas que, quando em ocorrência excessiva, são indicadoras de apoptose (cromatina condensada, picnose e cariorréxis) e necrose (cariólise, adicionalmente), associadas, respectivamente, a efeitos genotóxicos e citotóxicos [14,17,18].

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar, em células esfoliadas da mucosa bucal, a ocorrência de danos cromossômicos, traduzidos como micronúcleos, bem como alterações nucleares degenerativas indicadoras de necrose e apoptose em profissionais da odontologia expostos a estes materiais.

Materiais e métodos

Sujeitos

A amostra do estudo foi composta por 60 indivíduos saudáveis de ambos os sexos, com idades de 21 a 62 anos, distribuídos em três grupos de igual tamanho: Grupo I: formado por 20

cirurgiões-dentistas ou técnicos em prótese dentária ocupacionalmente expostos a monômeros liberados na polimerização de resinas acrílicas autopolimerizáveis; Grupo II: constituído por 20 cirurgiões-dentistas ou técnicos em prótese dentária não expostos, há pelo menos três meses, a monômeros liberados na polimerização de resinas acrílicas; e Grupo III: formado por 20 indivíduos saudáveis, sem qualquer contato ocupacional com materiais dentários.

Para definição dos números amostrais foram considerados estudos anteriores que utilizaram o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal [19]. Há recomendação de um número mínimo de 20 indivíduos analisados no caso de estudos nos quais alterações cromossômicas são utilizadas como biomarcadores de risco, tanto para os grupos expostos quanto para os grupos controles [20].

Para a caracterização da amostra, foi aplicado questionário contendo informações a respeito de idade, sexo, ocupação atual, contato direto com resinas acrílicas, hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas, exposição à radiação e outros genotóxicos.

Os critérios de exclusão adotados foram: (1) estar fazendo uso regular de algum medicamento; (2) apresentar alguma infecção (virótica ou bacteriana); (3) apresentar lesões bucais (4) ser etilista crônico ou tabagista; (5) ter sido exposto a raios-X (radiografia, tomografia ou qualquer procedimento radiológico há menos de 3 meses) ou a outros genotóxicos neste mesmo período e; (6) ter feito tratamento quimioterápico ou radioterápico.

Coleta do material

O material destinado à análise citológica foi coletado através de raspagem gentil da mucosa bucal da bochecha, de ambos os lados, com escova *cytobrush*, após bochecho com água filtrada, de acordo com protocolo sugerido por Thomas et al. [14]. Com o material coletado, foi feito esfregaço em lâmina de vidro limpa, contendo duas gotas de soro fisiológico (NaCl a 0,9%). As lâminas com o material coletado secaram à temperatura ambiente. Após secas, foram fixadas

em solução de metanol/ácido acético na concentração de 3:1. Transcorridas pelo menos 24 horas, foi realizada hidrólise em solução de ácido clorídrico (5N), por 20 minutos, seguindo-se lavagem em água destilada por três vezes. Após secagem à temperatura ambiente, a coloração foi feita com o reativo de Schiff (Merck®) por 90 minutos e, então, realizada nova lavagem em água destilada por três vezes e nova secagem. Por fim, foi feita contra-coloração com Fast Green a 1% e executada a lavagem com álcool absoluto. Após secarem em temperatura ambiente, as lamínulas foram montadas com Entelan®.

Análise citológica

A análise citológica foi realizada, em teste cego, por um único avaliador treinado, sob microscopia óptica binocular, com objetivas de 20X, 40X e 100X, segundo os protocolos sugeridos por Tolbert; Shy; Allen [17,18] e Thomas et al. [14]. De acordo com estes protocolos foram identificados como micronúcleos estruturas arredondadas e distintamente separadas do núcleo, com limites bem definidos, medindo cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo e apresentando, em relação a este, estrutura cromatínica e coloração similar, além de serem visualizados no mesmo plano. Foram analisadas, pelo menos, 2.000 células por indivíduo. Somente células com citoplasma íntegro foram computadas.

Além de micronúcleos, foram também computadas células com alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose: picnose (núcleo de tamanho reduzido e cromatina intensamente condensada); cariorréxis (núcleo fragmentado em pequenos corpos arredondados ou ovalados); cromatina condensada (cromatina irregularmente condensada gerando áreas de coloração mais intensa). A ocorrência de necrose foi considerada quando, adicionalmente a estas estruturas, havia cariólise (dissolução do núcleo visualmente marcada por área não corada, evidenciando ausência do mesmo). Figuras 1A, B, C, D e E.

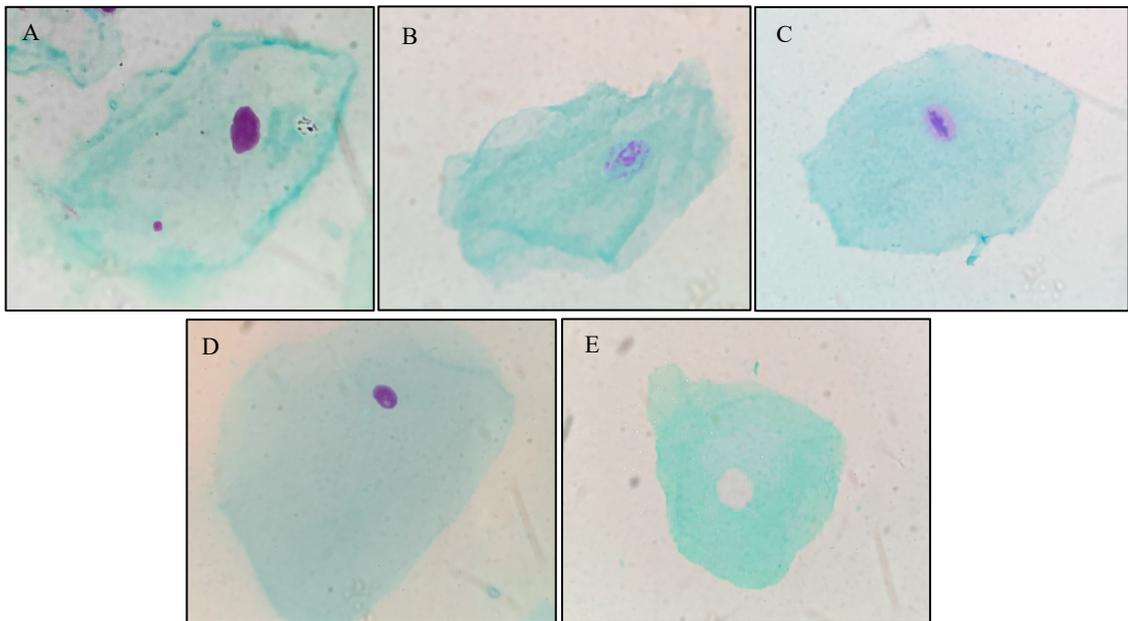


Figura 1. Fotomicrografias de células apresentando micronúcleo (A), cariorréxis (B), cromatina condensada (C), picnose (D) e cariólise (E) (1000X).

Adicionalmente a estas alterações, foram também computadas as projeções nucleares (*broken eggs* e brotos nucleares). Foram considerados como *broken eggs*, estruturas arredondadas, de coloração e distribuição cromatínica semelhante a do núcleo, a ele ligadas por um fino filamento cromatínico (Figura 2A). Brotos nucleares foram evidenciados como projeções que resultam do estrangulamento em uma pequena área da superfície nuclear de onde uma protuberância arredondada desponta (Figura 2B) [19].

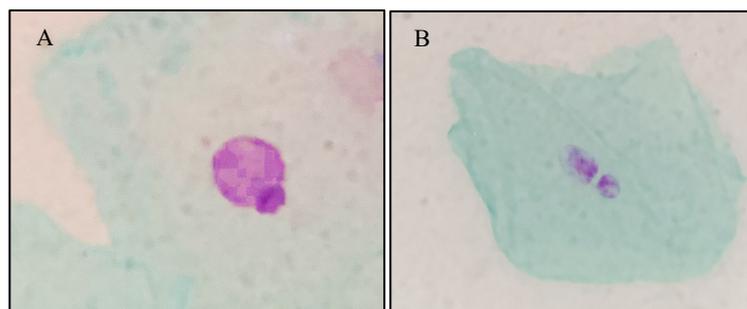


Figura 2. Fotomicrografias de células apresentando broto nuclear (A) e broken egg (B) (1000X).

As colorações e análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Genética Toxicológica do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Análise estatística

Para avaliação das diferenças da distribuição de idade e sexo entre os grupos foram empregados os testes de Kruskal-Wallis e qui-quadrado, respectivamente, uma vez que estas variáveis não apresentaram distribuições normais de acordo com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados da análise citológica foram avaliados com o teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros que é um teste de significância alternativo ao de qui-quadrado (χ^2), na linha do teste exato de Fischer. Este teste é considerado adequado para avaliação citogenética quando para detecção da ocorrência de uma dada alteração citológica se faz necessário o computo de um grande número de células [21-23]. Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%.

Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (parecer nº 2.016.819). A participação foi voluntária e aos participantes foi dada toda a liberdade para não permanecerem no estudo. Todos os indivíduos assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

Resultados

A distribuição de idade e sexo dos participantes, por grupo, está disposta na Tabela 1. As médias de idade \pm desvio padrão dos Grupos I, II e III foram respectivamente $42,35 \pm 6,67$; $38,70 \pm 4,77$ e $39,70 \pm 9,85$. A avaliação das diferenças entre as médias de idade dos grupos realizada com o Teste de Kruskal-Wallis não revelou significância estatística: $p= 0,2263$. A análise das

diferenças na distribuição de homens e mulheres, feita com o teste de qui-quadrado revelou diferença significativa: $p=0,003$; $\chi^2=11,400$; G.L = 2.

Tabela 1. Distribuição de idade e sexo por grupo.

Variável	Grupo I (n=20) n (%)	Grupo II (n=20) n (%)	Grupo III (n=20) n (%)	
Idade (anos) média \pm DP	42,35 \pm 6,67	38,70 \pm 4,77	39,70 \pm 9,85	$p=0,2263$
Gênero				
Masculino	18 (90)	14 (70)	8 (40)	$p=0,003^*$
Feminino	2 (10)	6 (30)	12 (60)	$\chi^2=11,400$ G.L = 2

* $p<0,05$

Apesar do número de micronúcleos entre os indivíduos expostos aos monômeros da resina acrílica ter sido maior do que o observado nos outros dois grupos, a diferença não foi estatisticamente significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Ocorrência de micronúcleo (MN) entre os grupos.

Grupo	N	Total células	MN(obs)	MN(esp)	Qui-quadrado
I	20	41654	27	19,73	
II	20	41550	17	19,68	$\chi^2=4,1164$
III	20	41345	15	19,59	GL=2
Total	60	124549	59	59,00	$p>0,05$

obs=observado; esp=esperado

A avaliação da ocorrência de cariorréxis revelou diferenças significantes entre os grupos ($\chi^2=8,6854$; GL=2; $p<0,05$). As partições de qui-quadrado mostram que estas estruturas são significativamente mais frequentes entre os profissionais expostos quando comparados aos não profissionais ($\chi^2=5,0750$; GL=1; $p<0,05$), mas não diferem quando feita comparação com

profissionais não expostos ($\chi^2=0,3290$; $GL=1$; $p>0,05$). Profissionais não expostos também apresentaram ocorrência significativamente maior destas estruturas quando comparados aos não profissionais ($\chi^2=7,9652$; $GL=1$; $p<0,01$). Dados apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Ocorrência de cariorréxis (CR) entre os grupos.

Grupo	N	Total células	Cariorréxis (obs)	Cariorréxis (esp)	Qui-quadrado (χ^2)	Partições de χ^2 ($GL=1$)
I	20	41654	437	421,39		I X II = 0,3290
II	20	41550	453	420,34	$\chi^2=8,6854$ $GL=2$ $p<0,05$	I X III = 5,0750*
III	20	41345	370	418,27		II X III = 7,9652**
Total	60	124549	1260	1260,00		

obs=observado; esp=esperado; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

Diferenças significantes na ocorrência de cromatina condensada entre os grupos foi também observada ($\chi^2=10,4503$; $GL=2$; $p<0,01$). A avaliação das diferenças feita grupo a grupo revelou que os profissionais expostos apresentaram valores significativamente maiores quando comparados ao grupo de não profissionais ($\chi^2=10,2563$; $GL=1$; $p<0,01$). Diferenças entre profissionais não expostos e não profissionais, bem como entre profissionais expostos e profissionais não expostos não foram observadas ($\chi^2=1,7734$; $GL=1$; $p>0,05$ e $\chi^2=3,5169$, $GL=1$; $p>0,05$, respectivamente). Vide tabela 4.

Tabela 4. Ocorrência de cromatina condensada entre os grupos.

Grupo	N	Total células	Cromatina Condensada (obs)	Cromatina condensada (esp)	Qui-quadrado (χ^2)	Partições de χ^2 ($GL=1$)
I	20	41654	643	584,60		I X II = 3,5169
II	20	41550	576	583,14	$\chi^2= 10,4503$ $GL=2$ $p<0,01$	I X III = 10,2563*
III	20	41345	529	580,26		II X III = 1,7734
Total	60	124549	1748	1748		

obs=observado; esp=esperado; * $p<0,01$.

Picnose também diferiu entre os grupos ($\chi^2=7,1406$; $GL=2$, $p<0,05$). As partições de qui-quadrado revelaram que o número destas alterações nucleares foi significativamente maior entre os profissionais expostos, quando comparado ao grupo de não profissionais ($\chi^2=7,0330$; $GL=1$, $p<0,01$). Diferenças na ocorrência destas estruturas não foram, contudo, observadas quando comparados profissionais não expostos aos não profissionais e também entre profissionais expostos e não expostos: $\chi^2=3,0146$; $GL=1$; $p>0,05$ e $\chi^2=0,8446$; $GL=1$; $p>0,05$, respectivamente. Dados na tabela 5.

Tabela 5. Ocorrência de picnose entre os grupos.

Grupo	N	Total células	Picnose (obs.)	Picnose (esp.)	Qui-quadrado	Partições de χ^2 ($GL=1$)
I	20	41654	305	276,92		I X II = 0,8446
II	20	41550	282	276,22	$\chi^2 = 7,1406$ $GL=2$ $p<0,05$	I X III = 7,0330*
III	20	41345	241	274,86		II X III = 3,0146
Total	60	124549	828	828		

obs=observado; esp=esperado; * $p<0,01$

A avaliação das diferenças entre os grupos quanto à ocorrência de cariólise, *broken eggs* e brotos nucleares não revelou diferenças entre os grupos. Dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Ocorrência de cariólise e projeções nucleares entre os grupos.

	I		II		III		Parâmetros χ^2 ; $GL=2$; $p>0,05$
	Obs	Esp	Obs	Esp	Obs	Esp	
Cariólise	183	168,89	171	168,47	151	167,64	2,8680
<i>Broken eggs</i>	32	24,75	20	24,69	22	24,56	3,2823
Broto nuclear	27	25,08	31	25,02	17	24,90	4,0804

obs=observado; esp=esperado

A avaliação conjunta das alterações nucleares relacionadas à apoptose (cariorréxis, picnose e cromatina condensada) revelou diferenças significantes entre os grupos ($\chi^2=22,8627$; $GL=2$; $p<0,01$). As partições de qui-quadrado mostram que estas alterações são significativamente mais frequentes entre os profissionais expostos quando comparados aos não profissionais ($\chi^2=21,9833$; $GL=1$; $p<0,01$), mas não diferem quando realizada comparação com profissionais não expostos ($\chi^2=1,8504$; $GL=1$; $p>0,05$). Profissionais não expostos também apresentaram ocorrência significativamente maior destas estruturas em relação aos não profissionais ($\chi^2=11,0995$; $GL=1$; $p<0,01$). Dados apresentados na tabela 7.

Tabela 7. Ocorrência de apoptose entre os grupos.

Grupo	N	Total células	Apoptose* (obs)	Apoptose* (esp)	Qui-quadrado	Partições de χ^2 ($GL=1$)
I	20	41654	1385	1282,91	$\chi^2=22,8627$ $GL=2$ $p<0,001$	I X II = 1,8504
II	20	41550	1311	1279,70		I X III = 21,9833**
III	20	41345	1140	1273,39		II X III = 11,0995**
Total	60	124549	3836	3836,00		

obs=observado; esp=esperado; * Σ cariorréxis, cromatina condensada e picnose; ** $p<0,01$.

Discussão

A avaliação dos riscos ocupacionais relacionados a materiais utilizados em odontologia tem sido objeto de diversos estudos [5,6,24,25,26]. Há interesse particular em materiais que induzem a estados patológicos capazes de restringir a condição laboral de um indivíduo, destacando-se entre eles o câncer que geralmente provoca altos níveis de morbidade associados a elevadas taxas de mortalidade. O câncer é considerado doença genética porque resulta de alterações (mutações gênicas e/ou aberrações cromossômicas) que ocorrem em genes comprometidos com os mecanismos de reparo do DNA, com a apoptose e/ou com o controle da proliferação e diferenciação celular. Dada a íntima relação entre danos genéticos e o câncer,

a realização de estudos que avaliem a genotoxicidade de materiais empregados na prática odontológica se traduz em importante medida de prevenção [8,9].

A gama de métodos empregados com esse objetivo é ampla. O *International Program on Chemical Safety* (IPCS) elaborou um guia com protocolos dos principais testes para biomonitoramento de efeitos genotóxicos em humanos. Este protocolo destaca, entre os métodos citogenéticos aplicados em larga escala, a Análise de Aberrações Cromossômicas, a Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) e o Teste de Micronúcleo nos diferentes tipos celulares [27]. Este último, quando realizado em células esfoliadas, é considerado valiosa ferramenta na avaliação da ocorrência de danos cromossômicos pelas muitas vantagens que apresenta [12]. Tais sejam: custo relativamente baixo, rapidez e simplicidade na análise, procedimentos de coleta minimamente invasivos, dispensa de cultura de células, facilidade de transporte e armazenamento do material, além do preparo das lâminas à temperatura ambiente [28,29].

O resultado obtido neste estudo quanto à ocorrência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal dos profissionais expostos, quando feita comparação com os outros dois grupos, revela que o metilmetacrilato das resinas acrílicas não induz danos cromossômicos, quer de origem aneugênica ou clastogênica, vez que micronúcleos são formados por quaisquer destes eventos. Tal resultado corrobora dados obtidos em estudo que comparou a ocorrência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal entre técnicos de laboratórios odontológicos expostos ao monômero do metilmetacrilato e indivíduos saudáveis [5].

Por outro lado, Topajiche et al. [6] detectaram valores significativamente maiores dessas estruturas em técnicos de laboratórios odontológicos expostos ao metilmetacrilato e a ligas metálicas quando comparados a indivíduos não expostos. É válido destacar que estes autores não encontraram diferenças entre os grupos de indivíduos expostos e que, dado o número pequeno da amostra (11 expostos ao metilmetacrilato e apenas 8 às ligas metálicas), a

comparação com os controles foi feita considerando os indivíduos sob os dois tipos de exposição.

Vale ressaltar que, apesar das diferenças de números de micronúcleos encontradas no presente estudo não terem sido estatisticamente significativas, o número de micronúcleos foi maior nos profissionais expostos em relação aos outros grupos, resultado diferente do obtido por Azhar et al. [5] que descreveram um número de micronúcleos maior nos controles, embora também não significante. Estes pesquisadores consideraram que tal resultado se deveu ao fato dos técnicos expostos ao metilmetacrilato utilizarem medidas de proteção eficientes durante as manipulações das resinas acrílicas.

Em relação à distribuição de homens e mulheres entre os grupos, apesar de haver a recomendação para distribuição pareada de indivíduos de acordo com sexo e idade em estudos desta natureza [8,30], ainda não foi estabelecido o papel do sexo nas frequências de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal [15].

Além disso, em diversos estudos não foram encontradas diferenças significativas entre os sexos, quando foram analisadas tanto as frequências de micronúcleos [24,31-34] quanto de outras alterações nucleares degenerativas em células esfoliadas da mucosa bucal [35]. Portanto, é possível admitir que a diferença na distribuição dos indivíduos, quanto ao gênero, não interferiu nos resultados do presente estudo.

A maior ocorrência de alterações indicativas de apoptose entre os indivíduos expostos ao metilmetacrilato em relação aos não profissionais, aponta *a priori* para a genotoxicidade deste produto, mas não para a citotoxicidade, uma vez que cariólise não diferiu entre estes grupos e evidencia as vantagens do uso de um protocolo diferenciado quando da aplicação do Teste de Micronúcleo.

O fato de que profissionais expostos e profissionais não expostos não diferiram em quaisquer das alterações nucleares degenerativas consideradas mostra que as diferenças

observadas entre profissionais expostos e não profissionais não podem ser seguramente atribuídas às resinas acrílicas, uma vez que a exposição deles não era exclusiva a este produto e apontam para efeitos genotóxicos de materiais e substâncias a que estão submetidos os profissionais da área da odontologia.

Os números de picnose e cromatina condensada observados nos profissionais não expostos em relação aos não profissionais, embora maiores, não foram suficientes para revelar diferença estatística entre eles. Apesar dos profissionais não expostos só diferirem significativamente dos não profissionais quanto à ocorrência de cariorréxis, a maior ocorrência de apoptose entre eles fica evidenciada quando realizada a análise conjunta das alterações.

Um aumento em cariorréxis está intimamente relacionado com apoptose [12]. A apoptose consiste na principal forma de morte celular e, sob controle fisiológico, faz parte dos mecanismos de renovação tecidual natural. No entanto, quando de ocorrência em excesso, a apoptose é considerada um indicador de dano genotóxico [18,36]. A maior ocorrência de apoptose está associada, inclusive, à exposição contínua a determinadas substâncias mesmo em baixas doses [37,38].

Como discutido anteriormente, os dados aqui obtidos não permitem identificar com segurança se a maior ocorrência, nos profissionais expostos, das alterações descritas em relação aos não profissionais são de fato devidas exclusivamente ao metilmetacrilato, sendo necessária a realização de estudos adicionais que permitam identificar o real potencial genotóxico deste produto.

O significado das projeções nucleares (*broken eggs* e brotos nucleares) em células esfoliadas do epitélio bucal tem registro conflitante na literatura [21,39], tendo alguns estudos apontado para sua relação com genotoxicidade [40,41] e outros não [21,42,43]. Entre os estudos que não correlacionam as projeções nucleares com genotoxicidade, em alguns deles foram observadas, inclusive, frequências mais altas nos grupos controles [21,42], e em outros, tal

como no presente estudo, nenhuma diferença foi detectada [44,45], sugerindo, assim, sua associação com o processo natural de diferenciação celular.

Conclusões

Os cirurgiões-dentistas e técnicos em prótese dentária estão expostos a agentes capazes de provocar genotoxicidade expressa pelo aumento nas taxas de alterações nucleares indicativas de apoptose. A exposição ocupacional aos monômeros das resinas acrílicas poderia *a priori* estar contribuindo para o aumento da apoptose, mas os resultados aqui obtidos não permitem afirmar este fato, uma vez que profissionais não expostos apresentaram taxas similares aos expostos. Trabalhos adicionais investigando os efeitos genotóxicos dos monômeros de resinas acrílicas utilizadas em odontologia são necessários. Os resultados aqui encontrados são suficientes para recomendar que os profissionais da odontologia se protejam de maneira adequada quando da manipulação destes materiais.

Referências

- [1] Leggat PA, Kedjarune U. Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *Int Dent J*. 2003;53(3):126–31.
- [2] Anusavice KJ, Shen CS, Rawls HR. *Phillips' Science of Dental Materials*. 12th ed. St. Louis (MO): Elsevier; 2013.
- [3] Gonçalves TS, Morganti MA, Campos LC, Rizzato SMD, Menezes LM. Allergy to auto-polymerized acrylic resin in an orthodontic patient. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2006;129(3):431–5.
- [4] Chaves CDAL, Machado AL, Vergani CE, De Souza RF, Giampaolo ET. Cytotoxicity of denture base and hard chairside reline materials: A systematic review. *J Prosthet Dent*. 2012;107(2):114–27.
- [5] Azhar DA, Syed S, Luqman M, Ali AA. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dent Mater J*. 2013;32(3):519–21.
- [6] Topajiche SS, Smitha BR, Murthy SJ, Patil MS, Karthik Kumar R, Solanki MP. Genotoxic Effect of Methyl Methacrylate and Nickelcobalt-Chromium in Dental

- Lab Technicians: A Micronuclei and Cytomorphometric Study of Buccal Mucosal Cells. *Toxicol Int.* 2015;22(2):46.
- [7] Yang H, Chou LS, Chou M, Chang Y. Assessment of genetic damage by methyl methacrylate employing in vitro mammalian test system. *Biomater.* 2003;24:2909–14.
- [8] Cerqueira EMM, Meireles JRC, Lopes MA, Junqueira VC, Gomes-filho IS, Trindade S. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2008;37:398–403.
- [9] Lorenzoni DC, Fracalossi ACC, Carlin V, et al. Mutagenicity and cytotoxicity in patients submitted to ionizing radiation. A comparison between cone beam computed tomography and radiographs for orthodontic treatment. *The Angle Orthod.* 2013;83(1):104-109.
- [10] Çelik A, Çavaş T, Ergene-Gözükara S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: Micronucleus test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis.* 2003;18(5):417–21.
- [11] Benedetti D, Nunes E, Sarmento M, Porto C, Santos CEI dos, Dias JF, et al. Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* Elsevier B.V.; 2013;752(1–2):28–33.
- [12] Andrade MC, Dos Santos JN, Cury PR, Flygare ACC, Claudio SR, Oshima CTF, et al. Cytogenetic Biomonitoring in Buccal Mucosal Cells from Municipal Solid Waste Collectors. *Anticancer Res.* 2017;37(2):849–52.
- [13] Bonassi S, Biasotti B, Kirsch-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E, Burgaz S, et al. State of the art survey of the buccal micronucleus assay- A first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis.* 2009;24(4):295–302.
- [14] Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825–37.
- [15] Holland N, Bolognesi C, Kirsch-volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, et al. Mutation Research / Reviews in Mutation Research The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage : The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res.* 2008;659:93–108.

- [16] Dorea LTM, Meireles JRC, Lessa JPR, et al. Chromosomal Damage and Apoptosis in Exfoliated Buccal Cells from Individuals with Oral Cancer. *Int J Dent*. 2012; 2012:1-6.
- [17] Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears : A Reid Test in Snuff Users. *Am. J. Epidemiol*. 1991;134(8):840–50.
- [18] Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears : methods development. *Mutat Res*. 1992;271:69–77.
- [19] Cerqueira EMM, Meireles JRC. The use of the Micronucleus Test to monitor individuals at risk of oral cancer. In: Concept Press Admin Team. (org.). *The research and biology of cancer*. 1ed. Hong Kong: iConcept Press Ltd., 2014, p. 33-58.
- [20] Au WW, Cajas-Salazar N, Salama S. Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutat Res*. 1998;400(1–2):467–78.
- [21] Cerqueira EMM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2004;562(1–2):111–7.
- [22] Brandão PT, Gomes-Filho IS, Cruz SS, Passos-Soares JS, et al. Can periodontal infection induce genotoxic effects?. *Acta Odontol Scand*. 2015;73(3): 219–225.
- [23] Santos NC, Ramos ME, Ramos AF et al. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity of filling pastes used for pulp therapy on deciduous teeth using the micronucleus test on bone marrow from mice (*Mus musculus*). *Mutagenesis*, 2016; 31:589–595.
- [24] Burgaz S, Demircigil GÇ, Yilmazer M, Ertaş N, Kemaloğlu Y, Burgaz Y. Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt, and nickel. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2002;521(1–2):47–56.
- [25] Tillberg A, Järholm B, Berglund A. Risks with dental materials. *Dent Mater*. 200;824:940-943,.
- [26] Toy E, Yuksel S, Ozturk F, Karatas OH, Yalcin M. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the buccal epithelial cells of patients undergoing orthodontic treatment with three light-cured bonding composites by using micronucleus testing. *Korean J Orthod*. 2014;44(3):128-135.

- [27] Albertini RJ, Diana A, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res.* 2000;(October 2016):111–72.
- [28] Ünal M, Çelik A, Ateş NA, Micozkadioğlu D, Deric E, Pata YS, et al. Cytogenetic biomonitoring in children with chronic tonsillitis: Micronucleus frequency in exfoliated buccal epithelium cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2005;69(11):1483–1488.
- [29] Bonassi S, El-zein R, Bolognesi C, Fenech M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis.* 2011;26(1):93–100.
- [30] Fenech M, Holland N, Seiger E, et al. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells—past, present and future. *Mutagenesis.* 2011;26(1):239–245.
- [31] Trkova, M., Kapras, J., Bobkova, K., et al., Increased Micronuclei Frequencies in Couples with Reproductive Failure, *Reprod. Toxicol.* 2000;14:331–335.
- [32] Nersesyanyan AK, Vardazaryan NS, Gevorgyan AC, Arutyunyan RM, Micronucleus Level in Exfoliated Buccal Mucosa Cells of Cancer Patients, *Arch Oncol.* 2002;10:35–36.
- [33] Hintzsche H, Stopper H. Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users. *Toxicol Lett.* 2010;193:124–130.
- [34] Gandhi G, Tung G. Sensitivity and specificity prediction of the buccal micronucleus cytome assay in end-stage renal disease patients on dialysis: A case-control study. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2017;822:1–9.
- [35] Oliveira FM, Carmona AM, Ladeira C. Is mobile phone radiation genotoxic? An analysis of micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Mutat Res Gen Tox En.* 2017;822:41-46.
- [36] Joshi MS, Verma Y, Gautam AK, Parmar G, Lakkad BC, Kumar S. Cytogenetic alterations in buccal mucosa cells of chewers of areca nut and tobacco. *Arch Oral Biol.* 2011;56:63–67.
- [37] Al-Ghamdi SS, Raftery MJ, Yaqoob MM. Acute solvent exposure induced activation of cytochrome P4502E1 causes proximal tubular cell necrosis by oxidative stress. *Toxicol in Vitro.* 2003;17:335-341.

- [38] Aquino T, Zenkner FF, Ellwanger JH, et al. DNA damage and cytotoxicity in pathology laboratory technicians exposed to organic solvents. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2016;88(1):227–236.
- [39] Nersesyan AK. Nuclear buds in exfoliated human cells. (Letter to the Editor). *Mutat Res*. 2005;588:64-68.
- [40] Çelik A, Yildirim S, Ekinci SY, et al. Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2013;92:265–270.
- [41] Wultsch G, Nersesyan A, Kundi M, et al. Genotoxic and Cytotoxic Effects in Exfoliated Buccal and Nasal Cells of Chromium and Cobalt Exposed Electroplaters. *J Toxicol Environ Health Sci*. 2017;80:1-10.
- [42] Torres-Bugarín O, Anda-Casillas AD, Ramírez-Muñoz MP, et al. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res*. 1998;413(3):277-281.
- [43] Bohrer Pl, Filho Ms, Paiva Rl, et al. Assessment of micronucleus frequency in normal oral mucosa of patients exposed to carcinogens. *Acta Cytol*. 2005;49:265-272.
- [44] Torres-Bugarín O, Ventura-Aguilar A, Zamora-Perez A, et al. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamida + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. *Mutat Res*. 2003;539:177–86.
- [45] Antoniazzi RP, Lago FB, Jardim LC, et al. Impact of Crack Cocaine Use on the Occurrence of Oral Lesions and Micronuclei. *Int J Oral Maxillof Surg*. 2018;47(7): 888–895.

4 CAPÍTULO 2

Biomonitoramento de crianças e adolescentes em uso de aparelhos ortodônticos confeccionados com resinas acrílicas com o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal²

RESUMO

Introdução: O presente estudo teve por objetivo investigar, em células esfoliadas da mucosa bucal, a ocorrência de micronúcleos e alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose e necrose, em crianças e adolescentes em uso de aparelhos ortodônticos confeccionados com resina acrílica autopolimerizável. Materiais e métodos: Foram computados micronúcleos e alterações nucleares em um mínimo de 2000 células coletadas das bochechas e do palato de 30 indivíduos de ambos os sexos, na faixa etária entre seis e 12 anos de idade antes e 15 a 21 dias após a instalação dos aparelhos. Resultados: Não foi observada diferença entre os dois momentos quanto à ocorrência de micronúcleos e de alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose e necrose nas células da bochecha ($p>0,05$). A avaliação das células do palato revelou aumento significativo na ocorrência de micronúcleos e de alterações nucleares indicativas de apoptose ($p<0,01$), mas não de cariólise ($p>0,05$). Conclusões: O contato direto com a mucosa bucal dos aparelhos ortodônticos, confeccionados em resinas acrílicas, induz aumento na ocorrência de danos cromossômicos e de alterações nucleares degenerativas. Adicionalmente ao metilmetacrilato, é possível que tenha havido trauma local provocado pelos aparelhos, o que pode ter estimulado o processo de renovação celular, interferindo nas diferenças observadas.

Palavras-chaves: resinas acrílicas; genotoxicidade; danos ao DNA; micronúcleo; apoptose.

ABSTRACT

Introduction: The aim of the present study was to investigate the occurrence of micronuclei and degenerative nuclear alterations indicative of apoptosis and necrosis in exfoliated buccal cells of children and adolescents using orthodontic appliances made with self-curing acrylic resins.

Materials and methods: Micronuclei and nuclear alterations were evaluated in a minimum of 2000 cells collected from cheeks and palate of 30 individuals of both genders, aged between 6 and 12 years, before and 15 to 21 days after the installation of appliances.

Results: No difference was observed between the two moments regarding the occurrence of micronuclei and nuclear degenerative changes indicative of apoptosis and necrosis in cheek cells ($p > 0.05$). The evaluation of palate cells revealed significant increase in the occurrence of micronuclei and nuclear alterations indicative of apoptosis ($p < 0.01$), but not of karyolysis ($p > 0.05$).

Conclusions: Direct contact with the oral mucosa of orthodontic appliances made with acrylic resins increases the incidence of chromosomal damage and degenerative nuclear alterations. In addition to methylmethacrylate, it is possible that local trauma caused by the use of appliances has occurred, which may have stimulated the cell renewal process, interfering with the observed differences.

Keywords: acrylic resins; genotoxicity; DNA damage; micronucleus; apoptosis.

Introdução

As resinas acrílicas são amplamente utilizadas na clínica odontológica, em especial na confecção de aparelhos removíveis para correções ortodônticas ou para a fixação de dispositivos. Alguns dos aparelhos podem ser utilizados por diversos meses, sendo mantidos em contato com a mucosa bucal por um longo período¹. As resinas acrílicas ortodônticas são compostos orgânicos classificados como polímeros, constituídos em grande parte por monômeros do metilmetacrilato. A utilização destes materiais em odontologia está relacionada às suas características organolépticas (ausência de sabor e odor), propriedades térmicas, estabilidade dimensional, além de facilidade técnica².

Apesar dos vários métodos adotados para a polimerização das resinas acrílicas, a conversão do monômero em polímero nunca é completa, especialmente naquelas ativadas quimicamente³. Resultados de diversos estudos indicam que quantidades variadas de monômeros do metilmetacrilato podem ser liberadas na cavidade bucal durante o uso de dispositivos intra-orais^{3,4}.

O monômero residual, além de alterar as propriedades físicas finais das resinas, quando em contato com a saliva e tecidos moles, pode levar ao aparecimento de reações teciduais locais e sistêmicas⁴⁻⁶. Entre as reações provocadas em usuários, existem relatos na literatura de irritação química local, hipersensibilidade e inflamação da mucosa¹.

Os potenciais efeitos genotóxicos do metilmetacrilato não foram ainda completamente estabelecidos⁶. A avaliação *in vitro* dos efeitos citotóxicos e genotóxicos do metilmetacrilato em células de hamsters com testes de eficiência de formação de colônias celulares, síntese de DNA e aberrações cromossômicas apontou para tais efeitos⁶. Por outro lado, não foram observados efeitos genotóxicos, em doses clínicas, do metilmetacrilato em fibroblastos de pulmões de hamsters chineses, quando aplicado o Teste do Micronúcleo⁷. Os estudos em que o

potencial genotóxico destes materiais foi avaliado são, portanto, escassos e conflitantes, suscitando a realização de novos trabalhos com este objetivo.

A exposição de indivíduos mais jovens a potenciais agentes genotóxicos tem sido objeto de pesquisa de diversos estudos⁸⁻¹⁰. A relevância destes estudos está no fato de que tais indivíduos podem ter maior sensibilidade aos agentes genotóxicos¹¹ e também porque os danos genéticos em idades tenras podem levar ao desenvolvimento de agravos à saúde ao longo da vida⁸. Além disso, fatores de confusão frequentes entre adultos, como o hábito de fumar, etilismo, exposição ocupacional a genotóxicos e mesmo fatores nutricionais, habitualmente não atuam sobre as crianças e jovens¹¹.

Entre os métodos de biomonitoramento de indivíduos nas faixas etárias que caracterizam crianças e adolescentes, o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal tem sido uma escolha frequente, tendo em vista o maior conforto e rapidez na coleta do material^{9,11}. Micronúcleos são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que, por não se ligarem às fibras do fuso, não são incluídos nos núcleos das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas¹².

O computo de alterações nucleares degenerativas, além de micronúcleos, aumenta a sensibilidade do teste. Estas alterações, quando em ocorrência excessiva, são indicadoras de apoptose (cromatina condensada, picnose e cariorréxis) e necrose (cariólise, adicionalmente), associadas, respectivamente, a efeitos genotóxicos e citotóxicos¹³⁻¹⁵.

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo investigar, em células esfoliadas da mucosa bucal, a ocorrência de danos cromossômicos, traduzidos como micronúcleos, bem como alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose e necrose, em crianças e adolescentes em uso de aparelhos ortodônticos confeccionados com resina acrílica.

Materiais e métodos

Sujeitos

Foram convidados a participar da pesquisa 30 indivíduos de ambos os sexos, na faixa etária entre seis e 12 anos de idade com indicação para uso de aparelhos ortodônticos confeccionados com resina acrílica autopolimerizável. A amostra foi selecionada aleatoriamente entre pacientes, nesta faixa etária, atendidos na Clínica de Ortodontia do Curso de Odontologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

A definição do tamanho amostral levou em consideração estudos anteriores em que foi utilizado o Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal^{16,17}. Além disso, há recomendação de um número mínimo de 20 indivíduos no caso de estudos nos quais alterações cromossômicas são utilizadas como biomarcadores de risco, tanto para os grupos expostos quanto para os grupos controles¹⁸.

Os critérios de exclusão adotados foram: (1) estar fazendo uso de algum medicamento; (2) estar com alguma infecção (virótica ou bacteriana); (3) apresentar lesões bucais; (4) ter utilizado antissépticos bucais no último mês; (5) ter sido exposto a raios-X (radiografia, tomografia ou qualquer procedimento radiológico há menos de 3 meses) ou a outros genotóxicos neste mesmo período e; (6) ter feito tratamento quimioterápico ou radioterápico em algum momento da vida.

Coleta dos dados

O material destinado à análise citológica foi coletado através de raspagem gentil da mucosa bucal da bochecha e da mucosa do palato, com escova *cytobrush*, após bochecho com água filtrada, de acordo com protocolo sugerido por Thomas et al. (2009)¹⁵. As coletas foram realizadas imediatamente antes (Momento I) e de 15 a 21 dias após a instalação dos aparelhos

(Momento II).

Com o material coletado foi feito esfregaço em lâmina de vidro limpa contendo duas gotas de soro fisiológico (NaCl a 0,9%). As lâminas com o material coletado secaram à temperatura ambiente. Após secas, foram fixadas em solução de metanol/ácido acético na concentração de 3:1. Transcorridas pelo menos 24 horas, foi realizada hidrólise em solução de ácido clorídrico (5N), por 20 minutos, seguindo-se lavagem em água destilada por três vezes. Após secagem à temperatura ambiente, a coloração foi feita com o reativo de Schiff (Merck®) por 90 minutos e, então, realizada nova lavagem em água destilada por três vezes e secagem em temperatura ambiente. Por fim, foi feita contra-coloração com Fast Green a 1% e executada a lavagem com álcool absoluto e montadas as lamínulas com Entelan®.

Análise citológica

A análise citológica foi realizada, em teste cego, por um único avaliador treinado, sob microscopia óptica binocular, com objetivas de 20X, 40X e 100X, segundo os protocolos sugeridos por Tolbert, Shy, Allen (1991,1992)^{13,14}, e Thomas et al. (2009)¹⁵. De acordo com estes protocolos devem ser identificados como micronúcleos estruturas arredondadas e distintamente separadas do núcleo, com limites bem definidos, medindo cerca de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo e apresentando, em relação a este, estrutura cromatínica e coloração similar, além de serem visualizados no mesmo plano.

Foram analisadas, pelo menos, 2.000 células de cada região, por indivíduo. Para as células do palato foram analisadas duas lâminas de cada indivíduo até que o número mínimo de células fosse atingido, uma vez que nesta região, devido à ceratinização, havia células que apresentavam apenas o citoplasma corado. Somente células com citoplasma íntegro foram computadas.

Além de micronúcleos, foram também computadas alterações nucleares degenerativas indicativas de apoptose (picnose, estrutura nuclear reduzida; cariorréxis, fragmentação do núcleo em pequenos corpos arredondados ou ovalados dentro do citoplasma intacto; e cromatina condensada, coloração mais intensa em relação ao núcleo) e de necrose (cariólise adicionalmente, dissolução do núcleo, visualmente marcada pela ausência do mesmo). Figuras 1A, B, C, D e E.

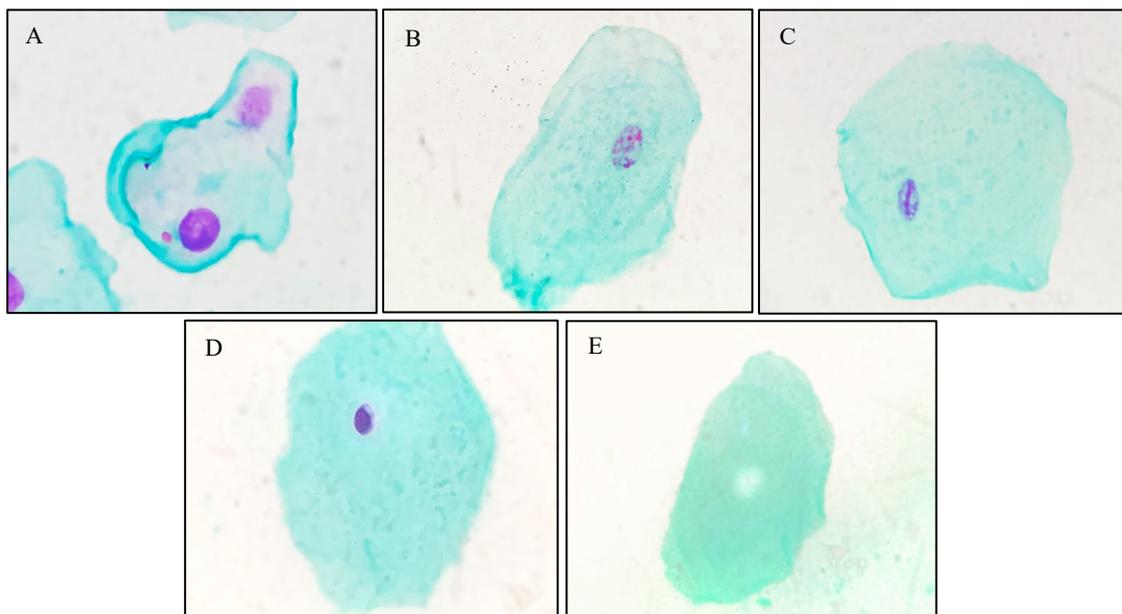


Figura 1. Fotomicrografias de células apresentando micronúcleo (A), cariorréxis (B), cromatina condensada (C), picnose (D) e cariólise (E) (1000X).

Adicionalmente a estas alterações, foram também computadas as projeções nucleares (*broken eggs* e brotos nucleares). Foram considerados como *broken eggs*, estruturas arredondadas, de coloração e distribuição cromatínica semelhante a do núcleo, a ele ligadas por um fino filamento cromatínico (Figura 2A). Brotos nucleares foram evidenciados como projeções que resultam do estrangulamento em uma pequena área da superfície nuclear de onde uma protuberância arredondada desponta (Figura 2B)¹⁵.

As colorações e análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Genética Toxicológica do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

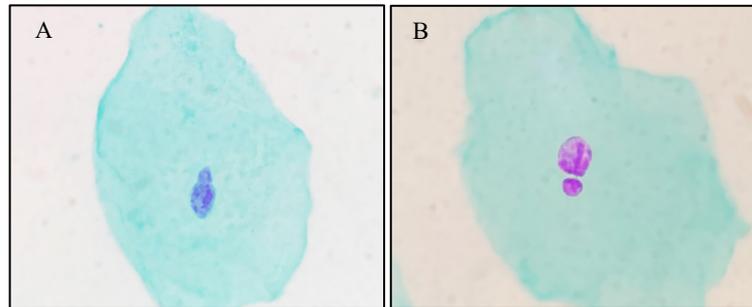


Figura 2. Fotomicrografias de células apresentando broto nuclear (A) e broken egg (B) (1000X).

Análise estatística

Os resultados da análise citológica foram avaliados com o teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros que é um teste de significância alternativo ao de qui-quadrado (χ^2), na linha do teste exato de Fischer¹⁹. Este teste é considerado adequado para avaliação citogenética quando para detecção da ocorrência de uma dada alteração citológica se faz necessário o computo de um grande número de células^{10,12,20,22}. Em todas as análises o nível de significância utilizado foi de 5%.

Aspectos éticos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Feira de Santana (parecer nº 2.016.819). A participação foi voluntária e aos participantes foi dada toda a liberdade para não permanecerem no estudo. Todos os indivíduos assinaram o termo de assentimento e tiveram o termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo responsável.

Resultados

A amostra consistiu em 30 indivíduos, de ambos os sexos (18 do sexo masculino, 12 do sexo feminino), com idade entre 6 e 12 anos (média de $9,47 \pm 1,77$). A Tabela 1 mostra a distribuição dos participantes por gênero e médias de idade.

Tabela 1. Distribuição das médias e desvio-padrão das idades de acordo com o sexo.

	n	%	Idade média \pm desvio padrão
Masculino	18	60	$10,04 \pm 1,33$
Feminino	12	40	$8,61 \pm 2,05$
Total	30	100	$9,47 \pm 1,77$

Células da mucosa das bochechas

A análise das diferenças quanto à ocorrência de micronúcleos, nas células coletadas da mucosa das bochechas, entre o momento I (antes da instalação) e o momento II (15 a 21 dias após a instalação), feita com o teste condicional para comparação de proporções em situações de eventos raros não mostrou diferenças significantes ($\chi^2 = 0,9902$; GL = 1; $p > 0,05$). Dados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Ocorrência de micronúcleos nas células da mucosa das bochechas entre os dois momentos.

Momento	N	Total células	Micronúcleo (obs)	Micronúcleo (esp)	Qui-quadrado
I	30	61709	28	31,96	$\chi^2 = 0,9782$
II	30	61878	36	32,04	GL=1
Total	60	123587	64	64,00	$p > 0,05$

obs=observado; esp=esperado

A avaliação da ocorrência de apoptose nas células coletadas nos momentos I e II, feita considerando o somatório de cariorréxis, cromatina condensada e picnose, não revelou diferença significativa: $\chi^2 = 3,5426$; GL= 1; $p > 0,05$. Dados apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Ocorrência de apoptose nas células da mucosa das bochechas entre os dois momentos.

Momento	N	Total células	Apoptose* (obs)	Apoptose* (esp)	Qui-quadrado
I	30	61709	1415	1465,99	$\chi^2 = 3,5426$
II	30	61878	1521	1470,01	GL=1
Total	60	123587	2936	2936,00	$p > 0,05$

obs=observado; esp=esperado; * Σ cariorréxis, cromatina condensada e picnose

A ocorrência de necrose, inferida pelo somatório das alterações nucleares degenerativas a ela associadas (cariólise adicionalmente à cariorréxis, cromatina condensada e picnose) também não diferiu entre os dois momentos em que as células foram analisadas ($\chi^2 = 3,3971$; GL=1; $p > 0,05$). Vide Tabela 4.

Tabela 4. Ocorrência de necrose nas células da mucosa das bochechas nos dois momentos.

Momento	N	Total células	Necrose* (obs)	Necrose* (esp)	Qui-quadrado
I	30	61709	1612	1665,22	$\chi^2=3,3971$
II	30	61878	1723	1669,78	GL=1
Total	60	123587	3335	3335,00	$p>0,05$

obs=observado; esp=esperado; * Σ cariorréxis, cromatina condensada, picnose e cariólise.

Resultados semelhantes foram observados quando feita a comparação entre os dois momentos quanto à ocorrência de *broken eggs* e brotos nucleares. Tabela 5.

Tabela 5. Ocorrência de *broken eggs* e brotos nucleares nas células da mucosa das bochechas nos dois momentos.

	Momento I		Momento II		χ^2 ; GL=1; $p>0,05$
	obs	esp	obs	esp	
<i>Broken egg</i>	44	50,43	57	50,57	1,6379
Broto nuclear	25	30,46	36	30,54	1,9536

obs=observado; esp=esperado

Células da mucosa do palato

Micronúcleos foram de ocorrência significativamente maior nas células coletadas no momento II quando comparadas àquelas coletadas no momento I: $\chi^2= 4,0291$; GL= 1; $p<0,05$.

Dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Ocorrência de micronúcleos nas células da mucosa do palato nos dois momentos.

Momento	N	Total células	Micronúcleos (obs)	Micronúcleos (esp)	Qui-quadrado
I	30	61315	17	23,95	$\chi^2 = 4,0291$
II	30	61554	31	24,05	GL= 1
Total	60	122869	48	48,00	$p < 0,05$

obs=observado; esp=esperado

Resultado similar foi observado quando avaliada a ocorrência de apoptose, inferida pelo somatório das alterações nucleares associadas (cariorréxis, cromatina condensada e picnose).

Vide Tabela 7.

Tabela 7. Ocorrência de apoptose nas células da mucosa do palato nos dois momentos.

Momento	N	Total células	Apoptose* (obs)	Apoptose* (esp)	Qui-quadrado
I	30	61315	1047	1126,30	$\chi^2 = 11,1463$
II	30	61554	1210	1130,70	GL= 1
Total	60	122869	2257	2257,00	$p < 0,01$

obs=observado; esp=esperado; * Σ cariorréxis, cromatina condensada e picnose.

Cariólise, brotos nucleares e *broken eggs* não diferiam entre os dois momentos. Dados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Ocorrência de cariólise, *broken eggs* e brotos nucleares nas células da mucosa do palato nos dois momentos.

	Momento I		Momento II		χ^2 ; GL= 1; $p>0,05$
	obs	esp	obs	esp	
Cariólise	185	203,60	223	204,40	3,3929
<i>Broken eggs</i>	43	50,40	58	50,60	2,1698
Broto nuclear	23	27,45	32	27,55	1,4379

obs=observado; esp=esperado

Discussão

A avaliação dos efeitos genotóxicos de materiais utilizados em odontologia vem sendo objeto de investigação de diversos estudos²³⁻²⁵. Reconhecer que materiais de uso na prática odontológica podem provocar alterações celulares traduzidas em danos ao DNA é de grande relevância e suscita a realização do biomonitoramento de populações expostas, representando, portanto, importante medida de prevenção. A prevenção de danos ao DNA é especialmente relevante quando são abordados grupos populacionais mais jovens, uma vez que eles têm maior longevidade, oportunizando assim o tempo para ocorrência de mutações ao longo da vida¹⁰.

O Teste do Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa bucal tem sido sistematicamente utilizado no biomonitoramento genético de populações expostas a genotóxicos^{23,24}. Este método, como já comentado, é particularmente interessante para a identificação de danos cromossômicos em crianças devido à coleta ser não invasiva e de rápida execução^{9,23}.

Os mecanismos que levam à formação de micronúcleos ocorrem nas células das camadas basais do tecido epitelial quando, para garantir a renovação tecidual, passam por divisões mitóticas. No desenvolver do processo de maturação do epitélio, as células da camada basal se diferenciam e migram para as camadas mais superficiais, onde são esfoliadas. O

desenrolar desse processo dura de 10 a 21 dias, intervalo adequado para a realização de coletas quando se faz necessária a avaliação pré e pós uma dada exposição a genotóxicos¹⁵. O período entre as coletas adotado neste estudo foi propício, portanto, para a detecção dos danos genotóxicos que pudessem ter sido induzidos pelas resinas acrílicas dos aparelhos ortodônticos.

Os resultados dos estudos em que foi avaliado o potencial genotóxico das resinas acrílicas ou dos monômeros de metilmetacrilato, seus principais constituintes, são conflitantes^{3,6,7}. Apesar de algumas agências internacionais classificarem o metilmetacrilato como não carcinogênico²⁶, em estudo longitudinal em que foi investigada a mortalidade por câncer entre cirurgiões expostos a esta substância, foi observado um aumento nas mortes por esta doença quando feita comparação com cirurgiões não expostos²⁷. O autor concluiu que profissionais de saúde expostos ao metilmetacrilato podem ter maior risco de morte prematura por tumores malignos.

Adicionalmente, são poucos os estudos em que a genotoxicidade destas resinas foi avaliada através da análise de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa bucal^{28,29}. Topajiche et al. (2015)²⁹ descreveram efeito genotóxico, inferido pela maior ocorrência dessas estruturas, nas células esfoliadas da mucosa bucal de profissionais da odontologia expostos aos monômeros das resinas acrílicas, quando comparados ao grupo controle. No entanto, os autores não puderam concluir se tal efeito estava associado exclusivamente às resinas, uma vez que o grupo exposto também tinha contato com outros materiais. Por outro lado, Azhar et al. (2013)²⁸ não encontraram diferenças significativas na ocorrência de micronúcleos avaliada, também, em células esfoliadas da mucosa bucal ao compararem profissionais expostos a um grupo de estudantes e dentistas não expostos a estas resinas.

Este é o primeiro estudo em que foram analisadas células esfoliadas da mucosa ceratinizada diretamente expostas a aparelhos ortodônticos confeccionados em resina acrílica,

mas em muitos estudos já foi avaliado, nestas células, o potencial genotóxico de vários agentes e condições^{22,30,31}.

A maior ocorrência de micronúcleos nas células do palato pós exposição, mas não nas células da bochecha, sugere que os monômeros de metilmetacrilato liberados na cavidade oral não são efetivos em induzir danos cromossômicos, mas que o contato direto com o aparelho ortodôntico é suficiente para induzir tais danos. É preciso, contudo, levar em consideração que, adicionalmente, o aparelho pode estar traumatizando a mucosa do palato, estimulando a divisão celular, oportunizando assim a ocorrência de danos ao material genético^{32,33}.

O papel dos estímulos mecânicos diretos provocados por aparelhos ortodônticos na ocorrência de micronúcleos ainda carece, contudo, de esclarecimento. Em alguns estudos não foi encontrado aumento significativo na ocorrência destas estruturas em células esfoliadas da mucosa bucal de usuários de aparelhos ortodônticos fixos quando feita a comparação com o grupo controle^{23,24,34}. No entanto, em outros estudos foi descrito, também em usuários de aparelhos fixos, aumento significativo delas^{32,33}. Apesar de ainda conflitantes os resultados dos estudos avaliando o papel dos aparelhos ortodônticos fixos na indução de micronúcleos, seu uso é, inclusive, considerado critério de exclusão em pesquisas objetivando investigar em células da mucosa bucal a ação de outros agentes^{35,36}.

A genotoxicidade das resinas acrílicas foi traduzida também pela maior ocorrência, nas células da mucosa do palato, das alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose no período pós exposição. A apoptose faz parte dos mecanismos de renovação tecidual natural sob controle fisiológico, mas é indicadora de dano genotóxico quando de ocorrência excessiva¹⁵.

Aumento nas taxas de apoptose também foi observado nos estudos em que foi avaliada, em células esfoliadas da mucosa bucal, a genotoxicidade induzida pelo contato desta mucosa com aparelhos ortodônticos fixos^{37,38}. Assim, como já comentado, o incremento do processo de renovação celular induzido por eventual trauma provocado pelo contato direto dos aparelhos

com as células do palato pode ter interferido na maior ocorrência das alterações relacionadas à apoptose.

Citotoxicidade tal como avaliada no presente estudo não foi observada, e há necessidade, ainda, de que sejam realizados estudos adicionais para esclarecer o real potencial citotóxico das resinas acrílicas autopolimerizáveis utilizadas na odontologia. Rose et al. (2000)⁵ classificaram estas resinas como levemente citotóxicas, ao investigarem, fazendo uso do teste de proliferação-inibição de Mosmann's, os efeitos do metilmetacrilato em culturas de fibroblastos. No entanto, após embebição dos aparelhos em água, por três dias, as mesmas resinas foram classificadas como não citotóxicas ou no limite para tal classificação. Jorge et al. (2003)⁴ afirmaram que os resultados dos testes de citotoxicidade de resinas acrílicas utilizadas em odontologia apresentam limitações quanto à aplicabilidade em condições clínicas. É importante ressaltar, no entanto, que as reações teciduais ao contato direto já relatadas na literatura indicam a necessidade de cuidados na manipulação e atendimento às questões técnicas durante o uso destes materiais.

Em alguns estudos foi descrita associação entre o aumento de projeções nucleares (*broken eggs* e brotos nucleares) em células esfoliadas da mucosa bucal e genotoxicidade^{39,40}. No entanto, em outros estudos não foi mostrada tal associação, tendo alguns apresentado, inclusive, frequências mais altas em grupos controles comparativamente a grupos expostos^{20,41}. Os resultados obtidos no presente estudo, corroboram dados de outras investigações^{35,36} e apontam para a associação destas estruturas com o processo natural de diferenciação celular.

Conclusões

- O contato direto com a mucosa bucal dos aparelhos ortodônticos, confeccionados em resinas acrílicas, induz aumento na ocorrência de danos cromossômicos e de alterações nucleares degenerativas;

- Há que considerar que, adicionalmente ao metilmetacrilato, é possível que tenha havido trauma local provocado pelos aparelhos, o que pode ter estimulado o processo de renovação celular, interferindo nas diferenças observadas;
- Os resultados encontrados suscitam a realização de novos estudos para avaliação do real potencial genotóxico de aparelhos confeccionados em resinas acrílicas.

Referências

1. Gonçalves TS, Menezes LM, Silva LEA. Residual monomer of autopolymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. *Angle Orthod.* 2008;78(4):722-7.
2. Anusavice KJ, Shen CS, Rawls HR. *Phillips' Science of Dental Materials*. 12th ed. St. Louis (MO): Elsevier; 2013.
3. Leggat PA, Kedjarune U. Toxicity of methyl methacrylate in dentistry. *Int Dent J.* 2003;53(3):126–31.
4. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CEV. Citotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *The J Prost Dent.* 2003;90(2):190-3.
5. Rose EC, Jonas IE, Kappert HF. Contribution to the Biological Assessment of Orthodontic Acrylic Materials. *J Orofac Orthop.* 2000;57(4):246–57.
6. Yang H, Chou LS, Chou M, Chang Y. Assessment of genetic damage by methyl methacrylate employing in vitro mammalian test system. *Biomaterials.* 2003;24:2909–14.
7. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res.* 2001;80(7):1615-20.
8. Neri M, Fucic A, Knudsen LE, Lando C, Merlo F, Bonassi S. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: A review. *Mutat Res - Rev Mutat Res.* 2003;544(2–3):243–54.
9. Holland N, Fucic A, Merlo F, Sram R. Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. 2011;26(1):51–6.
10. Santos NC, Ramos ME, Ramos AF et al. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity of filling pastes used for pulp therapy on deciduous teeth using the micronucleus test on bone marrow from mice (*Mus musculus*). *Mutagenesis.* 2016; 31:589–95.
11. Scheuplein R, Charnley G, Dourson M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2002;35(3):429–47.
12. Dórea LT, Meireles JR, Lessa JP, Oliveira M, Bragança Pereira CA, Campos AP, Cerqueira E. Chromosomal Damage and Apoptosis in Exfoliated Buccal Cell from

- Individuals with Oral Cancer. *Int J Dent*. 2012;2012:1-6. doi:10.1155/2012/457054.
13. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Buccal Smears : A Reid Test in Snuff Users. 1991;134(8):840–50.
 14. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears : methods development. 1992;271:69–77.
 15. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc*. 2009;4(6):825–37.
 16. Cerqueira EMM, Meireles JRC. The use of the Micronucleus Test to monitor individuals at risk of oral cancer. in: Concept Press Admin Team. (org.). *The research and biology of cancer*. 1ed. Hong Kong: iConcept Press Ltd., 2014, p. 33-58.
 17. Burgaz S, Demircigil GÇ, Yilmazer M, Ertaş N, Kemaloğlu Y, Burgaz Y. Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt, and nickel. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2002;521(1–2):47–56.
 18. Au WW, Cajas-Salazar N, Salama S. Factors contributing to discrepancies in population monitoring studies. *Mutat Res*. 1998;400(1–2):467–78.
 19. Bragança-Pereira CA. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. In: Rabello-Gay MN, Rodrigues MA, La R, Monteleone-Neto R. *Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação*. São Paulo (SP): Sociedade Brasileira de Genética, 113–121, 1991.
 20. Cerqueira EM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS and Machado-Santelli GM: Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res*. 2004;562(1-2): 111-7. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.05.008.
 21. Bolognesi C, Roggieri P, Ropolo M, Thomas P, Hor M, Fenech M, et al. Buccal micronucleus cytome assay: results of an intra- and inter-laboratory scoring comparison. *Mutagenesis*. 2015:1–11.
 22. Brandão PT, Gomes-Filho IS, Cruz SS, Passos-Soares JS et al. Can periodontal infection induce genotoxic effects?. *Acta Odontol Scand*. 2015;73: 219–25.
 23. Angelieri F, Carlin V, Martins RA, Ribeiro DA. Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. *Am J Orthod Dentofac Orthop* [Internet]. 2011;139(4):e399–404. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2009.06.029>
 24. Toy E, Yuksel S, Ozturk F, Karatas OH, Yalcin M. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the buccal epithelial cells of patients undergoing orthodontic treatment with three light-cured bonding composites by using micronucleus testing. *Korean J Orthod*. 2014;44(3):128-35. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.4041/kjod.2014.44.3.128>
 25. Cunha AS, Castillo WO, Takahashi CS, Kuchler EC, Segato RAB, Silva LAB, et al.

- Genotoxic and cytotoxic effects of Haas appliance in exfoliated buccal mucosa cells during orthodontic treatment. *Angle Ortod.* 2018;88(5):590-5.
26. Albertini RJ. The lower alkyl methacrylates : genotoxic profile of non-carcinogenic compounds. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2017;84:77–93.
 27. Diaz JH. Proportionate Cancer Mortality in Methyl Methacrylate-Exposed Orthopedic Surgeons Compared to General Surgeons. 2011;125–32.
 28. Azhar DA, Syed S, Luqman M, Ali AA. Evaluation of methyl methacrylate monomer cytotoxicity in dental lab technicians using buccal micronucleus cytome assay. *Dent Mater J.* 2013;32(3):519–21.
 29. Topajiche SS, Smitha BR, Murthy SJ, Patil MS, Karthik Kumar R, Solanki MP. Genotoxic Effect of Methyl Methacrylate and Nickelcobalt-Chromium in Dental Lab Technicians: A Micronuclei and Cytomorphometric Study of Buccal Mucosal Cells. *Toxicol Int.* 2015;22(2):46.
 30. Cerqueira EMM, Meireles JRC, Lopes MA, Junqueira VC, Gomes-filho IS, Trindade S. Genotoxic effects of X-rays on keratinized mucosa cells during panoramic dental radiography. *Dentomaxillofac Radiol.* 2008;37:398–403.
 31. Yang P, Hao S, Gong X, Li G. Cytogenetic biomonitoring in individuals exposed to cone beam CT: comparison among exfoliated buccal mucosa cells, cells of tongue and epithelial gingival cells. *Dentomaxillofac Radiol.* 2017;46(5):20160413. Available from: <http://dx.doi.org/10.1259/dmfr.20160413>
 32. Natarajan M, Padmanabhan S, Chitharanjan A, Narasimhan M. Evaluation of the genotoxic effects of fixed appliances on oral mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: An in-vivo study. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2011;140(3):383–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.07.027>
 33. Heravi F, Abbaszadegan MR, Merati M, Hasanzadeh N, Dadkhah E. DNA damage in oral mucosa cells of patients with fixed orthodontic appliances. 2013;10(6):494–500.
 34. Hafez HS, Selim EMN, Kamel Eid FH, Tawfik WA, Al-Ashkar EA, Mostafa YA. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: A longitudinal in-vivo study. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2011;40(3):298–308. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2010.05.025>
 35. Khan AW, Nersesyan A, Knasmüller S, Moshammer H, Kundi M. Nuclear anomalies in exfoliated buccal cells in Pakistani cotton weavers. *Mutagenesis.* 2015;30(5):613–9.
 36. Antoniazzi RP, Lago FB, Jardim LC, et al. Impact of Crack Cocaine Use on the Occurrence of Oral Lesions and Micronuclei. *Int J Oral Maxillof Surg.* 2018;47(7): 888–895.
 37. Kapadia JMH, Agarwal AR, Mishra S, Joneja P, Yusuf AS, Choudhary DS. Cytotoxic and Genotoxic effect on the Buccal Mucosa Cells of Patients Undergoing Fixed Orthodontic Treatment. *J Contemp Dent Pract.* 2018;1358–62.
 38. Quadras D, Krishna Nayak U, Kumari Ns, Priyadarshini H, Gowda S, Fernandes B, et

- al. In vivo study on release of nickel, chromium, and zinc and DNA damage in buccal mucosa cells from patients treated with fixed orthodontic appliances. *J Indian Orthod Soc.* 2018;52(2):115. Available from: http://dx.doi.org/10.4103/jios.jios_84_17.
39. Montero R, Serrano L, Davila V, Segura Y, Arrieta A, Fuentes R, et al. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment, *Environ Mol Mutagen.* 2003;42:216– 22.
40. Revazova J, Yurchenko V, Katosova L. Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town. *Chemosphere.* 2001;43:999– 1004.
41. Torres-Bugarín O, Anda-Casillas AD, Ramírez-Muñoz MP, et al. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. *Mutat Res.* 1998;413(3):277-281.

5 CONCLUSÃO GERAL

Os cirurgiões-dentistas e técnicos em prótese dentária estão expostos a agentes capazes de provocar genotoxicidade expressa pelo aumento nas taxas de alterações nucleares indicativas de apoptose. A exposição ocupacional aos monômeros das resinas acrílicas poderia *a priori* estar contribuindo para o aumento da apoptose, mas os resultados aqui obtidos não permitem afirmar este fato, uma vez que profissionais não expostos apresentaram taxas similares aos expostos.

O contato direto com os aparelhos ortodônticos confeccionados em resinas acrílicas induz aumento na ocorrência de danos cromossômicos e alterações nucleares degenerativas. É importante ponderar que, adicionalmente ao metilmetacrilato, pode ter havido interferência nas diferenças observadas por eventual trauma local provocado pelos aparelhos. Trabalhos adicionais investigando os efeitos genotóxicos dos monômeros de resinas acrílicas utilizadas em odontologia são necessários.

Apêndice I – Questionários

PROJETO: AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE RESINAS ACRÍLICAS DE USO ODONTOLÓGICO POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL E DO TESTE COMETA EM LINFÓCITOS HUMANOS

QUESTIONÁRIO DE ENTREVISTA – CRIANÇAS E ADOLESCENTES – MICRONÚCLEOS

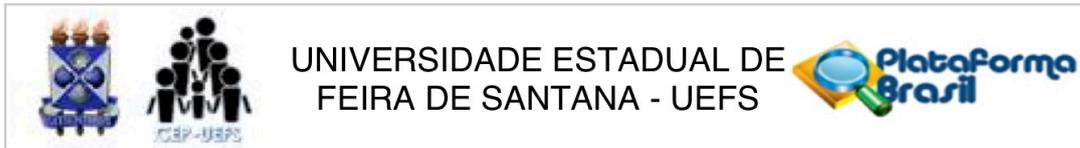
Data: ___ / ___ / _____			
Identificação			
01. Número		02. Data de nascimento:	
03. Idade	04. Sexo:		06. Grau de instrução
Dados médicos			
01. Uso frequente de algum medicamento: () sim () não - Se sim, qual? _____			
02. Apresenta alguma infecção? () sim () não - Se sim, qual? _____			
03. Já fez tratamento com radioterapia ou quimioterapia? () sim () não			
Exposição à radiação			
01. Exposição frequente à radiação (tomografia computadorizada, Raios X): () sim () não			
Exposição a produtos tóxicos			
01. Exposição a produtos tóxicos: () sim () não Qual? _____ Obs: _____			
Uso de antisséptico bucal			
01. Uso de antisséptico bucal () sim () não		02. Há quanto tempo () 1 a 6 meses. () 6 a 12 meses. () 1 ano a 1,5 anos. () 1,5 ano a 2 anos. () mais de 2 anos () _____ anos. () Não se aplica.	
03. Frequência de uso: () diária ___ vezes ao dia () semanal ___ vezes por semana () mensal ___ vezes por mês () Não se aplica			
04. Tipo do antisséptico () contém álcool () não contém		04. Marca (s)	
Antecedentes familiares			
01. Câncer na família: () Sim () Não		02. Localização topográfica: () boca () colo de útero () mama () próstata () pele () outros. Qual: _____	
03. Grau de parentesco		04. A pessoa está viva? () sim () não	

**PROJETO: AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE RESINAS ACRÍLICAS DE USO
ODONTOLÓGICO POR MEIO DO TESTE DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA
MUCOSA BUCAL**

QUESTIONÁRIO DE ENTREVISTA – OCUPACIONAL – MICRONÚCLEOS

Data: ___/___/_____		
Identificação		
01. Número		02. Data de nascimento:
03. Idade	04. Sexo:	06. Grau de instrução
Dados médicos		
01. Uso frequente de algum medicamento. () sim () não - Se sim, qual? _____		
02. Apresenta alguma infecção? () sim () não - Se sim, qual? _____		
03. Já fez tratamento com radioterapia ou quimioterapia? () sim () não		
Exposição à radiação		
01. Exposição frequente à radiação (tomografia computadorizada, Raios X): () sim () não		
Exposição a resinas acrílicas		
01. Exposição a resinas acrílicas: () sim () não Qual? _____ Obs: _____ <small>03. Frequência</small> () 1-3 dias p/semana () 4-7 dias p/semana () _____ vezes/mês		
Exposição a produtos tóxicos		
01. Exposição a produtos tóxicos: () sim () não Qual? _____ Obs: _____		
Uso de antisséptico bucal		
01. Uso de antisséptico bucal () sim () não	02. Há quanto tempo () 1 a 6 meses. () 6 a 12 meses. () 1 ano a 1,5 ano. () 1,5 ano a 2 anos. () mais de 2 anos () _____ anos. () Não se aplica.	
03. Frequência de uso: () diária ___ vezes ao dia () semanal ___ vezes por semana () mensal ___ vezes por mês () Não se aplica		
04. Tipo do antisséptico () contém álcool () não contém	04. Marca (s)	
Antecedentes familiares		
01. Câncer na família: () Sim () Não	02. Localização topográfica: () boca () colo de útero () mama () próstata () pele () outros. Qual: _____	
03. Grau de parentesco	04. A pessoa está viva? () sim () não	
Exposição a fumo/álcool		
01. Fuma () sim () não	02. Há quanto tempo () 6 a 12 meses. () 1 ano a 5 anos. () mais de 5 anos () _____ anos	
03. Frequência de uso: () diária ___ vezes ao dia () semanal ___ vezes por semana () mensal ___ vezes por mês () Não se aplica		
04. Bebida alcoólica () sim () não	05. Há quanto tempo () 6 a 12 meses. () 1 ano a 5 anos. () mais de 5 anos () _____ anos	
06. Frequência de uso: () diária ___ vezes ao dia () semanal ___ vezes por semana () mensal ___ vezes por mês () Não se aplica		

Anexo I – Parecer de aprovação do CEP/UEFS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DE RESINAS ACRÍLICAS DE USO ODONTOLÓGICO POR MEIO DO TESTE DE MICRÔNÚCLEO EM CÉLULAS ESFOLIADAS DA MUCOSA ORAL E DO TESTE COMETA EM LINFÓCITOS

Pesquisador: João Pedro Pedrosa Cruz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 63263416.0.0000.0053

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Feira de Santana

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

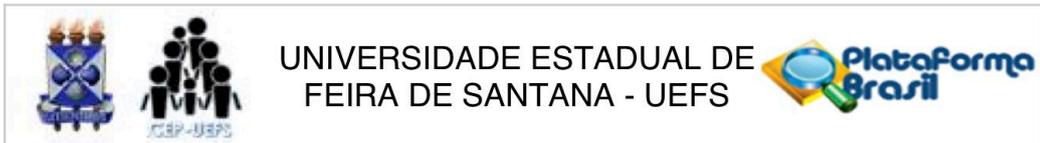
Número do Parecer: 2.016.819

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa de Doutorado apresentada por JOÃO PEDRO PEDROSA CRUZ, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEFS, sob orientação da Prof. Dra. Eneida de Moraes Marcílio Cerqueira.

"Trata-se de um estudo observacional, em que serão utilizadas duas metodologias: 1) Teste do Micronúcleo em células esfoliadas - estudo em que serão convidados a participar da pesquisa 30 indivíduos de ambos os sexos, na faixa etária entre 06 e 12 anos de idade em tratamento já definido, independente da pesquisa, pela Disciplina de Clínica Odontopediátrica da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, com indicação para uso de dispositivos intra-orais confeccionados em resina acrílica autopolimerizável; o material destinado à análise será coletado imediatamente antes da colocação do aparelho ortodôntico e após 15 dias. Por meio do Teste de Micronúcleo serão analisados, além dos micronúcleos, alterações nucleares degenerativas indicadoras de apoptose e necrose (cromatina condensada, cariorréxis, pichnose e cariólise. 2) Ensaio cometa de linfócitos periféricos - serão ainda convidados a participar da pesquisa 60 indivíduos, de ambos os sexos, na faixa etária entre 25 e 50 anos de idade, a serem distribuídos em dois grupos de igual tamanho. Tais sejam: Grupo I: formado por 30 cirurgiões dentistas ocupacionalmente expostos a

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 2.016.819

monômeros liberados na polimerização de resinas acrílicas autopolimerizáveis. Grupo II: constituído por 30 cirurgiões dentistas sem histórico de exposição a substâncias mutagênicas e/ou carcinogênicas e que não manipulam resinas acrílicas em suas rotinas de trabalho. Através do Ensaio Cometa, serão avaliados danos ao DNA" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 02).

"A amostra será selecionada, aleatoriamente, entre pacientes atendidos na Clínica de Ortodontia do curso de Odontologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia" (Projeto completo, p. 09).

Apresenta Cronograma com atividades previstas para o período de setembro de 2016 a junho de 2018. O orçamento está estimado em R\$ 14.774,00, com contrapartida da UEFS.

Objetivo da Pesquisa:

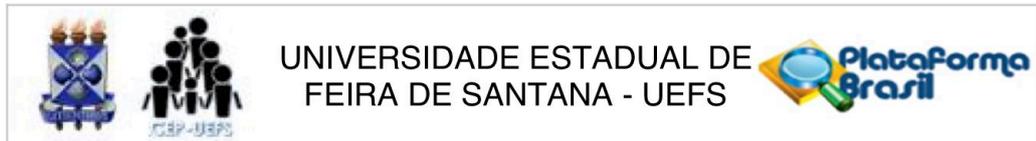
PRIMÁRIO: "Avaliar o potencial genotóxico de resinas acrílicas autopolimerizáveis utilizadas em Odontologia, por meio do uso do Teste de Micronúcleo em células esfoliadas da mucosa oral de indivíduos jovens e através do Ensaio do Cometa em profissionais ocupacionalmente expostos" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 03; Projeto completo, p. 05).

SECUNDÁRIOS: - Investigar a ocorrência de danos cromossômicos, traduzidos como micronúcleos, em células esfoliadas do epitélio oral de indivíduos em uso de dispositivos intra-orais confeccionados com resinas acrílicas;- Avaliar a ocorrência de alterações nucleares degenerativas indicadoras de necrose e apoptose em células esfoliadas do epitélio oral de indivíduos em uso de dispositivos intra-orais confeccionados com resinas acrílicas;- Estimar os danos ao DNA em linfócitos sanguíneos periféricos dos cirurgiões dentistas ocupacionalmente expostos a resinas acrílicas, pelo Teste Cometa.; Avaliar o potencial do Teste de micronúcleo como biomarcador de risco de câncer no biomonitoramento de indivíduos expostos às resinas acrílicas autopolimerizáveis" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 03; Projeto completo, p. 05).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: "Este estudo apresenta risco mínimo esperado, uma vez que o material destinado à análise citológica (Teste de Micronúcleos) será coletado através de raspagem gentil da mucosa oral com escova cytobrush. A coleta do sangue para aplicação do Teste do Cometa é uma coleta de rotina para exames laboratoriais. Após a realização da coleta, pode-se formar uma equimose (ficar um pouco roxo) ou ficar dolorido, mas o profissional que realizará o procedimento dispõe de meios para contornar esses efeitos indesejáveis. Podem ocorrer, durante e após a coleta, complicações como: punção acidental de uma artéria e infecção, as quais são evitadas através de medidas de

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 2.016.819

segurança, capacitação e treinamento do profissional" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 04).

"Durante a coleta de sangue do seu braço, você poderá sentir dor. A intensidade da dor varia entre cada indivíduo, porém é uma dor suportável. Quanto mais tranquilo (a) você estiver, menos doloroso será o procedimento. Após a coleta, pode-se formar uma equimose (ficar um pouco roxo) ou ficar dolorido, mas o profissional que realizará a coleta dispõe de meios para contornar esses efeitos indesejáveis. Podem ocorrer, durante e após a coleta, complicações como: punção acidental de uma artéria e infecção, as quais são evitadas através de medidas de segurança, capacitação e treinamento do profissional. O profissional está capacitado para contorná-las caso ocorram. [...] Este estudo apresenta risco mínimo esperado, uma vez que a coleta do seu sangue é semelhante àquela realizada quando você faz exame de sangue no laboratório. Será assegurado pelo pesquisador o direito ao ressarcimento por despesas tidas pelo participante e decorrentes da pesquisa" (TCLE/Dentistas).

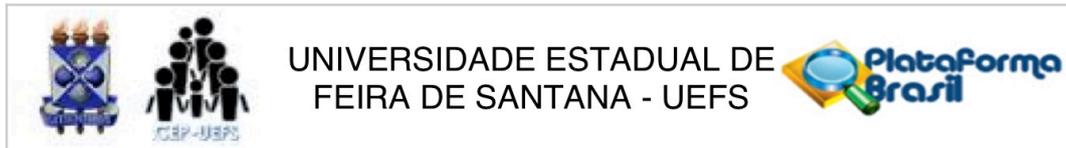
"Durante a coleta das células da mucosa da bochecha, o participante poderá sentir um leve desconforto, imediatamente resolvido com a retirada da escova e fechamento da boca. Será assegurado pelo pesquisador o direito ao ressarcimento por eventuais despesas tidas pelo participante relacionadas à pesquisa. Quaisquer danos eventualmente produzidos pela pesquisa serão também indenizados pelo pesquisador" (TCLE/Responsável).

"Como você ficará com a boca aberta, mesmo que por poucos instantes, poderá sentir um leve desconforto durante essa coleta. Caso ocorra tal desconforto, será suficiente pararmos a coleta e você fechar a boca por alguns segundos" (TALE).

BENEFÍCIOS: "Os benefícios deste estudo são oferecer um melhor conhecimento a respeito deste tema para informar os profissionais da Odontologia sobre o potencial genotóxico das resinas acrílicas; além de possibilitar a identificação de formas de monitorar pessoas expostas a este material" (Informações básicas/Plataforma Brasil, p. 04).

"Os benefícios deste estudo são oferecer um melhor conhecimento a respeito deste tema para informar aos profissionais da Odontologia sobre o potencial genotóxico das resinas acrílicas; além de possibilitar a identificação de formas de monitorar pessoas expostas às resinas acrílicas"

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 2.016.819

(TCLE/Dentistas).

"Os benefícios deste estudo são oferecer um melhor conhecimento a respeito deste tema para subsidiar os profissionais da Odontologia sobre o potencial genotóxico das resinas acrílicas; além de possibilitar a identificação de formas de monitorar pessoas expostas a elas" (TCLE/Responsável).

"Essa pesquisa vai oferecer um melhor conhecimento a respeito deste assunto para todos os dentistas e demais profissionais que trabalham com esses materiais" (TALE).

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é viável do ponto de vista ético, tem relevância social e científica. Aponta uma possibilidade de maior informação e avaliação sobre o potencial genotóxico de resinas acrílicas odontológicas tanto para os profissionais da Odontologia quanto às demais pessoas expostas, como os pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

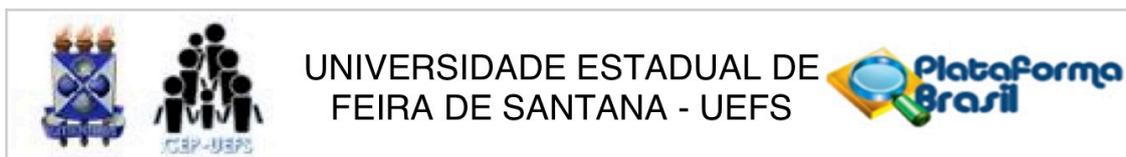
Protocolo completo, atendendo às exigências da Resolução 466/12. Foram anexadas os seguintes documentos:

- 1) Projeto completo;
- 2) TALE;
3. TCLE/Dentistas;
4. TCLE/Responsável;
5. Autorização do diretor do Departamento de Ciências Biológicas para realização da pesquisa;]
6. Autorização da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) para realização da pesquisa;
7. Folha de rosto;
8. Declaração da orientadora se comprometendo em observar a Resolução 466/12;
9. Instrumentos de coleta de dados;
10. Cronograma;
11. Orçamento.

Recomendações:

Recomenda-se explicitar a forma de retorno aos participantes da pesquisa, visto que é informado no TCLE e no TALE que "Os resultados estarão à sua disposição quando finalizados". Como o pesquisador fará para que os resultados sejam disponibilizados aos participantes?

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 2.016.819

Recomenda-se também a atualização do cronograma quanto à coleta de dados em virtude da aprovação do projeto pelo CEP-UEFS.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PROJETO APROVADO

Após o atendimento das pendências, o projeto está aprovado para execução, pois atende aos princípios bioéticos para pesquisa envolvendo seres humanos, conforme a Resolução nº 466/12 (CNS).

Considerações Finais a critério do CEP:

Tenho muita satisfação em informar-lhe que seu Projeto de Pesquisa satisfaz às exigências da Res. 466/12. Assim, seu projeto foi Aprovado, podendo ser iniciada a coleta de dados com os participantes da pesquisa conforme orienta o Cap. X.3, alínea a - Res. 466/12. Relembro que conforme institui a Res. 466/12, Vossa Senhoria deverá enviar a este CEP relatórios anuais de atividades pertinentes ao referido projeto e um relatório final tão logo a pesquisa seja concluída. Em nome dos membros CEP/UEFS, desejo-lhe pleno sucesso no desenvolvimento dos trabalhos e, em tempo oportuno, um ano, este CEP aguardará o recebimento dos referidos relatórios.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_772318.pdf	21/03/2017 22:30:41		Aceito
Outros	Oficio_resposta_pendencias.pdf	21/03/2017 22:30:08	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_JP_Corrigido.docx	21/03/2017 22:22:48	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_menores_UEFS.docx	21/03/2017 22:20:47	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_responsaveis_UEFS.docx	21/03/2017 22:14:25	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	Termo_de_consentimento_dentistas_UEFS.docx	21/03/2017 22:13:00	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS

Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460

UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA

Telefone: (75)3161-8067

E-mail: cep@uefs.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
FEIRA DE SANTANA - UEFS



Continuação do Parecer: 2.016.819

Ausência	Termo_de_consentimento_dentistas_UEFS.docx	21/03/2017 22:13:00	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacaopesquisa_UESB.pdf	21/03/2017 21:52:55	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacaopesquisa_UEFS.jpeg	21/03/2017 21:52:34	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_UEFS.pdf	21/03/2017 21:49:47	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_comprometimento_orientadora.JPG	21/12/2016 11:01:13	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_JP.docx	14/12/2016 10:40:10	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Outros	Questionario_crianças_micronucleos.pdf	14/12/2016 10:12:53	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Outros	Questionario_adultos_cometa.pdf	14/12/2016 10:12:04	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	12/12/2016 18:07:01	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	12/12/2016 18:06:03	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Participacao_Orientadora.jpeg	12/12/2016 17:59:42	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Nao_foi_iniciada.jpeg	12/12/2016 17:59:21	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_comprometimento.jpeg	12/12/2016 17:59:04	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoGentox_UEFS.jpeg	12/12/2016 17:57:36	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_dentistas.doc	12/12/2016 17:56:31	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_assentimento_menores.doc	12/12/2016 17:56:18	João Pedro Pedrosa Cruz	Aceito

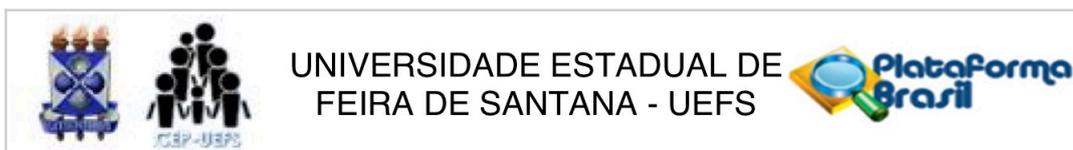
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br



Continuação do Parecer: 2.016.819

FEIRA DE SANTANA, 17 de Abril de 2017

Jean Marcel Oliveira Araujo

Assinado por:
JEAN MARCEL OLIVEIRA ARAUJO
(Coordenador)

Endereço: Avenida Transnordestina, s/n - Novo Horizonte, UEFS
Bairro: Módulo I, MA 17 **CEP:** 44.031-460
UF: BA **Município:** FEIRA DE SANTANA
Telefone: (75)3161-8067 **E-mail:** cep@uefs.br

Anexo II – instrução aos autores (Periódico Acta Odontologica Scandinavica)

Journal

Acta Odontologica Scandinavica >

This journal

Instructions for authors

Thank you for choosing to submit your paper to us. These instructions will ensure we have everything required so your paper can move through peer review, production and publication smoothly. Please take the time to read and follow them as closely as possible, as doing so will ensure your paper matches the journal's requirements. For general guidance on the publication process at Taylor & Francis please visit our [Author Services website](#).

AUTHORSERVICES
Supporting Taylor & Francis authors

SCHOLARONE MANUSCRIPTS™

This journal uses ScholarOne Manuscripts (previously Manuscript Central) to peer review manuscript submissions. Please read the [guide for ScholarOne authors](#) before making a submission. Complete guidelines for preparing and submitting your manuscript to this journal are provided below.

Contents

- [About the Journal](#)
- [Peer Review](#)
- [Preparing Your Paper](#)
 - [Structure](#)
 - [Word Limits](#)
 - [Style Guidelines](#)
 - [Formatting and Templates](#)
 - [References](#)
 - [Editing Services](#)

    [Subscribe](#) 

- [Disclosure Statement](#)
- [Clinical Trials Registry](#)
- [Complying With Ethics of Experimentation](#)
 - [Consent](#)
 - [Health and Safety](#)
- [Submitting Your Paper](#)
- [Data Sharing Policy](#)
- [Publication Charges](#)
- [Copyright Options](#)
- [Complying with Funding Agencies](#)
- [Open Access](#)
- [My Authored Works](#)
- [Reprints](#)

About the Journal

Acta Odontologica Scandinavica is an international, peer-reviewed journal publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

Acta Odontologica Scandinavica accepts the following types of article: original articles.

Peer Review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

Preparing Your Paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to](#)



Structure

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text introduction, materials and methods, results, discussion; acknowledgments; declaration of interest statement; references; appendices (as appropriate); table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

Word Limits

Please include a word count for your paper. There are no word limits for papers in this journal.

Style Guidelines

Please refer to these [quick style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling style consistently throughout your manuscript.

Please use single quotation marks, except where 'a quotation is "within" a quotation'. Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

Formatting and Templates

Papers may be submitted in Word or LaTeX formats. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

A [LaTeX template](#) is available for this journal. Please save the LaTeX template to your hard drive and open it, ready for use, by clicking on the icon in Windows Explorer.

If you are not able to use the template via the links (or if you have any other template queries) please contact us [here](#).



PLEASE USE THIS REFERENCE GUIDE WHEN PREPARING YOUR PAPER.

An [EndNote output style](#) is also available to assist you.

Taylor & Francis Editing Services

To help you improve your manuscript and prepare it for submission, Taylor & Francis provides a range of editing services. Choose from options such as English Language Editing, which will ensure that your article is free of spelling and grammar errors, Translation, and Artwork Preparation. For more information, including pricing, [visit this website](#).

Checklist: What to Include

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [requirements for authorship](#) is included as an author of your paper. All authors of a manuscript should include their full name and affiliation on the cover page of the manuscript. Where available, please also include ORCIDiDs and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. Should contain a structured abstract of 200 words. A structured abstract should cover (in the following order): Objective; Material and Methods; Results and Conclusions.
3. **Graphical abstract** (optional). This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .gif. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GraphicalAbstract1.
4. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming](#).
5. Between 3 and 5 **keywords**. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.



▼ *For single agency grants*

This work was supported by the [Funding Agency] under Grant [number xxxx].

For multiple agency grants

This work was supported by the [Funding Agency #1] under Grant [number xxxx]; [Funding Agency #2] under Grant [number xxxx]; and [Funding Agency #3] under Grant [number xxxx].

7. **Disclosure statement.** This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.](#)
8. **Data availability statement.** If there is a data set associated with the paper, please provide information about where the data supporting the results or analyses presented in the paper can be found. Where applicable, this should include the hyperlink, DOI or other persistent identifier associated with the data set(s). [Templates](#) are also available to support authors.
9. **Data deposition.** If you choose to share or make the data underlying the study open, please deposit your data in a [recognized data repository](#) prior to or at the time of submission. You will be asked to provide the DOI, pre-reserved DOI, or other persistent identifier for the data set.
10. **Geolocation information.** Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others. [More information.](#)
11. **Supplemental online material.** Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article.](#)
12. **Figures.** Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour, at the correct size). Figures should be supplied in one of our preferred file formats: EPS, PS, JPEG, GIF, or Microsoft Word (DOC or DOCX). For information relating to other file types, please consult our [Submission of electronic artwork](#) document.
13. **Tables.** Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
14. **Equations.** If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and](#)

    [Subscribe](#) 

Using Third-Party Material in your Paper

You must obtain the necessary permission to reuse third-party material in your article. The use of short extracts of text and some other types of material is usually permitted, on a limited basis, for the purposes of criticism and review without securing formal permission. If you wish to include any material in your paper for which you do not hold copyright, and which is not covered by this informal agreement, you will need to obtain written permission from the copyright owner prior to submission. More information on [requesting permission to reproduce work\(s\) under copyright](#).

Disclosure Statement

Please include a disclosure statement, using the subheading "Disclosure of interest." If you have no interests to declare, please state this (suggested wording: *The authors report no conflict of interest*). For all NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the declaration of interest statement. [Read more on declaring conflicts of interest](#).

Clinical Trials Registry

In order to be published in a Taylor & Francis journal, all clinical trials must have been registered in a public repository at the beginning of the research process (prior to patient enrolment). Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details in the methods section. The registry should be publicly accessible (at no charge), open to all prospective registrants, and managed by a not-for-profit organization. For a list of registries that meet these requirements, please visit the [WHO International Clinical Trials Registry Platform \(ICTRP\)](#). The registration of all clinical trials facilitates the sharing of information among clinicians, researchers, and patients, enhances public confidence in research, and is in accordance with the [ICMJE guidelines](#).

Complying With Ethics of Experimentation

Please ensure that all research reported in submitted papers has been conducted in an ethical and responsible manner, and is in full compliance with all relevant codes of experimentation and legislation. All papers which report in vivo experiments or clinical trials on humans or animals must include a written statement in the Methods section.



trials have been registered as legislation requires. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study follows the principles of the [Declaration of Helsinki](#).

Consent

All authors are required to follow the [ICMJE requirements](#) on privacy and informed consent from patients and study participants. Please confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves, that they acknowledge that they cannot be identified via the paper; and that you have fully anonymized them. Where someone is deceased, please ensure you have written consent from the family or estate. Authors may use this [Patient Consent Form](#), which should be completed, saved, and sent to the journal if requested.

Health and Safety

Please confirm that all mandatory laboratory health and safety procedures have been complied with in the course of conducting any experimental work reported in your paper. Please ensure your paper contains all appropriate warnings on any hazards that may be involved in carrying out the experiments or procedures you have described, or that may be involved in instructions, materials, or formulae.

Please include all relevant safety precautions; and cite any accepted standard or code of practice. Authors working in animal science may find it useful to consult the [International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics and Welfare](#) and [Guidelines for the Treatment of Animals in Behavioural Research and Teaching](#). When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in your paper, please specify this, or that the product is still investigational.

Submitting Your Paper

This journal uses ScholarOne Manuscripts to manage the peer-review process. If you haven't submitted a paper to this journal before, you will need to create an account in



If you are submitting in LaTeX, please convert the files to PDF beforehand (you will also need to upload your LaTeX source files with the PDF).

Please note that *Acta Odontologica Scandinavica* uses [Crossref™](#) to screen papers for unoriginal material. By submitting your paper to *Acta Odontologica Scandinavica* you are agreeing to originality checks during the peer-review and production processes.

On acceptance, we recommend that you keep a copy of your Accepted Manuscript. Find out more about [sharing your work](#).

Data Sharing Policy

This journal applies the Taylor & Francis [Basic Data Sharing Policy](#). Authors are encouraged to share or make open the data supporting the results or analyses presented in their paper where this does not violate the protection of human subjects or other valid privacy or security concerns.

Authors are encouraged to deposit the dataset(s) in a recognized data repository that can mint a persistent digital identifier, preferably a digital object identifier (DOI) and recognizes a long-term preservation plan. If you are uncertain about where to deposit your data, please see [this information](#) regarding repositories.

Authors are further encouraged to [cite any data sets referenced](#) in the article and provide a [Data Availability Statement](#).

At the point of submission, you will be asked if there is a data set associated with the paper. If you reply yes, you will be asked to provide the DOI, pre-registered DOI, hyperlink, or other persistent identifier associated with the data set(s). If you have selected to provide a pre-registered DOI, please be prepared to share the reviewer URL associated with your data deposit, upon request by reviewers.

Where one or multiple data sets are associated with a manuscript, these are not formally peer reviewed as a part of the journal submission process. It is the author's

    [Subscribe](#) 



Publication Charges

Authors will be charged \$95 for each published page in excess of 4 typeset pages.

Colour figures will be reproduced in colour in your online article free of charge. If it is necessary for the figures to be reproduced in colour in the print version, a charge will apply.

Charges for colour figures in print are £300 per figure (\$400 US Dollars; \$500 Australian Dollars; €350). For more than 4 colour figures, figures 5 and above will be charged at £50 per figure (\$75 US Dollars; \$100 Australian Dollars; €65). Depending on your location, these charges may be subject to local taxes.

Copyright Options

Copyright allows you to protect your original material, and stop others from using your work without your permission. Taylor & Francis offers a number of different license and reuse options, including Creative Commons licenses when publishing open access. [Read more on publishing agreements.](#)

Complying with Funding Agencies

We will deposit all National Institutes of Health or Wellcome Trust-funded papers into PubMedCentral on behalf of authors, meeting the requirements of their respective open access policies. If this applies to you, please tell our production team when you receive your article proofs, so we can do this for you. Check funders' open access policy mandates [here](#). Find out more about [sharing your work](#).

Open Access

This journal gives authors the option to publish open access via our [Open Select publishing program](#), making it free to access online immediately on publication. Many funders mandate publishing your research open access; you can check [open access funder policies and mandates here](#).



openaccess@tandf.co.uk if you would like to find out more, or go to our [Author Services website](#).

For more information on license options, embargo periods and APCs for this journal please go [here](#).

My Authored Works

On publication, you will be able to view, download and check your article's metrics (downloads, citations and Altmetric data) via [My Authored Works](#) on Taylor & Francis Online. This is where you can access every article you have published with us, as well as your [free eprints link](#), so you can quickly and easily share your work with friends and colleagues.

We are committed to promoting and increasing the visibility of your article. Here are some tips and ideas on how you can work with us to [promote your research](#).

Article Reprints

You will be sent a link to order article reprints via your account in our production system. For enquiries about reprints, please contact the Taylor & Francis Author Services team at reprints@tandf.co.uk.

Queries

Should you have any queries, please visit our [Author Services website](#) or contact us [here](#).

Updated 23-07-2018



Anexo III – instrução aos autores (Periódico American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics)

Submit Your Manuscript

 All Content [Advanced Search](#)

- | | | |
|---|---|--------------------------------------|
| General Information | Informed consent and patient details | Acknowledgments |
| Electronic manuscript submission and review | Submission | Artwork |
| BEFORE YOU BEGIN | Blinding | Tables |
| Ethics in publishing | Guidelines for Original Articles | References |
| Studies in humans and animals | Guidelines for Systematic Reviews | Video |
| Conflict of interest | Guidelines for Randomized Clinical Trials | Data visualization |
| Submission declaration and verification | Guidelines for Miscellaneous Submissions | Research data |
| Use of inclusive language | Checklist for Authors | Submission Checklist |
| Contributors | PREPARATION | Permissions |
| Changes to authorship | Double-blind review | AFTER ACCEPTANCE |
| Copyright | Article structure | Proofs |
| Role of the funding source | Essential title page information | Offprints |
| Open access | Abstract | AUTHOR INQUIRIES |

General Information

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* publishes original research, reviews, case reports, clinical material, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics.

Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and consultants and are subject to editorial revision. Authors should follow the guidelines below.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the Journal nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Electronic manuscript submission and review

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* uses the *Elsevier Editorial System (EES)*, an online manuscript submission and review system.

To submit or review an article, please go to the AJO-DO EES website: <http://ees.elsevier.com/ajodo>.

Rolf G. Behrents, Editor-in-Chief
E-mail: behrents@gmail.com

Send other correspondence to:
Chris Burke, Managing Editor
American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics
University of Washington
Department of Orthodontics, D-569
HSC Box 357446
Seattle, WA 98195-7446
Telephone (206) 221-5413
E-mail: ckburke@aol.com

**Before You Begin****Ethics in publishing**

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Conflict of interest

<https://www.ajodo.org/content/authorinfo>

19/03/2019

Information for Authors - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

Each author should complete and submit a copy of the International Committee of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflicts of Interest, available at <http://www.icmje.org/conflicts-of-interest/>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see ['Multiple, redundant or concurrent publication'](#) for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

The American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics offers authors a choice in publishing their research:

Traditional Access

- Articles are available at no additional cost to subscribers through individual or library subscriptions. Users in some developing countries and patient groups can access articles through our universal access programs.
- Other users can access articles on a pay-per-view basis.
- No publication fees are charged for traditional publication.

Open access

- Open access articles are available to subscribers and nonsubscribers, and to the wider public with permitted reuse.
- For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses.
- The open access publication fee for this journal is \$3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in

19/03/2019

Information for Authors - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

editor-author communications.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

Green open access embargo period

For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Blinding

The *AJO-DO* uses a blind review process; the identity of the author and the location of the research are concealed from the reviewers, and the identities of the reviewers are concealed from the author. The following submission items are sent to reviewers during the review process and should not contain any identifying information.

Manuscript * Figures * Tables * Other Material

The title page, which should contain complete author information, is not sent to reviewers. In the manuscript, please pay special attention to Material and Methods and Acknowledgments sections; wherever author is mentioned, use the "hidden" format in Word to conceal it, or move it to the title page.

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via EES: <http://ees.elsevier.com/ajodo>.

Before you begin, please review the guidelines below. To view a 7-minute video explaining how to prepare your article for submission, go to [Video on Manuscript Preparation](#).

- 1. Title Page.** Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers.
- 2. Abstract.** Structured abstracts of 250 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.
- 3. Manuscript.** The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units, whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the *AMA Manual of Style, 10th edition*. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.
- 4. Figures.** Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper) must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.
- 5. Tables.** Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source and include written permission for its use from the copyright holder. Submit tables as text-based files (Word is preferred, Excel is accepted) and not as graphic elements. Do not use colors, shading, boldface, or italic in tables. Do not submit tables as parts A and B; divide into 2 separate tables. Do not "protect" tables by making them "read-only." The table title should be put above the table and not as a cell in the table. Similarly, table footnotes should be under the table, not table cells.
- 6. Model release and permission forms.** Photographs of identifiable persons must be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author, and the legend must properly credit the source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.
- 7. Copyright release.** In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors: "The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript [insert title of article here] to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material." Scan the printed [copyright release](#) and submit it via EES.
- 8. Use the International Committee of Medical Journal Editors Form for the Disclosure of Conflict of Interest (ICMJE Conflict of Interest Form).** If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials,

19/03/2019

Information for Authors - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

9. *Institutional Review Board approval.* For those articles that report on the results of experiments of treatments where patients or animals have been used as the sample, Institutional Review Board (IRB) approval is mandatory. No experimental studies will be sent out for review without an IRB approval accompanying the manuscript submission.

Guidelines for Systematic Reviews

Systematic Reviews and Meta-Analyses must be prepared according to contemporary [PRISMA](#) (Preferred Reporting for Systematic Reviews and Meta-Analyses) standards. The *AJO-DO* will screen submissions for compliance before beginning the review process. To help authors understand and apply the standards, we have prepared a separate [Guidelines for AJO-DO Systematic Reviews and Meta-Analyses](#). This guide includes links to a [Model Orthodontic Systematic Review](#) and an accompanying [Explanation and Elaboration](#) document.

These guidelines are supplemental to the [Guidelines for Original Articles](#), which describe how to meet general submission requirements, such as figure formats, reference style, required releases, and blinding.

Systematic Review and Meta-Analysis Guide for Authors

You can access a link to an annotated example of a [Model Orthodontic Systematic Review](#). Further explanation of reporting practices is given in the accompanying [Explanation and Elaboration](#) document. These documents have been prepared in accordance with PRISMA guidelines and the "PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies that Evaluate Health Care Interventions: Explanations and Elaboration" (<http://www.plosmedicine.org/article/info:doi/10.1371/journal.pmed.1000100>).

However, we have made these guidelines more relevant to orthodontics and have adapted the reporting template to encourage transparent and pertinent reporting by introducing subheadings corresponding to established PRISMA items.

Further information on reporting of systematic reviews can also be obtained in the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions (<http://www.cochrane-handbook.org>).

Guidelines for Randomized Clinical Trials

Randomized Clinical Trials must meet current CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) requirements. The *AJO-DO* will screen submissions for compliance before beginning the review process. To help authors understand and apply the standards, we have prepared a separate document, [Guidelines for AJO-DO Submissions: Randomized Clinical Trials](#). This document contains links to an [Annotated RCT Sample Article](#) and [The CONSORT Statement: Application within and adaptations for orthodontic trials](#).

These guidelines are supplemental to the [Guidelines for Original Articles](#), which describe how to meet general submission requirements, such as figure formats, reference style, required releases, and blinding.

Guidelines for Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and their responses appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse between authors and our readers. Letters to the Editor must refer to an article that was published within the previous six (6) months and must be less than 500 words including references. Submit Letters via the EES Web site. Submit a signed copyright release with the letter.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is published occasionally as a Special Article. Submit Guest Editorials and Special Articles via the Web site.

Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending upon their interest and value to subscribers. Send books to Chris Burke, Department of Orthodontics, University of Washington D-569, HSC Box 357446, Seattle, WA 98195-7446. They will not be returned.

Checklist for Authors

___ Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author; brief description of each author's contribution to the submission; and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address

___ Highlights (up to 5 Highlights, written in complete sentences, 85 characters each)

___ Abstract (structured, 250 words; a graphical abstract is optional)

___ Manuscript, including references and figure legends

___ Figures, in TIF or EPS format

___ Tables

___ [Copyright release statement](#), signed by all authors

___ [Photographic consent statement\(s\)](#)

___ [ICMJE Conflict of interest statement](#) for each author

___ Permissions to reproduce previously published material

___ Permission to reproduce proprietary images (including screenshots that include a company logo)

**Preparation****Double-blind review**

This journal uses double-blind review, which means the identities of the authors are concealed from the reviewers, and vice versa. [More information](#) is available on our website. To facilitate this, please include the following separately:

Title page (with author details): This should include the title, authors' names, affiliations, acknowledgements and any Declaration of Interest statement, and a complete address for the corresponding author including an e-mail address.

Blinded manuscript (no author details): The main body of the paper (including the references, figures, tables and any acknowledgements) should not include any identifying information, such as the authors' names or affiliations.

Article structure

Introduction

Provide an adequate background so readers can understand the nature of the problem and its significance. State the objectives of the work. Cite literature selectively, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and Methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. If methods have already been published, indicate by a reference citation and describe only the relevant modifications. Include manufacturer information (company name and location) for any commercial product mentioned. Report your power analysis and ethics approval, as appropriate.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

Explain your findings and explore their significance. Compare and contrast your results with other relevant studies. Mention the limitations of your study, and discuss the implications of the findings for future research and for clinical practice. Do not repeat information given in other parts of the manuscript.

Conclusions

Write a short Conclusions section that can stand alone. If possible, refer back to the goals or objectives of the research.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A structured abstract using the headings Introduction, Methods, Results, and Conclusions is required for Original Article, Systematic Review, Randomized Controlled Trial, and Techno Bytes. An unstructured abstract is acceptable for Case Report and Clinician's Corner.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 x 1328 pixels (h x w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 x 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Acknowledgments

Collate acknowledgments in a separate section at the end of the article before the references; do not include them on the title page, as a footnote to the title page, or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (eg, providing help with language or writing assistance, or proofreading the article).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Artwork*Image manipulation*

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

*Electronic artwork**General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork](#).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References*Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambek W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g. after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference](#)

[management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/american-journal-of-orthodontics-and-dentofacial-orthopedics>
When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by superscript numbers in the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Sci Commun* 2010;16351-9.

Reference to a book:

2. Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*. New York: E-Publishing Inc; 2009. p. 281-304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51-9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.'

For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927-34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Submission Checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'

19/03/2019

Information for Authors - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Permissions

To use information borrowed or adapted from another source, authors must obtain permission from the copyright holder (usually the publisher). This is necessary even if you are the author of the borrowed material. It is essential to begin the process of obtaining permissions early; a delay may require removing the copyrighted material from the article. Give the source of a borrowed table in a footnote to the table; give the source of a borrowed figure in the legend of the figure. The source must also appear in the list of references. Use exact wording required by the copyright holder. For more information about permission issues, contact permissionshelpdesk@elsevier.com or visit <https://www.elsevier.com/about/policies/author-agreement/obtaining-permission>.

Permission is also required for the following images:

- Photos of a product if the product is identified or can reasonably be identified from the photo
- Logos
- Screenshots that involve copyrighted third-party material, whether a reasonably identifiable user interface or any nonincidental material appearing in the screenshot

**After Acceptance****Proofs**

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to [download the free Adobe Reader](#), version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the [Adobe site](#).

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via e-mail. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#).

**Author Inquiries**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

ELSEVIER Copyright © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved. | [Privacy Policy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Use of Cookies](#) | [About Us](#) | [Help & Contact](#) | [Accessibility](#)
The content on this site is intended for health professionals.

We use cookies to help provide and enhance our service and tailor content and ads. By continuing you agree to the [use of cookies](#).
Advertisements on this site do not constitute a guarantee or endorsement by the journal, Association, or publisher of the quality or value of such product or of the claims made for it by its manufacturer.