

U. PORTO



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

A genotoxicidade dos biomateriais em medicina dentária

Azize Roselene Barreto do Sacramento

ORIENTADOR

Professor Daniel Perez Mongiovi

Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

CO-ORIENTADORA

Professora Alexandra Sofia Pereira Teixeira

Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Julho de 2012



A genotoxicidade dos biomateriais em medicina dentária

Azize Roselene Barreto do Sacramento

ORIENTADOR

Professor Daniel Perez Mongiovi

Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

CO-ORIENTADORA

Professora Alexandra Sofia Pereira Teixeira

Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Índice

RESUMO	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO	6
MATERIAIS E MÉTODOS	8
DESENVOLVIMENTO.....	9
1. MÉTODOS DE ESTUDO DA GENOTÓXICIDADE	9
1.1 Métodos de avaliação da genotoxicidade <i>in vitro</i>	11
1.1.1 Testes que avaliam mutações génicas	11
1.1.1.1 Teste da mutação reversa bacteriana ou teste de Ames.....	11
1.1.1.2 Teste <i>in vitro</i> de mutações genéticas de células de mamíferos.....	12
1.1.2 Teste que avaliam as mutações cromossómicas	13
1.1.2.1 Teste das anomalias cromossómicas de células de mamíferos	13
1.1.2.2 Teste dos micronúcleos em células de mamíferos	13
1.2 Métodos de avaliação da genotoxicidade <i>in vivo</i>	14
1.2.1 Testes que detetam as mutações pontuais	14
1.2.1.1 Testes das mutações em células germinativas ou somáticas de roedores transgénicos (TGR)	14
1.2.2 Testes que avaliam as mutações cromossómicas	15
1.2.2.1 Teste das anomalias cromossómicas em células da medula óssea	15
1.2.2.2 Teste dos micronúcleos em eritrócitos de mamíferos	15
1.2.3 Testes que detetam danos primários no ADN	15
1.2.3.1 Teste cometa em células de mamíferos.....	15
1.2.3.2 Teste da síntese de ADN não programada em células do fígado	16
2. A GENOTÓXICIDADE DOS BIOMATERIAIS EM MEDICINA DENTÁRIA.....	16
2.1 A dentisteria e a genotoxicidade	16
2.2 Os metais dentários e a genotoxicidade.....	20
2.3 A endodontia e a genotoxicidade	23
2.4 O amálgama dentário	26
DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS.....	30
AGRADECIMENTOS.....	32

RESUMO

Na prática da medicina dentária recorre-se frequentemente ao uso de biomateriais, tais como resinas compostas, materiais endodônticos e aparelhos ortodônticos fixos, que podem permanecer em contacto íntimo com os tecidos orais por longos períodos de tempo. Por consequência, torna-se necessário verificar a biocompatibilidade e fazer uma avaliação do potencial tóxico destes materiais com os diferentes componentes da cavidade oral. É neste contexto que surge a necessidade de avaliar a genotoxicidade dos biomateriais dentários.

A genotoxicidade refere-se a identificação e estudo da ação de um agente físico, químico ou biológico que possa produzir qualquer tipo de dano no material genético. A sua avaliação é recomendada e regularizada através das normas ISO.

O objetivo desta monografia é fazer um levantamento das técnicas disponíveis para avaliar a genotoxicidade dos biomateriais dentários e realizar uma análise da sua aplicação na medicina dentária.

Material e métodos: Para a execução deste trabalho fez-se um levantamento de artigos científicos relacionados com o tema, publicados entre 2000 e 2012, utilizando o motor de pesquisa Pubmed.

Conclusão: Após a elaboração desta revisão bibliográfica é possível concluir que, existem poucos estudos relativamente a genotoxicidade dos materiais dentários e muitos deles apresentam resultados contraditórios.

Palavras-chaves: "genotoxicidade e biomateriais", "danos no ADN e biomateriais dentários", "Estratégias de avaliação da genotoxicidade", "Testes de genotoxicidade "

ABSTRACT

Biomaterials, such as composite resins, endodontic material and fixed orthodontic appliances, which may remain in intimate contact with the oral tissues for extended periods of time, are frequently used in dental practice. Consequently it is essential to develop biocompatibility studies and to evaluate the toxic potential of these materials with different components of the oral cavity. In this context, genotoxicity assessment of dental biomaterials becomes critical.

Genotoxicity refers to the identification and study of a physical, biological or chemical agent capable of producing damage to the genetic material. This evaluation is recommended and regulated by the ISO guidelines.

The purpose of this monograph is to survey the techniques available to evaluate the genotoxicity of dental biomaterials and make a critical analysis of its application in dentistry.

Material and methods: a survey of peer reviewed scientific papers related to the topic, published between 2000 and 2012, was performed. Pubmed web search engine was used for this purpose.

Conclusion: After the development of this literature review, we conclude that, there are not enough published studies on the genotoxicity of dental materials and many have contradictory results.

Key words: "genotoxicity and dental biomaterials "," ADN damage and dental biomaterials "," genotoxicity test strategies "," genotoxicity testing "

INTRODUÇÃO

Em medicina dentária recorre-se frequentemente ao uso de biomateriais, os quais permanecem na cavidade oral por longos períodos de tempo. Neste contexto surge a necessidade de verificar a biocompatibilidade e fazer uma avaliação do potencial tóxico destes materiais nas células da cavidade oral. Um dos efeitos tóxicos verifica-se a nível do ADN, assim sendo é fundamental avaliar o efeito genotóxico dos biomateriais dentários¹.

A genotoxicidade refere-se à identificação e estudo da ação de qualquer agente físico, químico ou biológico que possa produzir danos no material genético. Os testes de genotoxicidade fornecem uma indicação de alterações associadas ao ADN, incluindo mutação direta, replicação anormal do ADN, quebras no ADN ou anomalias mitóticas. Estes testes, que não detetam só a mutagenidade^a, mas também danos primários no ADN, que podem ou não ter carácter hereditário. Além disso, permitem ainda prever o potencial carcinogénico das substâncias avaliadas e contribuir para a compreensão do seu mecanismo de ação³.

Para uma avaliação adequada do potencial genotóxico das substâncias químicas, é necessário uma série de testes *in vitro*¹, uma vez que são muitas as alterações que podem causar danos no ADN³. Estes testes são utilizados para avaliar do risco de diferentes materiais, independentemente do nível (concentração, período e frequência) de exposição³. Os testes *in vitro* podem ser complementados ou substituídos por testes *in vivo*, em casos específicos: quando a informação disponível indica o envolvimento na ativação de uma via metabólica complexa, que não pode ser replicada por um sistema de ativação metabólica exógena; no caso da substância testada seja frequentemente utilizada¹. Além disso os testes *in vivo*, são necessários para confirmar se o efeito genotóxico observado *in vitro* é também observado *in vivo*¹. O teste *in vivo* é escolhido em função dos efeitos observados *in vitro*, tal como o conhecimento da biodisponibilidade, reatividade, metabolismo e os órgãos alvo específicos da substância³.

^a Mutagenicidade: indução de alterações transmissíveis na quantidade ou na estrutura do material genético de células ou organismos. Estas alterações podem envolver apenas 1 gene ou um segmento de genes ou cromossomas¹.

Se um teste *in vitro* der resultado negativo podemos concluir com uma certeza considerável de que a substância testada não tem potencial genotóxico nas condições do ensaio clínico. Contudo em caso de resultados negativos é necessário verificar se a substância atinge os tecidos alvo³. Por outro lado em caso de resultados inconclusivos, será apropriado efetuar-se novos testes.

Em caso de resultado positivo num primeiro teste *in vitro*, será adequado realizar mais testes de confirmação e para obter informações adicionais sobre os mecanismos de ação da substância testada³.

O avanço científico tem permitido o desenvolvimento de novas técnicas de avaliação da genotoxicidade que são úteis no desenvolvimento de diferentes biomateriais e na avaliação da sua segurança¹.

O objetivo desta monografia é fazer um levantamento das técnicas disponíveis para avaliar a genotoxicidade dos biomateriais dentários e a sua aplicação na medicina dentária.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi elaborado com base numa pesquisa de artigos em inglês ou português relacionados com o tema escolhido, publicados em revistas indexadas via web, com um intervalo de tempo desde 2000 até 2012.

Foi escolhido o motor de busca Pubmed para esta pesquisa. Também foram consultadas diretivas (EFSA, OECD e ISO) de algumas técnicas relacionadas com o tema em questão.

Apenas foram considerados artigos que relacionassem a genotoxicidade e os biomateriais dentários.

Utilizaram-se as palavras-chaves "genotoxicidade e biomateriais", "Danos no ADN e biomateriais dentários", "Estratégias de avaliação da genotoxicidade" e "Testes de genotoxicidade "

Com base nos critérios de inclusão foram considerados 53 artigos como base científica deste trabalho. Dos 53 artigos, foram selecionadas 24 artigos.

DESENVOLVIMENTO

1. MÉTODOS DE ESTUDO DA GENOTÓXICIDADE

Os métodos comumente usados para testar a genotoxicidade dividem-se em testes que avaliam mutações génicas (*in vitro e in vivo*), testes que avaliam as mutações cromossómicas (*in vitro e in vivo*) e testes que avaliam danos primários no ADN (*in vivo*). Atualmente os métodos utilizados para testar a genotoxicidade *in vitro* são: o teste da mutação reversa bacteriana (OECD TG 471) e o teste da mutação génica em células de mamífero (OECD TG 476), ambas para detetar a presença de mutações génicas. Utilizam-se o teste das anomalias cromossómicas de células de mamíferos (OECD473) e o teste dos micronúcleos em células de mamífero (OECD TG 487) para testar mutações cromossómicas³.

Destes quatro testes o teste da mutação reversa bacteriana ⁴ e o teste dos micronúcleos² são os testes mais utilizados *in vitro*³. Esta combinação de testes preenchem os requisitos básicos para cobrir os mecanismos alterações genéticas com um número mínimo de testes. O teste da mutação reversa bacteriana abrange as mutações génica, e o teste dos micronúcleos as anomalias cromossômicas estruturais³.

Como já referido anteriormente, em alguns casos os testes *in vitro* são complementados com testes *in vivo*, tais como, testes em células germinativas ou somáticas de roedores transgénicos (OECD TG 488) para investigação de mutações génicas, teste dos micronúcleos em eritrócitos de mamíferos (OECD TG 474) e teste das anomalias cromossómicas em células da medula óssea (OECD TG 475)³.

Dentro dos testes *in vivo* temos ainda testes que permitem detetar danos primários no ADN, são eles: o teste cometa e o teste da síntese de ADN não programado em células do fígado de mamíferos (OECD TG 486)³ (ver tabela I).

Tabela I – Classificação dos diferentes métodos de estudo da genotoxicidade ³				
Métodos de estudo da genotoxicidade	Meio de cultura	Tipo de Alteração	Testes disponíveis	Células testadas
	<i>in vitro</i>	Mutações génicas	Teste da mutação bacteriana reversa (Teste de Ames)	<i>Salmonella typhimurium</i> e <i>Eschericia coli</i>
			Teste das mutações de genicas	células de linfomas de ratos (L5178Y), células de hamsters chineses (CHO,CHO-AS52 e V79), células linfoblastóides humanas(TK6)
		Mutações cromossómicas	Teste das anomalias cromossómicas	Células de mamíferos
			Teste dos micronúcleos	
	<i>in vivo</i>	Mutações génicas	Testes das mutações em células germinativas ou somáticas de roedores transgénicos (TGR)	Células germinativas e somáticas de roedores transgénicos
		Mutações cromossómicas	Teste das aberrações cromossómicas	Eritrócitos de mamíferos
			Testes dos micronúcleos	Células da medula óssea de mamíferos
		Danos primários no ADN	Teste Cometa	
			Teste da síntese de ADN não programado	Células do fígado de mamíferos

1.1 Métodos de avaliação da genotoxicidade *in vitro*^b

1.1.1 Testes que avaliam mutações génicas

1.1.1.1 Teste da mutação reversa bacteriana ou teste de Ames

O Teste da mutação bacteriana reversa é geralmente empregue como uma triagem inicial para a avaliação de atividade genotóxica e, em particular, para a atividade indutora de mutações génicas. Existe uma base de dados em que muitos produtos químicos testados com resultado positivos neste ensaio, apresentam uma atividade mutagénica noutros ensaios de genotoxicidade o que prova a fiabilidade deste teste⁴.

O teste da mutação reversa bacteriana é rápido, barato e relativamente fácil de executar³. Muitas das estirpes de ensaio têm características que as tornam mais sensíveis para a deteção de mutações, incluindo locais na sequências de ADN suscetíveis de inversão, aumento da permeabilidade celular de macromoléculas e eliminação ou aumento da suscetibilidade a erros dos sistemas de reparação do ADN⁴. A especificidade das estirpes utilizadas pode fornecer informações uteis sobre os tipos de mutações que são induzidas pelos agentes genotóxicos^{3,4}.

O teste da mutação reversa bacteriana ou teste de Ames (OECD TG 471)⁴ utiliza estirpes de *Salmonella typhimurium*^{3,4} e *Eschericia col*³. Estas bactérias possuem mutações em loci específicos, que impossibilitam a biossíntese de determinados aminoácidos, como por exemplo a histidina. Bactérias que não sintetizam a histidina, só proliferam em meios de cultura suplementados com este aminoácido⁴. Quando essas bactérias mutantes são submetidas à ação de um agente mutagénico, o genótipo his- poderá ser revertido⁴. Em caso positivo, algumas células revertem e passam a proliferar e a formar colónias. A reversão indica que existem alterações nos codões, isto permite à célula bacteriana sintetizar o aminoácido e multiplicar-se. Este teste tipicamente deteta e diferencia a substituição de uma base, de uma alteração na grelha de leitura⁴.

^b Todos os testes *in vitro* referidos deverão ser conduzidos com ou sem um sistema de ativação apropriado. O sistema mais comumente utilizado é o cofator-suplementado S9 preparado a partir do fígado de roedores.¹

1.1.1.2 Teste *in vitro* de mutações genéticas de células de mamíferos

O teste de mutações num gene de células de mamíferos (OECD TG 476) permite detetar substituição de bases, mutações na grelha de leitura, grandes deleções e recombinações mitóticas^{3,5}. São comumente utilizadas células de linfomas de ratos (L5178Y), células de hamsters chineses (CHO, CHO-AS52 e V79) e células linfoblastóides humanas (TK6). Este teste permite detetar diferentes tipos de mutações com base nos loci timidina quinase (*tk*), hipoxantina-guanina fosforribosil-transferase (*hprt*) e o transgene da xantina-guanina fosforribosil (*xprt*)^{3,5}.

No caso da timidina quinase, as células do linfoma de rato L5178Y são heterozigóticas para este gene. Os mamíferos normalmente possuem duas cópias, mas esta linhagem possui apenas uma cópia (TK+/TK-). A timidina quinase é uma enzima não essencial que permite à célula utilizar uma rota metabólica alternativa para incorporar a timidina no ADN. A trifluorotimidina (TFT) é um análogo da timidina que quando incorporado no ADN, ao invés da timidina, provoca a inibição do metabolismo celular e impede divisão da célula. No entanto, se uma cópia da TK é perdida por uma mutação, o TFT não é metabolizado, não sendo assim tóxico, permitindo o crescimento de colónias. As células mutantes são capazes de proliferar na presença de TFT, enquanto células normais, com timidina quinase, não o são⁵.

A frequência de mutação é determinada inoculando um número conhecido de células num meio contendo o agente seletivo (o análogo tóxico de determinada base) para as células mutantes, e num meio sem agente seletivo para determinar a viabilidade (capacidade de proliferação das células). Depois de um tempo de incubação apropriado, as colónias são contadas. A frequência de mutação é calculada a partir do número de colónias mutantes em meio seletivo e do número de colónias em meio não selectivo^{3,5}.

Este teste é utilizado para o controlo de eventuais agentes mutagénicos e carcinogénicos em mamíferos. Embora muitos dos compostos que dão resultados positivos no presente ensaio são carcinogénicos, não há uma correlação perfeita entre o ensaio e a carcinogenicidade, uma vez que existem carcinogénicos que atuam por mecanismos não genotóxicos ou não detetáveis nestas células.

1.1.2 Teste que avaliam as mutações cromossômicas

1.1.2.1 Teste das anomalias cromossômicas de células de mamíferos

O teste das anomalias cromossômicas de células de mamíferos (OECD TG 473), deteta alterações numéricas (poliploidias) e estruturais cromossômicas causadas pela substância teste, em linhas celulares previamente definidas ou culturas de células primárias^{3,6}.

Este teste exige uma análise cuidadosa e demorada, contudo é ainda um dos métodos mais robustos para avaliar danos no material genético. Este teste baseia-se na observação em microscopia da morfologia do material biológico de interesse^{3,6}.

Para obter informações adicionais, o teste tende a ser complementado com as técnicas de microscopia, hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e *chromosome painting*^{3,6}.

1.1.2.2 Teste dos micronúcleos em células de mamíferos

O teste dos micronúcleos permite identificar danos estruturais e numéricos nos cromossomas que tenham sofrido divisão durante ou após a exposição a substância teste^{2,3}.

Os micronúcleos no citoplasma das células na interfase podem ser originários de fragmentos do cromossoma acêntricos (isto é, sem centrómero) ou cromossomas inteiros que não são capazes de migrar para os polos durante a anáfase durante a divisão celular³.

O teste dos micronúcleos permite detetar um eventual aumento no número dos micronúcleos no citoplasma das células em interfase, expostas aos produtos químicos que se pretendem testar. O ensaio deteta a atividade de produtos químicos clastogénicos^c e aneugénicos^d em células que tenham sido submetidos a divisão celular, após exposição à substância de ensaio. O desenvolvimento da metodologia de bloqueio da citocinese, por adição do inibidor da polimerização da actina, citocalasina B, durante a mitose, permite a identificação e análise seletiva da frequência de

^c Agente clastogénico: agentes que causam anomalias estruturais nos cromossomas

^d Agente aneugénico (indução de aneuploidia) agentes que causam alterações de número de cromossomas na célula, pode resultar em ganho ou perda (aneuploidia).

micronúcleos em células que tenham completado uma divisão celular; estas células apresentam-se binucleadas. Contudo este teste poderá ser feito quer na presença como na ausência de citocalasina B^{2,3}.

Este teste é rápido e fácil de ser efetuado e é o único teste que permite detetar agentes aneugénicos e clastogénicos^{2,3}.

1.2 Métodos de avaliação da genotoxicidade *in vivo*^e

1.2.1 Testes que detetam as mutações pontuais

1.2.1.1 Testes das mutações em células germinativas ou somáticas de roedores transgénicos (TGR)

Os testes de mutação de genes em roedores transgénicos (TGR) recorrem ao uso de ratos transgénicos que contêm várias cópias de um plasmídeo ou fago integrado contendo transgenes associados a genes repórter, que permitem identificar mutações génicas e rearranjos cromossómicos. O TGR deteta mutações induzidas em marcadores génicos neutros (genes sem qualquer consequência no animal) recuperados de diferentes tecidos do animal. As mutações que aparecem no roedor são detetadas e o transgene recuperado. Posteriormente o transgene é analisado em um hospedeiro bacteriano deficiente para o gene repórter^{3,7} e confirmada a mutação.

Os modelos de roedores transgénicos respondem aos agentes mutagénicos de um modo semelhante aos genes endógenos e são apropriados para a identificação de mutações génicas, mas não para grandes deleções^{3,7}.

^e Todos os testes *in vivo*, só são adequados se a substância teste conseguir chegar as células alvo, por isso é crucial garantir este aspeto antes de se partir para testes *in vivo*.

1.2.2 Testes que avaliam as mutações cromossómicas

1.2.2.1 Teste das anomalias cromossómicas em células da medula óssea

Este teste é igual ao teste das anomalias cromossómicas *in vitro* (1.1.2.1), alterando-se apenas as células utilizadas. Neste caso as células utilizadas são as células da medula óssea de mamíferos, sendo usado preferencialmente roedores^{3,8}.

1.2.2.2 Teste dos micronúcleos em eritrócitos de mamíferos

Este teste segue os mesmos princípios que o teste dos micronúcleos *in vitro* (1.1.2.2), alterando-se só as células utilizadas. Neste caso utilizam-se amostras de eritrócitos da medula óssea e amostras de reticulócitos do sangue periférico, normalmente de roedores^{3,9}.

Este teste tem sido vastamente utilizado, podendo ser empregue noutros tipos de celulares ou tecidos^{3,9}.

1.2.3 Testes que detetam danos primários no ADN

1.2.3.1 Teste cometa em células de mamíferos

O teste cometa baseia-se na deteção de danos no ADN, que se traduzem na sua fragmentação. Este efeito é detetado por eletroforese, que permite a separação dos fragmentos genéticos do núcleo de acordo com seus tamanhos, a partir de um lisado celular. O padrão migratório formado pelos fragmentos de ADN é parecido à cauda de um cometa¹⁰. Sendo que quanto maior for a cauda, maior é a fragmentação^{3,10}.

Por ser simples, sensível, versátil, rápido e económico, é frequentemente empregue para avaliar a genotoxicidade³.

1.2.3.2 Teste da síntese de ADN não programada em células do fígado

Este ensaio *in vivo* fornece informação sobre os efeitos genotóxicos de produtos químicos no fígado. O objetivo é detetar danos no ADN e a subsequente reparação em células do fígado^{3,11}. O fígado é normalmente o principal local de metabolismo dos compostos absorvidos, sendo apropriado para medir *in vivo* os danos no ADN. Porém este teste pode ser utilizado noutros tipos celulares^{3,11}.

A síntese de ADN não programada (UDS) é medida pela determinação da incorporação de nucleótidos marcados em células que já replicaram o seu ADN. A técnica mais amplamente utilizada é a determinação da adição de timidina marcada com trítio (3H-TdR) por autoradiografia. Fígados de rato são preferencialmente utilizados para testes *in vivo* UDS^{3,9}.

A deteção da UDS é dependente do número de bases de ADN excisadas e substituídas no local do dano. Portanto, o teste UDS é particularmente válido para a deteção de grandes reparações por excisão (20-30 bases). Em contraste, o teste apresenta uma sensibilidade baixa na deteção de "reparação de cadeias curtas" (1-3 bases)^{3,11}.

No entanto, os eventos mutagénicos podem resultar de uma reparação ineficiente ou inexistente, ou uma manutenção de lesões do ADN e a extensão da resposta UDS não dá qualquer indicação da fidelidade do processo de reparação. Contudo a falta de especificidade sobre a atividade mutagénica do teste UDS é compensada pela sensibilidade deste parâmetro, uma vez que ele é usado em todo o genoma^{3,11}.

2 A GENOTOXICIDADE DOS BIOMATERIAIS EM MEDICINA DENTÁRIA

2.1 A dentisteria e a genotoxicidade

O desenvolvimento das técnicas de adesão entre os biomateriais e a estrutura dentária permitiu a aplicação de novas técnicas restauradoras. O sucesso clínico desses materiais depende não só das suas características físicas e químicas, mas também na

sua segurança biológica. A matriz orgânica dos materiais dentários resinosos foi reconhecida como fonte de componentes libertados para a cavidade oral, como os monómeros não polimerizados e outros componentes, que causam uma variedade de efeitos adversos ^{11,12}.

Dimetacrilato trietilenoglicol (TEGDMA), um monómero da matriz das resinas, especialmente usada em adesivos dentinários (30-50%)¹¹. Foi descrito como sendo o principal composto lixiviável a partir da resina menos polimerizada, o que causou preocupação pública para quaisquer efeitos adversos biológicos do material¹¹. Entre 30 químicos diferentes, o monómero 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) e o co-monómero TEGDMA também foram detetados na cavidade oral. Embora as concentrações libertadas sejam consideradas subtóxicas, são o suficiente para produzir efeitos prejudiciais, tais como modificação da resposta inflamatória e da hemóstase dos tecidos pulpares^{11,12}. A investigação sobre a citotoxicidade e a genotoxicidade das resinas *in vitro* tem-se limitado à caracterização de alterações funcionais nas células, tais como danos na membrana celular, inibição da atividade enzimática, inibição na síntese de proteínas, RNA, ADN e alterações metabólicas após tratamento com resinas. Após a descoberta de que bisfenol A-diglicidil dimetacrilato (BIS-GMA) e bisfenol A (BPA) eram capazes de mimetizar hormonas esteroides naturais, levantou-se a possibilidade das resinas causarem problemas de saúde mais graves ^{11,12}. Atualmente a quantidade destes componentes foi reduzida em produtos comerciais como compósitos e selantes. Contudo, o mecanismo celular e molecular subjacente a genotoxicidade e a citotoxicidade contínua desconhecido¹¹.

Existem diferenças entre o potencial genotóxico e os diferentes monómeros dimetacrilatos. Algumas evidências indicam que o Bis-GMA provoca danos no ADN, uma vez que se obteve resultado positivo no teste da inibição da síntese de ADN na presença de Bis-GMA. Por outro lado níveis elevados de HEMA produziram um aumento na frequência dos micronúcleos. Os resultados dos testes efetuados no TEGDMA, permitiram concluir uma relação de causa e efeitos mutagénicos dose-dependentes em culturas de células, aumento dos níveis de mutação genica, formação de micronúcleos e quebra das cadeias de ADN (o que é evidente no teste cometa).

Para além do referido, TEGDMA é responsável por um espectro de mutações no gene *hprt*, como por exemplo deleções nas sequências dos exões¹¹.

Atualmente existem duas hipóteses para a formação de danos no ADN pelo TEGDMA e outros monómeros. Segundo a via de adição de Michael¹¹. A primeira hipótese afirma que o espectro de mutações induzidas pelo TEGDMA são similares a aquelas causadas nas células após exposição a raios X e outros agentes químicos. O grupo carbonilo dos acrilatos e metacrilatos adjacentes a uma ligação dupla de carbono-carbono podem funcionar como grupos aceitadores eletrões. Consequentemente, o β -carbono de ligação dupla que têm carga positiva, reage com os centros nucleofílicos de moléculas como ADN e proteínas¹¹. A relação estrutura/atividade dos metacrilatos e acrilatos são consistentes com a adição de Michael. O TEGDMA é uma molécula funcional com dois locais para a adição de Michael, visto que os α e β -carbono insaturados são alvos de ataque por parte dos nucleófilos, que consequentemente resulta na formação ligação cruzada com cadeias de ADN¹¹. A segunda hipótese consiste na formação de danos no ADN com base na geração de radicais livres de oxigénio (espécies reativas de oxigénio ou ROS), que causam um efeito semelhante ao observado em células expostas a radiação ionizante¹¹. As espécies reativas de oxigénio, são a principal causa de danos no ADN por mecanismo endógeno, uma vez que estes são responsáveis pela oxidação das bases de ADN e quebra das cadeias de ADN^{11,13}.

A morte celular é controlada por vários mecanismos dentro das células, incluindo o desequilíbrio entre radicais livres produzidas endógena e exogenamente, e o sistema de proteção anti-oxidante¹¹. A fonte primária de radicais livres são as mitocôndrias, enzimas do citocromo P450 e peroxissomas¹¹. Contudo estas espécies também são produzidas exogenamente, como resultado da exposição à luz ultravioleta, radiação ionizante e outros agentes ambientais¹¹. Os radicais livres estão associados a diferentes tipos de doenças, assim sendo o organismo têm um conjunto de mecanismos de regulação das ROS no organismo. Estes mecanismos consistem no uso de moléculas não enzimáticas antioxidantes, como a glutathione, e moléculas de atividade enzimáticas, tais como a superóxido dismutase, tioredoxina redutase, glutathione peroxidase¹, glutathione redutase, catalase^{11,12}.

A glutathione tem um papel importante no processo de proteção e desintoxicação do organismo contra os efeitos nocivos dos radicais livres¹¹. A depleção do *pool* de glutathione no organismo pelo TEGDMA contribui em muito para a citotoxicidade deste monómero¹¹. Para além disso, este monómero contribui também para a produção de radicais livres e consequente toxicidade dos fibroblastos gengivais e pulpares. Moléculas antioxidantes como N-acetilcistina (NAC), ascorbato e trolox® (vitamina E solúvel em água) previnem os danos no ADN produzidos pelo TEGDMA e o HEMA¹¹ que demonstra que o efeito oxidante destes monómeros¹¹.

Níveis elevados de ROS também podem ativar um conjunto de macromoléculas em resposta ao stress oxidativo, como o fator de transcrição, fator nuclear KappaB (NF-κB)¹¹. Supõe-se que o NF-κB é ativado para contrariar a apoptose induzida pelo HEMA. A apoptose induzida pelo TEGDMA tem sido associada a inibição de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), pertencente a via de sinalização de sobrevivência celular^{10,11}. Embora os mecanismos que levam à morte celular, à genotoxicidade e ao atraso no ciclo celular ainda não estejam completamente esclarecidos, os monómeros resinosos são capazes de alterar as funções das células da cavidade oral. A regulação da hemóstase celular, dentinogênese ou a reparação tecidual possivelmente são modificados por monómeros a concentrações subtóxicas (Tabela II)^{11,12,13}.

Recentemente descobriu-se que a canfoquinona, iniciador em sistemas de resina fotopolimerizada, é capaz de produzir danos no ADN através da produção de ROS. Espécies antioxidantes, tais como a glutathione e concentrações elevadas de NAC, reduzem os danos causados pelas ROS^{14,15}.

Tabela II-Dados sobre a genotoxicidade dos monómeros elaborados com base no artigo de Schweikl H. *et al.* 2005.

Monómero	Testes efetuados	Resultados
TEGDMA	<ul style="list-style-type: none"> • Teste dos micronúcleos • Teste Cometa • Teste das mutações génicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da frequência de micronúcleos • Quebras de ADN • Aumento de mutações no gene <i>Hprt</i> • Atraso no ciclo celular nas fases G1 e G2
HEMA	<ul style="list-style-type: none"> • Teste dos micronúcleos 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da frequência de micronúcleos
Bis-GMA	<ul style="list-style-type: none"> • Teste da inibição da síntese de ADN • Teste da mutação génica 	<ul style="list-style-type: none"> • Genotoxicidade positiva • Genotoxicidade negativa
Metil metacrilato (MMA), uretano dimetilmacrilato ¹⁵ (UDMA),	<ul style="list-style-type: none"> • Teste da mutação génica 	<ul style="list-style-type: none"> • Genotoxicidade negativa

2.2 Os metais dentários e a genotoxicidade

Ligas metálicas, como por exemplo as ligas de titânio, são amplamente utilizadas na medicina dentária moderna para restaurações, pinos, e aparelhos ortodônticos removíveis e permanentes. Estudos anteriores indicam que estes dispositivos metálicos podem causar reações adversas nos tecidos locais da cavidade oral, tais como gengivite/periodontite¹⁶.

Postula-se que a gravidade de tais alterações depende do metal, do seu estado químico e da sua concentração. Os componentes metálicos e micropartículas de metal fundido foram identificados na placa bacteriana adjacentes e nos tecidos gengivais. Tal deve-se a existência de muitos eventos corrosivos na cavidade oral. Os metais utilizados são expostos a muitas agressões físico-químicas, tais como concentrações elevadas de oxigénio e iões cloreto misturados na saliva, tártaro, placa bacteriana e ácidos produzidos pelo depósito de metabolitos microbianos. Estudos atuais têm demonstrado que estes materiais são libertados nos primeiros 4 ou 5 meses da terapia ortodôntica, são absorvidos pelos pacientes e sofrem distribuição sistémica^{17,18}.

Verificou-se que a concentração urinária de platina aumenta significativamente imediatamente após a inserção de coroas, pontes, ou restaurações telescopicamente fabricadas de ligas de metal nobre¹⁷. Três meses após a cimentação, a concentração de titânio puro na urina continua significativamente elevada. Contudo não foi encontrado um aumento dos níveis de o ouro ou paládio na urina¹⁷.

Além do referido, a maior parte dos aparelhos compostos por ligas metálicas fundidas são menos biocompatíveis, na versão fundida do que na versão pura, na qual foram testados por contacto direto com as culturas celulares¹⁷.

Um aparelho ortodôntico consiste em bandas e brackets, e ambos são compostos por aço inoxidável e arcos de níquel-titânio. Os metais são o constituinte com mais características nocivas nos aparelhos ortodônticos, visto que a maior parte dos metais são carcinogénicos para os animais. Estes metais podem permanecer na boca dos pacientes por 2 anos ou mais¹. Os constituintes mais comuns dos aparelhos dentários atualmente são o cobalto, crómio e o níquel e outros metais em percentagens diferentes¹⁸.

A quantidade mesurável de metal libertada pelos aparelhos ortodônticos na saliva e no sangue, são consideravelmente menores às quantidades de metal adquiridas na alimentação, ou seja dificilmente atingem concentrações tóxicas. Embora os metais libertados pelos aparelhos ortodônticos não tenham efeitos nos níveis gerais de metal no organismo, concentrações subtóxicas poderão ser suficientes para induzir efeitos biológicos em células da mucosa oral¹⁸.

O potencial genotóxico foi demonstrado em alguns sistemas, embora o mecanismo subjacente a este fenómeno ainda se encontre por descobrir. Contudo foram apresentadas algumas hipóteses, das quais se destacam: a interação dos metais diretamente com o ADN (formação de ligações cruzadas), geração de danos no ADN por via de stress oxidativo, interferência com o mecanismo de reparação do ADN e a interferência com a replicação do ADN¹⁷.

Foi descoberto que a concentração de metal na cavidade oral de pacientes com aparelho fixo é maior do que aqueles que não usam aparelho fixo, sendo os

metais mais predominantes o níquel e o cobalto. Nestes pacientes também foi possível detetar uma diminuição na viabilidade das células, quando em comparação com os indivíduos do grupo de controlo¹⁴. Quer o níquel, quer o cobalto induzem efeitos biológicos adversos: alta frequência na fragmentação do ADN de células e apoptose em células de pacientes sujeitos a terapia ortodôntica. Verificou-se uma correlação positiva entre a concentração de cobalto e número de células com ADN fragmentado e células apoptóticas encontradas. Resultados similares verificaram-se para o níquel¹⁷.

Em virtude das suas propriedades químicas, físicas, mecânicas, e da sua excelente resistência à corrosão e boa biocompatibilidade, o titânio (Ti) é atualmente o melhor material e mais utilizado no fabrico de implantes dentários osteointegrados¹⁷.

Um passo crítico para o sucesso clínico de um implante é o processo conhecido como osteointegração^f, a aposição direta do tecido ósseo no material implantado. Este processo está facilitado em implantes biocompatíveis, como o titânio, que deverá promover a osteointegração, impedindo que o tecido em contacto com o material sofra qualquer tipo de e resposta adversa, tais como inflamação, carcinogenicidade ou genotoxicidade^{18,19}.

Os implantes de titânio são conhecidos por libertar partículas de titânio por processos corrosivos, favorecendo o aumento de radicais livres e conseqüentemente o *stress* oxidativo das células circundantes. Um estudo de Ribeiro *et al* 2007, em que se avaliou a genotoxicidade do titânio unicamente com o teste cometa, não se encontrou qualquer tipo de efeito genotóxico²⁰. Em contrapartida, no estudo efetuado por Tavares *et al* 2009, com o objetivo de avaliar o potencial genotóxico de uma nova superfície de titânio, foram realizados o teste cometa, o teste das aberrações cromossômicas, e o teste dos micronúcleos com o bloqueio da citocinese em células CHO-K1. Os resultados demonstram que a superfície de titânio não tratada causou um aumento significativo do número de quebras cromossômicas, células com anomalias cromossômicas (tetraploidias), bem como um aumento da frequência de micronúcleos, e outras alterações nucleares¹⁹.

^f **Osteointegração** é a união estável e funcional entre o osso e uma superfície de titânio. Este fenómeno ocorre após a inserção de peça em titânio dentro do osso e a migração das células ósseas para a superfície deste metal

Tabela III- Iões metálicos e os seus efeitos genotóxicos		
Iões metálicos	Aplicação em medicina dentária	Efeitos genotóxicos e citotóxicos
Titânio ^{16,18,19}	Implantes, restaurações, Pinos, aparelhos ortodônticos removíveis e fixos.	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento do nº de quebras cromossômicas, • Aumento no número de células com anomalias cromossômicas (tetraploidias), • Aumento da frequência de micronúcleos,
Níquel ¹⁸	Aparelhos ortodônticos	<ul style="list-style-type: none"> • Alta frequência na fragmentação do ADN de células e apoptose em células de pacientes
Cobalto ¹⁸	Aparelhos ortodôntico	<ul style="list-style-type: none"> • Alta frequência na fragmentação do ADN de células e apoptose em células de pacientes
Crómio ¹⁶	Aparelho ortodôntico e outros dispositivos metálicos	<ul style="list-style-type: none"> • Modulação de resposta imune

2.3 A endodontia e a genotoxicidade

Os materiais comumente utilizados em endodontia, permanecem em contacto com a cavidade oral por um longo período de tempo, e alguns desses materiais são capazes de exercer uma atividade nociva no material genético (ver tabela 1). O óxido de zinco²¹ e a gutta percha²², são materiais muito utilizados como obturadores nos tratamentos endodônticos. Testes efetuados com estes materiais concluíram que não induzem danos no ADN de células do carcinoma oral *in vitro*. Contudo, obturadores de canais constituídos por resina epoxi (AH26® e AHplus®) mostraram um aumento dose-dependente da genotoxicidade, através da quebra das cadeias de ADN¹.

Relativamente aos agentes antimicrobianos, os fibroblastos da polpa dentária, quando expostos a compostos fenólicos não apresentaram quebra das cadeias de ADN¹. Contudo, esta mesma substância é capaz de provocar a síntese não programada de ADN, dependendo da concentração utilizada, em células de embrião de hamster sírio (SHE)¹². Com os testes efetuados em formocresol, paramonoclorofenol e hidróxido de cálcio, usados como desinfetante canal, permitiram constatar que estas substâncias induzem danos no ADN em células de linfoma de rato e fibroblastos humanos, porém investigações mais recentes provaram que o uso destes agentes desinfetantes em concentrações de 20 , 40 e 80 µg/ml não produzem quebras nas cadeias de ADN²⁰.

Muitos materiais utilizados em endodontia são agentes antimicrobianos e desinfetantes, por vezes integrados nos biomateriais endodônticos para esse efeito. Se indicam de forma resumida na tabela os dados referentes a sua genotoxicidade²⁰.

Tabela IV- Dados sobre a genotoxicidade dos materiais endodônticos					
Células alvo	Teste de genotoxicidade utilizado	Material testado	Resultados	Autor	Ano
Bactéria	<i>In vitro</i> com ativação metabólica (teste de Ames)	AH plus (obturador de canal composto por resina epoxi)	Genotoxicidade positiva: quebra das cadeias de ADN e aumento dose-dependente da genotoxicidade	Camargo <i>et al</i>	2009
Fibroblastos de polpa humana	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Compostos fenólicos	Genotoxicidade positiva	Chang <i>et al</i>	2000
Carcinoma escamoso da cavidade oral	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Obturadores de canal compostos por óxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio, resinas epoxy	Genotoxicidade negativa	Huang <i>et al</i>	2001

V79	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Obturadores de canal compostos por resina e óxido zinco e eugenol	Genotoxicidade positiva	Tai <i>et al</i>	2002
Ligamento periodontal humano	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Obturadores de canal compostos por Oxido de zinco e eugenol, hidróxido de cálcio,	Genotoxicidade positiva	Huang <i>et al</i>	2002
Astrocitos	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Obturadores de canal, resinas epóxi	Genotoxicidade positiva	Huang <i>et al</i>	2002
Fibroblastos de células da pele e linfoma de rato	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica (ensaio cometa)	Formocresol, paramonoclorofenol, hidróxido de cálcio	Genotoxicidade negativa	Ribeiro <i>et al</i>	2004
Linfoma de rato	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Trióxido mineral agregado e cimento de portland	Genotoxicidade negativa	Ribeiro, DA	2005
Linfócitos humanos	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Trióxido mineral agregado e cimento de portland	Genotoxicidade negativa	Braz <i>et al</i>	2006
Ovário de hamster chinês (CHO)	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Formocresol, paramonoclorofenol, hidróxido de cálcio	Genotoxicidade negativa	Ribeiro <i>et al</i>	2005
Ovário de hamster chinês (CHO)	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Trióxido mineral agregado e cimento de portland	Genotoxicidade negativa	Ribeiro <i>et al</i>	2006
Ovário de hamster chinês (CHO)	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Trióxido mineral agregado	Genotoxicidade negativa	Ribeiro <i>et al</i>	2006
Linfócitos humanos	<i>In vitro</i> sem ativação metabólica	Formocresol, paramonoclorofenol, hidróxido de cálcio	Genotoxicidade negativa	Silva <i>et al</i>	2007

2.4 O amálgama dentário

O amálgama dentário foi reconhecido como o material restaurador mais resistente e duradouro em medicina dentária até hoje. Apesar das boas propriedades de dureza, o teor de mercúrio (Hg) tem vindo a diminuir ao longo dos anos no amálgama, consequentemente aumentando a segurança do mesmo^{21,23}. Até ao momento, apesar de existirem relatos da genotoxicidade de compostos de Hg, a genotoxicidade dos amálgamas dentários permanece em grande parte desconhecida²⁰, sendo a investigação nesta área de grande interesse para as empresas que comercializam estes produtos^{21,22}.

Num estudo efetuado por *Akiyama et al.* (2001) com o objetivo de investigar a genotoxicidade de Hg libertado de amálgamas dentários, foi possível concluir que a amálgama do tipo convencional induz aberrações cromossómicas e o amálgama com níveis elevados de cobre também induz aberrações cromossómicas²³. Os efeitos em humanos do Hg em concentrações baixas ainda não são claros²³.

Outro estudo efetuado por *Hassam et al.* (2010) tinha como o objetivo de identificar o efeito genotóxico do amálgama dentário usando o teste da mutação reversa bacteriana. Neste estudo, obtiveram-se resultados negativos nos testes efetuados, o que demonstrava que os materiais de ensaio não apresentavam atividade mutagénica. Considerou-se assim que o amálgama dentário não possuía efeitos genotóxicos²⁴.

DISCUSSÃO/ CONCLUSÃO

Neste trabalho efetuou-se uma revisão de técnicas utilizadas na avaliação da genotoxicidade em materiais dentários. Tendo em conta que os biomateriais são amplamente usados na prática clínica da medicina dentária, é importante garantir a segurança na utilização destes materiais. Componentes derivados dos materiais têm demonstrado provocar alterações genéticas nas células. Estas alterações estão associadas a efeitos nocivos na saúde, mesmo quando o organismo é exposto a baixas concentrações destes compostos. Mutações em células somáticas para além de poderem causar cancro, se causadas em proto-oncogenes (genes supressores tumorais e genes responsáveis pela reparação de danos no ADN), também podem ser responsáveis por uma variedade de doenças genéticas. Alguns estudos têm relacionado a acumulação de danos no ADN das células somáticas com a presença de determinadas doenças degenerativas^{1,2}.

A importância clínica de identificar o potencial genotóxico dos materiais tem vindo a ser cada vez mais enfatizada³. Os testes de genotoxicidade podem ser definidos como um conjunto de testes *in vivo* e *in vitro* designados para detetar componentes que induzem danos genéticos, (mutações génicas, quebra de cromossomas e alterações na capacidade de reparação do cromossoma) e têm ganho uma aceitabilidade generalizada como um importante e útil indicador de carcinogenicidade³. Com base na literatura, há um consenso no que diz respeito aos efeitos genotóxicos dos monómeros TEGDMA e HEMA. Sendo o TEGDMA o principal composto lixiviável a partir da resina menos polimerizada, os estudos têm-se centrado mais em caracterizar os seus efeitos genotóxicos e em formular hipóteses sobre possíveis mecanismos inerentes a estes efeitos. Como referido no desenvolvimento deste trabalho o TEGDMA produz um aumento na frequência de micronúcleos, o que indica a presença de aberrações cromossómicas e, paralelamente, poder induzir mutações génicas. Estes resultados relacionam-se com um mecanismo de desequilíbrio do balanço de espécies reativas que conduz a oxidação de bases de ADN e apoptose, por uma alteração nas vias de sinalização de sobrevivência celular. A genotoxicidade das resinas nem sempre se traduz em apoptose. Outro mecanismo subjacente a estes efeitos seria a formação de ligações cruzadas entre o TEGDMA e o ADN. Casos de

genotoxicidade têm sido referidos para várias concentrações dos monómeros de resina.

O conhecimento sobre os mecanismos de interação biológica entre os metais libertados e os tecidos orais ou sistêmicos é ainda muito pouco consensual. Têm sido testados diferentes dispositivos metálicos utilizados em medicina dentária, e avaliados os efeitos da libertação por corrosão de determinados iões metálicos. Alguns dispositivos são constituídos por diferentes metais, importa portanto esclarecer se existem efeitos sinérgicos ou antagonistas entre os diferentes iões libertados.

Pode-se ainda especular que os iões metálicos induzem reações alérgicas locais que podem ser confundidos com reações inflamatórias. Está comprovado o efeito genotóxico de dispositivos metálicos ricos em cobalto e níquel¹⁵. Contudo ainda existem muitos resultados contraditórios relativamente à segurança do titânio¹⁵.

Contudo, ainda há pouca informação disponível sobre os efeitos de ligas metálicas e metais individuais nos microrganismos. Portanto, uma alta prioridade deve ser dada a clarificação das seguintes questões: a determinação de iões metálicos libertados de dispositivos dentários metálicos *in vivo*; o desenvolvimento de testes *in vitro*, em particular "ensaios de longo prazo", que simulem melhor as interações biológicas dos componentes metálicos *in vivo*; determinação dos efeitos subcelulares dos iões metálicos individuais e combinações clinicamente relevantes destes catiões que são determinantes para a sua biocompatibilidade, e clarificação dos efeitos das ligas de fundição e iões metálicos em microrganismos.

No que diz respeito aos materiais endodônticos é possível constatar a presença de efeitos genotóxicos em materiais frequentemente usados na prática clínica, tais como o óxido de zinco e eugenol e as resinas epóxi²¹.

Embora já se tenham efetuado numerosas investigações para avaliar a genotoxicidade dos diferentes biomateriais, os mecanismos subjacentes à genotoxicidade continuam, nalguns casos, por esclarecer. Existem ainda alguns biomateriais que não foram testados e documentados na literatura. Agentes exógenos podem mudar o ADN celular, em conjunto com outros componentes. Neste sentido é

útil saber como e em que extensão, os compostos endodônticos antimicrobianos podem ter efeitos sinérgicos ou antagonistas com as genotoxinas ambientais.

O amálgama dentário tem sido alvo de muita especulação relativamente à sua segurança. Embora seja reconhecido há muito o efeito genotóxico do mercúrio, ainda não se sabe se as quantidades utilizadas no amálgama dentário são seguras²⁵.

REFERÊNCIAS

1. Ribeiro D; Do endodontic compounds induce genetic damage? A comprehensive review; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:251-6
2. OECD/OCDE; OECD guideline for the testing of chemicals. In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test © OECD, 2010
3. EFSA Scientific Committee; Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed assessment; *EFSA Journal* 2011;9(9):2379
4. Guideline for testing of chemicals. Bacterial Reverse Mutation Test© OECD, 1997
5. *OECD/OCDE Epub*; OECD GUIDELINE for the testing of chemicals. *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test© OECD, 1997
6. OECD guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating guideline 473 In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test© OECD, 2012
7. OECD guideline for the testing of chemicals. Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays© OECD, 2011
8. OECD guideline for the testing of chemicals. Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test © OECD, 2012
9. OECD Test Guideline 474 Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test © OECD, 1997
10. Kleinsasser NH, Schmid K, Sassen AW, Harréus UA, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl FX. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials*. 2006;27(9):1762-70
11. OECD guideline for the testing of chemicals. Unscheduled ADN Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* © OECD, 1997
12. Schweikl H, Spangnuolo G., Schmalz G. Genetic and Cellular Toxicology of dental resin monomers. *J Dent Res* 2006; 85(10): 870-877
13. Schweikl H,Hiller K, Bolay C,Kreissl M.,Kreishmann W, Nusser A, Steinhauser S, Wieczorek J, Vasold R, Schmaltz G; Cytotoxic and mutagenic effect of dental composite materials. *Biomaterials* 2005; 26 :1713-1719

14. Poplawski T, Loba K, Pawlowska E, Szczepanska J, Blasiak J. Genotoxicity of urethane dimethacrylate, a tooth restoration component. *Toxicol In Vitro*. 2010 ;24(3):854-62.
15. Lee DH, Lim BS, Lee YK, Ahn SJ, Yang HC. Involvement of oxidative stress in mutagenicity and apoptosis caused by dental resin monomers in cell cultures. *Dent Mater*. 2006 ;22(12):1086-92.
16. Nomura Y., Teshima W. Kawahara,T., Tanaka N., Ishibashi H., Okazaki M., Arizono K.Genotoxicity of dental resin polymerization initiators *in vitro*. *Journal of materials science: materials in medicine* 2006; 17 29-32
17. Geurtsen W. Biocompatibility of dental casting alloys. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(1):71-84
18. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso M; *In vivo* Study on metal release from fixed orthodontic appliances and ADN damage in oral mucosa cells; *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:687-94
19. Tavares JC, Cornélio DA, da Silva NB, de Moura CE, de Queiroz JD, Sá JC, AlvesC Jr, de Medeiros SR. Effect of titanium surface modified by plasma energy source on genotoxic response in vitro. *Toxicology*. 2009;262(2):138-45.
20. Ribeiro D, Matsumoto M, Padovan L, Marques M, Salvadori D;Genotoxicity of Corrosion Eluates Obtained From Endosseous Implants. *Implant Dent* 2007;16:101–109
21. Brzovic V, Miletic I, Zeljezic D, Mladinic M, Kasuba V, Ramic S, Anic I. In vitro genotoxicity of root canal sealers *Int Endod J*. 2009; 42(3):253-63.
22. Huang TH, Yang JJ, Li H, Kao CT. The biocompatibility evaluation of epoxy resin-based root canal sealers in vitro. *Biomaterials*. 2002;23(1):77-83.
23. Hassan A. Omar A. Ariffin Z. An in vitro genotoxicity study of silver amalgam on Ames test . *The Indonesian J Dent Res*, 2010, Volume 1, No.1
24. Akiyama M, Oshima H, Nakamura M. Genotoxicity of mercury used in chromosome aberration tests. *Toxicol In Vitro*. 2001;15(4-5):463-7.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não representa apenas o resultado de horas de pesquisa, mas também reflexão e trabalho elaborado durante as diversas etapas que a constituem. É igualmente o culminar de um objetivo académico a que me propus e que não seria possível sem a ajuda de um número considerável de pessoas.

O primeiro agradecimento tem de ir, forçosamente, para os meus pais. Sem o amor, carinho e todo o apoio que sempre me deram ao longo dos anos possivelmente não estaria aqui. Além, de todo o seu apoio, eles sempre me disponibilizaram o necessário para que o meu aproveitamento escolar fosse o mais proveitoso possível.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Daniel Pérez, pela sua ajuda na elaboração desta monografia, pela paciência demonstrada ao longo do trabalho perante as minhas falhas, pela sua grande disponibilidade, fazendo horas extra para me auxiliar durante esta jornada da minha vida.

Não poderia também deixar de agradecer a minha co-orientadora Professora Alexandra Teixeira que auxiliou gentilmente o Professor Daniel na minha orientação e na disponibilidade dispensada para possíveis dúvidas.