



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA**  
**EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL**

**MICHELE DE SAMPAIO SOUSA**

**AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA IRRADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA NÃO  
IONIZANTE EMITIDA POR UM FOTOPOLIMERIZADOR EMISSOR DE DIODO DE  
LUZ SOBRE OS DENTES DE *Rattusnorvegicus***

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2020**

MICHELE DE SAMPAIO SOUSA

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA IRRADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA NÃO  
IONIZANTE EMITIDA POR UM FOTOPOLIMERIZADOR EMISSOR DE DIODO DE  
LUZ SOBRE OS DENTES DE *Rattus norvegicus*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde

Orientador: Prof.Dr. Antônio Luiz Martins  
Maia Filho

FORTALEZA – CEARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Biblioteca

Sousa, Michele de Sampaio.  
AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA IRRADIAÇÃO  
ELETROMAGNÉTICA NÃO IONIZANTE EMITIDA POR UM  
FOTOPOLIMERIZADOR  
EMISSOR DE DIODO DE LUZ SOBRE OS DENTES  
DE *Rattus norvegicus* [recurso eletrônico] / Michele  
de Sampaio Sousa. - 2020  
Um arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico  
com 76 folhas.

Dissertação (mestrado profissional) -  
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de  
Veterinária,  
Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde  
Humana e Animal, Fortaleza, 2020.  
Área de concentração: Biotecnologia em Saúde..  
Orientação: Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia  
Filho.

1. Fotopolimerizado. 2. Genotoxicidade. 3.  
Ensaio cometa. 4. Micronúcleo. 5. Radiação não  
ionizante. I. Título.

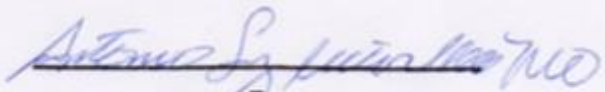
MICHELE DE SAMPAIO SOUSA

AVALIAÇÃO GENOTÓXICA DA IRRADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA NÃO IONIZANTE EMITIDA POR UM FOTOPOLIMERIZADOR EMISSOR DE DIODO DE LUZ SOBRE OS DENTES DE *Rattus norvegicus*


Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 31 de julho de 2020.

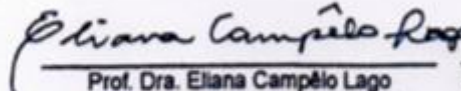
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Antônio Luís Martins Maia Filho  
(Orientador)  
Universidade Estadual do Piauí



Prof. Dr. Fabrício Pires de Moura do Amaral  
Universidade Estadual do Piauí- UESPI



Prof. Dra. Eliana Campêlo Lago  
Universidade Estadual do Maranhão -  
UEMA

Aos meus pais: Raimundo Nonato e  
Francisca Rita.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, queria agradecer a Deus e à minha família pelo apoio incondicional na realização para o término dessa pesquisa. Mas agradeço, principalmente, ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho, pela oportunidade dada para a realização deste trabalho. E, acima de tudo, por sua amizade.

A todos que direta ou indiretamente ajudaram na realização desta pesquisa.

“Que o nosso dia seja repleto daquilo que nos faça bem”.

(Clarice Lispector)

## RESUMO

O aparelho fotopolimerizador é um instrumento imprescindível na prática clínica do cirurgião – dentista, sendo responsável em garantir o sucesso das restaurações dentárias. Na literatura, existem poucos estudos avaliando a existência de efeitos genotóxicos causados pelo uso da luz emitida pelos aparelhos fotopolimerizadores de Diodo Emissor de Luz(LED) sobre os tecidos biológicos como a pele e os olhos do profissional ou do paciente, que entram em contato com essa luz. Objetivo: Neste estudo avaliamos os efeitos genotóxicos em *Rattus norvegicus* relacionados aos diferentes tempos de exposição ao uso do fotopolimerizador de diodo emissor de luz. Métodos: Neste estudo utilizamos 120 ratos norvegicus (60 machos e 60 fêmeas) provenientes do Biotério da Universidade Estadual do Piauí. Os ratos foram divididos em três grupos: controle positivo, controle negativo e grupos experimentais de exposição não ionizante ao aparelho fotopolimerizador de LED, nos tempos de 40 segundos, 10 minutos e 7 minutos e meio. Na avaliação da genotoxicidade, os ratos receberam exposições de luz do aparelho fotopolimerizador de diodo emissor de luz (LED) nos tempos de 40 segundos(dose de tempo representada pelo paciente), 10 minutos( primeira dose de tempo representada pelo cirurgião – dentista) e 7 minutos e meio(segunda dose de tempo representada pelo cirurgião – dentista), enquanto os controles negativos e positivos foram tratados com água destilada por via intraperitoneal(50mg/kg) e ciclofosfamida, respectivamente. Uma amostra de sangue periférico foi coletada dos animais para a realização do Ensaio do Cometa. E foi coletada a medula óssea de cada rato para realizar o teste de micronúcleo. Resultados: Foi observado que nos testes cometa e micronúcleo, os animais expostos ao tempo de 10 minutos ao LED apresentaram danos genotóxicos. E que nos tempos de 40 segundos e 7 minutos e meio, em nenhum desses tempos apresentaram algum grau de toxicidade nos testes realizados de genotoxicidade e que no controle negativo com o uso da água destilada não foram observados nenhum dano genotóxico. Conclusões: Por meio dos testes, a luz que é emitida pelo aparelho de fotopolimerizador de LED no tempo de 10 minutos houve a presença de efeitos genotóxicos. E nos tempos de 40 segundos e 7 minutos e meio, não se observaram efeitos genotóxicos, sendo esses tempos seguros ao uso pelo profissional cirurgião – dentista nos seus atendimentos clínicos.

**Palavras-chaves:** Fotopolimerizador. Genotoxicidade. Ensaio cometa. Micronúcleo. Radiação não ionizante.



## ABSTRACT

The light - curing device is an essential instrument in the clinical practice of the dentist, being responsible for ensuring the success of dental restorations. In the literature, there are few studies evaluating the existence of the genotoxic effects caused by the use of the light emitted by the Light Emitting Diode (LED) photopolymerizing devices on biological tissues such as the skin and the eyes of the professional or the patient, which come into contact with that light. Objective: In this study, we evaluated the genotoxic effects in *Rattus norvegicus* related to the different exposure times to the use of the light-emitting diode photopolymerizer. Methods: In this study, we used 120 *Rattus norvegicus* rats (60 males and 60 females) from the vivarium of the State University of Piauí. The rats were divided into three groups: positive control, negative control and experimental groups of non-ionizing exposure to the LED light-curing device, in 40 seconds, 10 minutes and 7 and a half minutes. In the evaluation of genotoxicity, the rats received light exposures from the light-emitting diode (LED) photopolymerizing device in 40 seconds (time represented by the patient), 10 minutes (first time represented by the dentist) and 7 and a half minutes (second dose of time represented by the dentist), while the negative and positive controls were treated with distilled water intraperitoneally (50mg \ kg) and cyclophosphamide, respectively. A peripheral blood sample was collected from the animals for the Comet Assay. And bone marrow was collected from each rat to perform the micronucleus test. Results: It was observed that in the comet and micronucleus tests, animals exposed to the LED for 10 minutes showed genotoxic damage. And that in the times of 40 seconds and 7 and a half minutes, none of these times showed any degree of toxicity in the genotoxicity tests performed and that in the negative control with the use of distilled water, no genotoxic damage was observed. Conclusions: Through the tests, the light that is emitted by the LED photopolymerizer device in 10 minutes there was the presence of genotoxic effects. And in the times of 40 seconds and 7 and a half minutes, no genotoxic effects were observed, and these times are safe for use by the professional dentist in his clinical care.

**Keywords:** Light curing. Genotoxicity. Comet assay. Micronucleus. Non-ionizing radiation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 –</b>	<b>Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio cometa.....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 2 –</b>	<b>Animais expostos ao fotopolimerizador de LED.....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 3 –</b>	<b>Fotomicrografia de cometas e Processamento pelo software OpenComet. Análise de 100 cometas por indivíduos expostos.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 4 –</b>	<b>Sequência de procedimentos para confecção das lâminas no Teste de Micronúcleo.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 5 –</b>	<b>Imagem obtida por microscopia óptica na objetiva de 100x mostrando a presença de micronúcleo nas setas.....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6 –</b>	<b>Registros dos comprimentos da cauda e as porcentagens de DNA na cauda, após análise do software OpenComet dos animais tratados respectivamente, com ciclofosfamida(50mg\kg), água destilada, e exposições ao fotopolimerizador de 40 segundos, 10 minutos e 7 minutos e meio.....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 7 –</b>	<b>Média de micronúcleos encontrados em 2.000 eritrócitos policromáticos após exposição aguda e exposição crônica, dos animais tratados respectivamente, com ciclofosfamida (50mg\kg), água destilada, e exposições ao fotopolimerizador de 40 segundos, 10 minutos e 7 minutos e meio.....</b>	<b>41</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FD	Frequência de Danos
ID	Índice de Danos
LED	Diodo Emissor de Luz
UESPI	Universidade Estadual do Piauí
PCEs	Micronúcleos em Eritrócitos Policromáticos
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Nm	Nanômetros
FBS	Soro fetal bovino
RPM	Rotação por minuto
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
NR	Norma Regulamentadora
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Aparelhos Fotopolimerizadores.....</b>	<b>14</b>
2.1.1	Aparelhos fotopolimerizadores à base de Diodo Emissor de Luz(LED): Funcionamento Físico.....	17
2.1.2	Radiação Eletromagnética ou Campos Eletromagnéticos.....	19
<b>2.2</b>	<b>Molécula de DNA(Ácido Desoxirribonucléico).....</b>	<b>20</b>
<b>2.3</b>	<b>Genotoxicidade e a Ciclofosfamida.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4</b>	<b>Biomarcadores da Genotoxicidade.....</b>	<b>24</b>
2.4.1	Teste do Cometa .....	24
2.4.2	Teste do Micronúcleo .....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Procedimentos Éticos.....</b>	<b>33</b>
<b>4.2</b>	<b>Animais e Local da Pesquisa.....</b>	<b>33</b>
<b>4.3</b>	<b>Aplicação do Diodo Emissor de Luz .....</b>	<b>34</b>
<b>4.4</b>	<b>Preparo das Amostras .....</b>	<b>35</b>
4.4.1	Ensaio do Cometa .....	35
4.4.2	Teste do Micronúcleo .....	37
<b>4.5</b>	<b>Organização e Análise dos Dados .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>
	<b>APÊNDICE A – ARTIGO .....</b>	<b>60</b>
	<b>ANEXO 4 – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS .....</b>	<b>75</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aparelho fotopolimerizador é um instrumento imprescindível na prática clínica do cirurgião-dentista, sendo responsável em garantir o sucesso das restaurações dentárias. A fotopolimerização consiste na ativação da reação de polimerização de material resinoso quando exposto a uma fonte de luz e inicia-se por meio da absorção de luz a partir de um fotoiniciador, geralmente a canforoquinona (OLIVEIRA, 2014).

A canforoquinona é o fotoiniciador presente na maioria das resinas compostas disponíveis no mercado, capaz de absorver a energia dentro do comprimento de onda específico da luz e inicia o processo de polimerização. A polimerização das resinas compostas fotoativadas por luz visível começa quando a canforoquinona é exposta a uma luz com um comprimento de onda variando entre 450 a 500 nanômetros(nm) e absorve fótons de forma a entrar em estado reativo (FRANCO, 2007; CAMPREGHER, 2003).

Os aparelhos fotopolimerizadores se diferenciam pelo tipo de fonte de luz utilizada, variação no intervalo de comprimento de onda, tipo de pulso e intensidade de luz (SOARES, 2005). A luz é medida em comprimentos de onda e expressa em unidades de nanômetros. Os comprimentos de ondas frequentemente designados de acordo com sua cor associada como por exemplo: a cor azul varia de 400-700 nm, a cor verde varia de 470-550nm e a cor vermelha varia de 630-700nm e o infravermelho varia de 700-1200nm. Em geral, quanto maior o comprimento de onda mais profundo é a penetração tecidual (GONÇALVES, 2010).

No procedimento odontológico a fotopolimerização é muito importante, sendo assim muitos fatores podem influenciar no sucesso ou insucesso dos materiais resinosos na cavidade bucal (ASSIS, 2014). O processo de fotoativação do fotopolimerizador depende da irradiação ( $mW/cm^2$ ) emitida pela fonte de luz e o tempo de exposição. Os materiais odontológicos que não recebem energia suficiente de densidade de energia, o grau de conversão monomérico será baixo resultando em um possível aumento da citotoxicidade, assim como a redução da dureza e o módulo de elasticidade (GUIRALDO *et al.*, 2014).

A identificação e o estudo da ação de um agente físico, químico ou biológico que possam produzir qualquer tipo de dano no material genético refere-se a genotoxicidade. Os testes de genotoxicidade fornecem uma indicação de alterações

associadas ao Ácido Desoxirribonucleico (DNA), quebras no DNA ou anomalias mitóticas (BARRETO, 2012).

Existe dificuldade de se obter na literatura informações sobre os efeitos toxicológicos causados pelo uso da luz emitida pelos aparelhos fotopolimerizadores de diodo emissor de luz (LED) sobre os tecidos biológicos como a pele e os olhos do profissional ou do paciente, que entram em contato com essa luz. No entanto os dentistas devem estar cientes de que a radiação absorvida pelas substâncias endógenas e exógenas que se acumulam nos olhos e pele dos operadores (mãos), bem como nas mucosas orais dos pacientes, podem causar várias reações fototóxicas e fotoalérgicas (PETROUCIC *et al.*, 2004).

Os trabalhadores da área da saúde estão expostos aos mesmos riscos (químicos, físicos e ergonômicos) a que se sujeitam os demais trabalhadores brasileiros. Nos últimos anos aconteceram mudanças no conceito de comportamentos de riscos o que exigiu alterações nos protocolos operacionais padrão, em relação à biossegurança do profissional de saúde, com a finalidade de estabelecer as diretrizes básicas para a implementação de medidas de proteção à segurança e à saúde dos trabalhadores (BRASIL, 2011; NERI *et al.*, 2015).

Diante desta perspectiva, levando em consideração o interesse da verificação da interação da luz sobre o órgão dental do paciente e das mãos e olhos do profissional odontólogo no atendimento clínico. O objetivo desse artigo foi avaliar a ocorrência de alterações genotóxicas através da luz emitida pelo aparelho fotopolimerizador de diodo emissor de luz em diferentes períodos de tempo e procurar estabelecer um tempo mínimo necessário de exposição à luz para o não aparecimento de toxicidade utilizando os testes de cometa e micronúcleo. Sendo assim a hipótese dessa pesquisa é que o aparelho fotopolimerizador de diodo emissor de luz provoca uma ação genotóxica em *Rattus norvegicus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aparelhos Fotopolimerizadores

Com o avanço tecnológico na Odontologia, acompanhado do aumento da exigência estética, foram desenvolvidos materiais restauradores capazes de reproduzir com grande precisão as características dentárias, tais como cor, forma, textura e função. A resina composta, material que reúne a maioria dessas propriedades, também sofreu grandes modificações ao longo do tempo, passando de um sistema quimicamente ativado para um sistema de polimerização iniciada pela luz visível, na qual a ativação da canforoquinona produz radicais livres resultantes de sua reação com grupos amina (CAMPREGHER, 2003; WUNDERLICH JUNIOR *et al.*, 2009; BRUZINGA *et al.*, 2014; OLIVEIRA, 2014).

As primeiras resinas que foram lançadas apresentavam polimerização química com base na mistura de duas pastas, uma denominada pasta base e a outra pasta catalisadora. Mas diante das desvantagens quanto à manipulação e aos resultados clínicos insatisfatórios apresentados por estas, foram inevitáveis o surgimento de outros produtos em que a polimerização poderia ser controlada pelo profissional. E assim surgiram as resinas compostas fotopolimerizáveis, cuja polimerização ocorre com base em uma radiação gerada por uma fonte de luz (PETROUVIC *et al.*, 2004).

Com o surgimento das resinas compostas e conseqüentemente sua utilização no consultório odontológico tem originado preocupações acerca da utilização dos fotopolimerizadores. Além das resinas compostas, os adesivos, primers, alguns selantes e cimentos reagem mediante o processo de fotopolimerização, emitindo assim a radiação não – ionizante. O fotopolimerizador originariamente usava a luz ultravioleta e recentemente a maioria passou a utilizar a luz azul, entre 400 e 500nm. Os raios ultravioletas podem causar catarata e problemas de retina, especialmente quando utilizados na faixa de frequência entre 320 a 400 nm (MANDEL, 1993).

O aparelho fotopolimerizador é um instrumento imprescindível para garantir o sucesso das restaurações estéticas. Por isso, os principais fatores responsáveis são: emissão de intensidade de luz suficiente, correto comprimento de

onda e tempo adequado de exposição à luz (PEREIRA e PASCOTTO,2003; FREITAS *et al.*, 2011; ASSIS, 2004).

A luz pode ser de origem natural, a exemplo do sol, ou artificial, emitida através de dispositivos incandescentes como lâmpadas e corpos incandescentes, arcos de soldadura, eléctricos e lasers; ou através de descarga de gases, como as lâmpadas de néon, fluorescentes e soldadura de plasma e é medida em comprimentos de onda e é expressa em unidades de nanômetros.

Os aparelhos fotopolimerizadores se diferenciam pelo tipo de fonte de luz utilizada, variação no intervalo de comprimento de onda, tipo de pulso e intensidade de luz (SOARES *et al.*,2005).A partir da década de 70, vivenciou – se o desenvolvimento de uma variedade de tecnologias, a fim de produzir a luz necessária para o manejo e aplicação das resinas através do uso de luz ultravioleta, luz halógena de quartzo – tungstênio, luz de arco de plasma, laser de argônio e luz emitida por diodo ( RAHIOTIS *et al.*, 2004).

Godoy (2008) relata que os fotopolimerizadores mais comuns usam uma lâmpada halógena constituída por um filamento de tungstênio, o qual é envolto por um bulbo de quartzo e por um gás inerte. Esta lâmpada emite luz de amplo espectro, por meio da incandescência deste filamento, alcançando a irradiação vermelha que produz calor. E para reduzir esse aquecimento do fotopolimerizador para o dente, evitando injúrias ao órgão pulpar se utilizam filtros para que apenas a luz com comprimento de onda de 400 a 500 nm, seja transmitida para a ativação da canforoquinona.

A luz halógena é uma fonte luminosa mais usada pelos profissionais, pois apresenta baixo custo e fácil manutenção. Mas, o tempo usado para a ativação dos materiais é longo e a vida útil dos aparelhos fotopolimerizadores é relativamente curta variando aproximadamente de 100 horas. Essa luz halógena é um tipo incandescente mais eficiente, duradoura e econômica, além de ser capaz de reproduzir todas as cores com muito mais precisão do que os outros tipos de lâmpadas existentes no mercado (PETROUCIC *et al.*, 2004; LAZZARI *et al.*, 2007)

Essas lâmpadas halógenas são similares às utilizadas em projetores de slides e refletores odontológicos, são de baixa tensão (12 V), o que exige a presença de um transformador, e torna-se de cor azul quando o feixe de luz branca emitido passa por filtros ópticos existentes nos aparelhos fotopolimerizadores, localizados entre a lâmpada halógena e o cabo de fibras ópticas ou haste transmissora de luz



modelos tipo pistola, mais modernos. Logo esse equipamento precisa de um sistema de ventilação para o resfriamento desta lâmpada (RODRIGUES NETO *et al.*, 2007; MARSON, MATTOS e SENSI, 2010).

Ao contrário dessas lâmpadas halógenas que geram luz por filamentos incandescentes, os diodos emissores de luz (LEDs) convertem energia elétrica diretamente em luz por eletroluminescência, o que proporciona um mínimo aquecimento. O LED foi proposto em 1995 para substituição das lâmpadas halógenas para fotopolimerização dos materiais odontológicos e sua vida útil é relativamente longa mais de 10000 horas. Por trabalharem com baixa voltagem, os LEDs podem ser usados com baterias recarregáveis, o que os torna bastante práticos e também resistentes a choques e vibrações (ACETTA *et al.*, 2007).

Pereira *et al.* (2000) sugeriram que a intensidade de luz dos aparelhos fotopolimerizadores deveriam alcançar um valor mínimo de  $400\text{mW/cm}^2$ , para polimerizar incrementos de 2mm de espessura. E que a polimerização de incrementos de 2mm de espessura de resinas compostas por 40 segundos evitam dessa forma o aquecimento excessivo do dente, do material restaurador e fornece à resina composta propriedades mecânicas ideais. E se o incremento for maior que 2 mm, a luz do aparelho fotopolimerizador pode não conseguir ultrapassar as camadas do material a serem fotoativadas, comprometendo assim o resultado final da restauração de resina.

Além dos aparelhos de lâmpada halógena, o mercado disponibiliza aos profissionais aparelhos fotopolimerizadores à base de laser de argônio e arco de plasma, eles foram propostos para reduzir consideravelmente o tempo clínico necessário à fotopolimerização das resinas. Embora emitam luz na intensidade necessária à fotopolimerização das resinas compostas apresentam desvantagens que os tornam inviáveis para o uso tais como o elevado custo para aquisição e manutenção, além da possibilidade de danos ao tecido pulpar, decorrentes do calor gerado (CALDARELLI *et al.*, 2011).

O laser de argônio compreende uma amplificação da luz por emissão estimulada de radiação. Essa radiação se encontra no espectro de luz, que varia do infravermelho ao ultravioleta, passando pelo espectro visível. Conforme a potência de emissão de radiação, os lasers podem ser classificados como de alta potência, que apresentam potencial destrutivo e podem ser utilizados em cirurgias ou de baixa potência. que não apresentam potencial destrutivo (ANDRADE, 2015). É uma fonte

luminosa capaz de emitir luz monocromática, emite luz de uma só frequência ou de algumas poucas bandas de frequência muito próximas umas das outras; coerente com as diferentes ondas elementares que compõem a onda de luz laser mantêm uma relação fixa entre as respectivas fases e colimada um feixe luminoso praticamente paralelo com divergência mínima de grande potência (GONÇALVES, 2010).

E as lâmpadas do arco de plasma são dispositivos extremamente caros, e isso advém de que as propriedades mecânicas dos materiais polimerizados são iguais aos tratados com lâmpadas convencionais, mas com menor tempo de fotopolimerização. A fotopolimerização rápida e potente do arco de plasma ocasiona algumas desvantagens como o aumento da contração de polimerização, microinfiltração marginal, queda na resistência mecânica das resinas compostas e relação custo/benefício. Esse fotopolimerizador se encontra em desuso devido ao custo e ou benefício não serem satisfatórios (MARSON, MATTOS e SENSI, 2010).

Os sistemas a base de diodo emissor de luz (LED) são compostos por uma combinação de semicondutores no estado sólido. Em relação aos aparelhos de luz halógena, os aparelhos à base de LEDs apresentam algumas vantagens como pouco calor é produzido reduzindo a possibilidade de degradação dos componentes internos e não necessitam de filtros devido ao estreito espectro de comprimento de onda emitido que coincide com a região de absorção da canforoquinona (GODOY, 2008).

A utilização desses equipamentos fotopolimerizáveis aumentaram significativamente nos últimos anos em função do alto número de estudos acerca de sua otimização, potências mais adequadas e tempos de operação necessário para cada procedimento. Os estudos relativos aos riscos ocupacionais oriundos destas técnicas, no entanto, ainda são escassos, sendo esse campo carente de legislação e literatura específica (LOPES, 2004).

#### 2.1.1 Aparelhos Fotopolimerizadores à base de Diodo Emissor de Luz (LED): Funcionamento Físico

Os aparelhos Diodo Emissores de Luz (LED) transformam a energia elétrica em luz por meio de semicondutores sólidos, causando aquecimento mínimo. Os aparelhos de primeira geração proporcionam a desvantagem de emitirem intensidade de luz

muito baixas variando entre 80 e 300 nW \ cm<sup>2</sup> procedendo em menos eficiência de fotopolimerização. Na segunda e terceira geração a tecnologia de LED vem sendo firmemente aprimorada e alterações foram desenvolvidas com o fim de acrescer a densidade de potência (CALDARELLI *et al.*, 2011; CONTARIN *et al.*, 2015; BRUZINGA *etal.*, 2014; PRICE, 2017).

E apresentando uma vida útil entre 10.000 e 100.000 horas, tempo curto para a polimerização dos materiais odontológicos, menor produção de calor, e assim dispensa o uso de ventilação no aparelho, além do mais o ruído é praticamente desprezível (FREITAS *et al.*, 2011; LAZZARI *et al.*, 2007; MARSON, MATTOS e SENSI, 2010).

A tecnologia de LED está sendo vista como um grande passo na solução de custo eficiente para o sistemas de iluminação, e essas fontes de luz são amplamente utilizadas, por isso é importante para avaliar os potenciais riscos para o ambiente e a saúde humana ligados a esta nova tecnologia (KUSE *et al.*, 2014; CHAMORRO *et al.*, 2013; GEA *et al.*, 2018).

O LED é o acrônimo em inglês para Light Emitting Diode ou Diodo Emissor de Luz, um diodo semicondutor que quando energizado emite luz visível por luminescência e não por aquecimento de um filamento. Isso resulta num menor consumo de energia e baixa produção de calor. Um LED monocromático possui vida útil estimada em 100.000 horas sob circunstâncias de operações normais. De acordo com os fabricantes, a luz azul destes equipamentos encontra-se na faixa de 440 nm a 600 nm e as potências máximas variam de 500 mW/cm<sup>2</sup> a 1.500 mW/cm (WUNDERLICH JUNIOR *et al.*, 2009).

Diodos são tipos simples de dispositivo semicondutor. Semicondutor é um material com uma habilidade variada para administrar corrente elétrica. O diodo é a união de semicondutores do tipo p e do tipo n, formando a junção p-n. Quando aplicada uma diferença de potencial elétrico positiva no lado p e negativa no lado n, o diodo passa ao estado polarizado. Ocorre a recombinação de elétrons e lacunas na região da junção, cujo resultado é a emissão espontânea de energia sob a forma de fótons. Muitos semicondutores são feitos de um condutor pobre que teve impurezas (átomos de outros materiais) adicionadas. O processo de adicionar impurezas é chamado de dopagem (CORAZZA, 2005).

Porém, os aparelhos com lâmpada incandescente diferem dos aparelhos de LED, pois a frequência da luz emitida pelo LED é bem definida, dependendo do

tipo de material empregado no semicondutor, podendo variar entre as cores vermelho, amarelo, verde e azul. O semicondutor de nitrito de gálio e índio concentra a produção de luz azul com comprimento de onda entre 425nm e 475 nm, ou seja, coincidente com o espectro de absorção da canforoquinona, fotoiniciador presente na maioria dos materiais resinosos, o que torna esse tipo de aparelho capaz de fotopolimerizar pequenos incrementos de resina composta, que é a fonte de luz mais encontrada nas clínicas odontológicas (GODOY, 2008; RUEGGEBERG, 2011; CALDARELLI *et al.*,2011; PRICE, 2017).

O princípio básico de funcionamento do fotopolimerizador tem início na conversão de tensão da rede elétrica 127V ou 220V (depende da região) para 5V e depois com o temporizador programado pelo profissional de saúde a fonte de luz (lâmpada halógena ou LED) é ligada e é conduzida pela fibra óptica ou acrílica até o dente. Neste procedimento torna-se imprescindível que o cirurgião – dentista faça o uso de protetor ocular ao equipamento ou utilize óculos de proteção para esse atendimento odontológico (SILVA, 2019).

### 2.1.2 Radiação Eletromagnética ou Campos Eletromagnéticos

A radiação eletromagnética também é chamada de campos eletromagnéticos. Estes são constituídos de campos elétricos e de campos magnéticos e são caracterizados pelo seu comprimento de onda, frequência e energia irradiada, numa escala conhecida como espectro eletromagnético, que varre uma gama muito ampla de frequências (ANGUERA, 2012).

A radiação pode se apresentar também em forma de onda eletromagnética, constituída de campo elétrico e campo magnético oscilantes, perpendiculares entre si e que se propagam no vácuo com a velocidade da luz. Uma onda eletromagnética é caracterizada pelo comprimento de onda ou pela frequência de onda e as várias faixas constituem o espectro eletromagnético, indo de ondas de frequência extremamente baixas, passando por ondas de rádio, de TV, micro-ondas, radiação infravermelha, luz visível, radiação ultravioleta até chegar aos raios X e raios gama (OKUNO, 2013).

Existe uma barreira no espectro eletromagnético que está localizada logo após as frequências da luz visível, o que divide as radiações em dois grupos: radiação ionizante e radiação não ionizante. A radiação ionizante é a que possui

energia suficiente para arrancar um elétron de seu orbital, sendo que essa energia deve ser superior à energia de ligação dos elétrons em relação ao núcleo. Nesse processo de ionização formam-se íons ou partículas ionizadas sendo representadas pelos raios x e gama (VELUDO, 2011).

A radiação não ionizante não transporta energia suficiente para alterar o estado físico de um átomo, dessa maneira não separa os elétrons da órbita externa dos átomos. Exemplo: as ondas de luz, de micro-ondas, de rádio e antenas de telefonia, LED (RIBEIRO e PESSOA, 2007; BRASIL, 2011).

A energia eletromagnética é bem menos conhecida pela população do que a atômica e a elétrica, por exemplo, mas esse tipo de energia imperceptível é extremamente utilizada em nossa sociedade e pode provocar, dependendo do tempo e nível de exposição, riscos à saúde. A radiação eletromagnética passa através de nós todos os dias e não percebemos sua existência. Ela está presente em diversos tipos de equipamentos tecnológicos utilizados pelo ser humano, como antenas, computadores e celulares, por exemplo (RIBEIRO e PESSOA, 2007).

## **2.2 Molécula de DNA (Ácido Desoxirribonucléico)**

O DNA é uma molécula bastante simples e extremamente repetitiva, na qual estão contidos os genes responsáveis pelo comando da atividade celular e que permitem a transmissão das informações genéticas e estão dispostos de maneira linear (SCHERER e STROHSCHOEN, 2013).

Uma molécula de DNA consiste em duas longas cadeias polipeptídicas compostas por quatro tipos de subunidades nucleotídicas. Cada uma dessas cadeias é conhecida como uma cadeia de DNA, ou fita de DNA. As cadeias são antiparalelas entre si, e ligações de hidrogênio entre a porção base dos nucleotídeos unem as duas cadeias (ALBERTS *et al.*, 2017).

Andrade e Caldeira (2009) afirmam que a molécula de DNA é formada pela reunião de grupos menores chamados de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é formado por uma molécula de ácido fosfórico, uma molécula de açúcar e uma molécula de uma base nitrogenada. O ácido fosfórico é a única substância que apresenta a composição bem definida, e o açúcar é sempre uma pentose chamada de desoxirribose e as bases nitrogenadas podem ser de 4 tipos diferentes:

- Bases púricas ou purinas: Adenina (A) ; Guanina (G)

- Bases pirimídicas ou pirimidinas: Citosina (C) ; Timina (T) , Uracila (U)

Devido a danos no DNA, que ocorrem comumente, as células podem remover o dano e restaurar o DNA, podem ativar um ponto de checagem de dano, interrompendo o ciclo celular e permitindo a reparação e prevenção da transmissão dos danos, podem produzir uma resposta na transcrição que irá beneficiar o funcionamento celular, ou podem entrar em apoptose, processo que irá eliminar as células altamente danificadas e desreguladas. No entanto, falhas em qualquer uma dessas vias causa instabilidade genômica, podendo levar à carcinogênese (SANCAR *et al.*, 2004).

Uma diminuição ou bloqueio da proliferação celular pode ser decorrente da interrupção do ciclo celular e\ ou da indução da morte celular por apoptose (BIRT, HENDRICH e WANG, 2001).

O ciclo celular consiste em um ciclo de duplicação e divisão do conteúdo celular por meio do qual novas células são originadas. Em células eucariontes, esse ciclo é dividido em quatro etapas: G1, S, G2 e M. As três primeiras fases compõem a intérfase, período em que a célula realiza a transcrição de genes, sintetiza proteínas e cresce em massa. A fase G1 é o intervalo entre o término da fase M e início da fase S. Na fase S ocorre a replicação do DNA nuclear, e G2 é a fase de intervalo entre a fase S e a M. A fase M, por sua vez, é compreendida pela mitose, em que ocorre a divisão nuclear, e a citocinese, em que ocorre a divisão celular (ALBERTS *et al.*, 2009).

Os pontos de checagem de danos no DNA compreendem vias bioquímicas que retardam ou interrompem a progressão do ciclo celular em resposta a danos, e são definidos com base na transição em que está sendo interrompida, como G1\ S, intra S, e G2\M. Inicialmente, o termo ponto de checagem era definido como ponto em que a integridade do DNA é examinada, antes da progressão no ciclo celular, posteriormente, esse termo começou a incluir outras respostas celulares além da interrupção do ciclo, como indução de reparo no DNA e a apoptose (SANCAR *et al.*, 2004).

### **2.3 Genotoxicidade e a Ciclofosfamida**

A genotoxicidade é uma especialidade recente, e se situa na interface entre a toxicidade e a genética, por isso é denominada genética toxicológica. Esta

visa o estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja na sua estrutura físico-química, o ácido desoxirribonucleico (DNA), processo classificado como mutagênese, quer seja na alteração do determinismo genético a níveis celulares e orgânicos, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese (SAMPAIO *et al.*, 2012; SCHERER e STROHSCHOEN, 2013).

Rocha (2016) cita que a genotoxicidade é conhecida como uma ação nociva que afeta a integridade celular de material genético de forma que os agentes genotóxicos interagem com o DNA gerando modificações na sua estrutura e função. Assim, se estas modificações se fixarem ao ponto de serem transferidas diz-se que ocorreram mutações.

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, mas podem ocorrer uma série de problemas, que na maioria das vezes apresentam resultados maléficos, incluindo malformação, câncer, envelhecimento e morte (SILVA; ERDTMANN e HENRIQUES, 2003).

Portanto, os mecanismos de mutagênese e carcinogênese mostram-se intrinsecamente ligados. A mutação é consequência de danos no DNA, e estes podem ser o processo inicial da formação de neoplasias (RIBEIRO e MARQUES, 2003).

Pode ser avaliada de acordo com a interação do agente mutagênico com o DNA, sendo a capacidade de ligação ao DNA avaliada pela observação de aductos no DNA, a capacidade de quebra pelo teste cometa e a capacidade de induzir mutações cromossômicas através do teste do micronúcleo ou aberrações cromossômicas (LUIZETTI *et al.*, 2012).

Foi reportado no estudo de Guidotiet *al.* (2014), que os compostos genotóxicos possuem características e propriedades físicas e químicas capazes de interagir com os ácidos nucléicos, os quais podem levar a defeitos relacionados ao cromossomo 21 hereditariedade mediante as mutações observadas em células germinativas. No caso dos defeitos hereditários por mutações em células somáticas é notória a formação de tumores (benignos e malignos) e recentemente foi evidenciado que este tipo de mutação também está relacionado na patogênese de algumas doenças crônicas degenerativas e neurodegenerativas.

A genotoxicidade é caracterizada por tipos de danos no DNA (ADN adulto, sítios lábeis alcalinos, quebras na cadeia) e mutações, variando do gene à

alterações cromossômicas estruturais ou numéricas (aneuploidia e poliploidia) (PATLOLLA *et al.*, 2015). Estudos de potencial carcinogênico usando os ensaios de genotoxicidade estão em ascensão. A expressão do gene alterado, o crescimento celular anormal, a perturbação da função de uma célula normal pode estar relacionada com os efeitos genotóxicos de carcinógenos industriais ou outros potenciais agentes genotóxicos (RAYMUNDO *et al.*, 2012). Estes fenômenos podem resultar em instabilidade genômica e ser possivelmente carcinogênica (KANG *et al.*, 2013).

Para avaliar o risco de câncer, o dano genético pode ser determinado por ensaios de genotoxicidade, incluindo teste de cometa, teste de micronúcleo, ensaio de aberração cromossômica, gamma-H2AX e Teste bacteriana reversa (BRENDLER *et al.*, 2005).

Os ensaios *in vitro* são considerados como um teste de genotoxicidade para o rastreio de substâncias (por exemplo: candidatas drogas, extrato de plantas medicinais, substâncias químicas, etc.) e avaliar a sua segurança inicial, enquanto os ensaios *in vivos* fornecem informações detalhadas de significância biológica e fisiológica (BENIGNI *et al.*, 2012).

Os testes de genotoxicidade aprovados oficialmente pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) incluem o teste de mutação reversa bacteriana, teste de aberração cromossômica, teste de micronúcleos, e ensaio de cometa (KANG *et al.*, 2013).

A Ciclofosfamida é um agente alquilante, antineoplásico e imunossupressor. É um quimioterápico muito utilizado no tratamento do câncer e de outras patologias. Possui efeitos adversos mutagênicos, teratogênicos e cancerígenos. A contaminação pela Ciclofosfamida ocorre por três vias de exposição básicas: absorção pela pele, inalação de aerossóis e ingestão do medicamento. Durante a manipulação, pode ocorrer contato com o medicamento e absorção pela pele por meio de respingos na preparação ou na hora da eliminação de excretas contaminadas (MONTEIRO; CHAVES e FIGUEIREDO, 2013).

Augusto Juliani (2013) relatou que a ciclofosfamida contém um agente alquilante que altera ou evita a duplicação do DNA, inativando importantes proteínas necessárias para replicação do DNA, transcrição do RNA e provocando também alterações na integridade da célula e do metabolismo tanto da célula sadia, quanto da célula neoplásica. Alguns trabalhos comprovaram que a ciclofosfamida provoca a



formação de radicais livres que são capazes de causar danos ao DNA, proteínas e lipídios, tendo grande potencial para causar lesão por estresse oxidativo.

A exposição à Ciclofosfamida sem o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) pode ocasionar sintomas como cefaleia; vertigens; tonturas; alopecia; hiperpigmentação cutânea; vômitos; vermelhidão cutânea; edema de mucosa; úlcera; estomatite; prurido; erupções cutâneas; edema de pálpebra; náuseas; dispneia; edema de glote; leucopenia; anemia; aplasia medular; lesões no fígado; presença de ciclofosfamida na urina e aborto, principalmente no primeiro trimestre de gravidez(MONTEIRO ; CHAVES e FIGUEIREDO, 2013).

## **2.4 Biomarcadores da Genotoxicidade**

### **2.4.1 Teste do Cometa**

O Ensaio do cometa, eletroforese em microgel ou eletroforese em gel de célula única é um teste de genotoxicidade empregado há mais de 20 anos, cujo uso encontra-se em franco crescimento, é um método preferível para avaliar dano ao DNA, devido a sua relativa insensibilidade à citotoxicidade, pois as células apoptóticas ou necróticas formam imagens características. E avaliam danos ao DNA de células individuais e possibilita quantificar quebras da fita simples e dupla no DNA. É um método de estudo genotóxico desenvolvido por Osting e Johanson 1984 (COLLINS *et al.*, 2008).

Ele utiliza a radiação para gerar danos ao DNA de células de mamíferos e observou-se que a extensão da cauda de DNA liberada era proporcional a quantidade de radiação utilizada. A técnica foi então aprimorada por SINGH *et al.* (1988), sendo atribuída maior sensibilidade à técnica com a utilização de solução alcalina.

Esse teste se fundamenta em dois princípios, de acordo com o pH: versão neutra (Ostlinge e Johanson, 1984) sendo a menos sensível, porque detecta a mesma lesão de fita dupla de DNA e a versão alcalina descrita por Singh *et al.*(1988) a qual é adotada pela maioria dos laboratórios por detectar maior variedade de lesões de DNA, como quebras de fita única e dupla, lesões de sítios alcalinos lábeis e locais de crosslinks (LEAL, 2017; DUSINSKA e COLLINS, 2008; BRIANESSI, CAMARGO e MIOT, 2009).

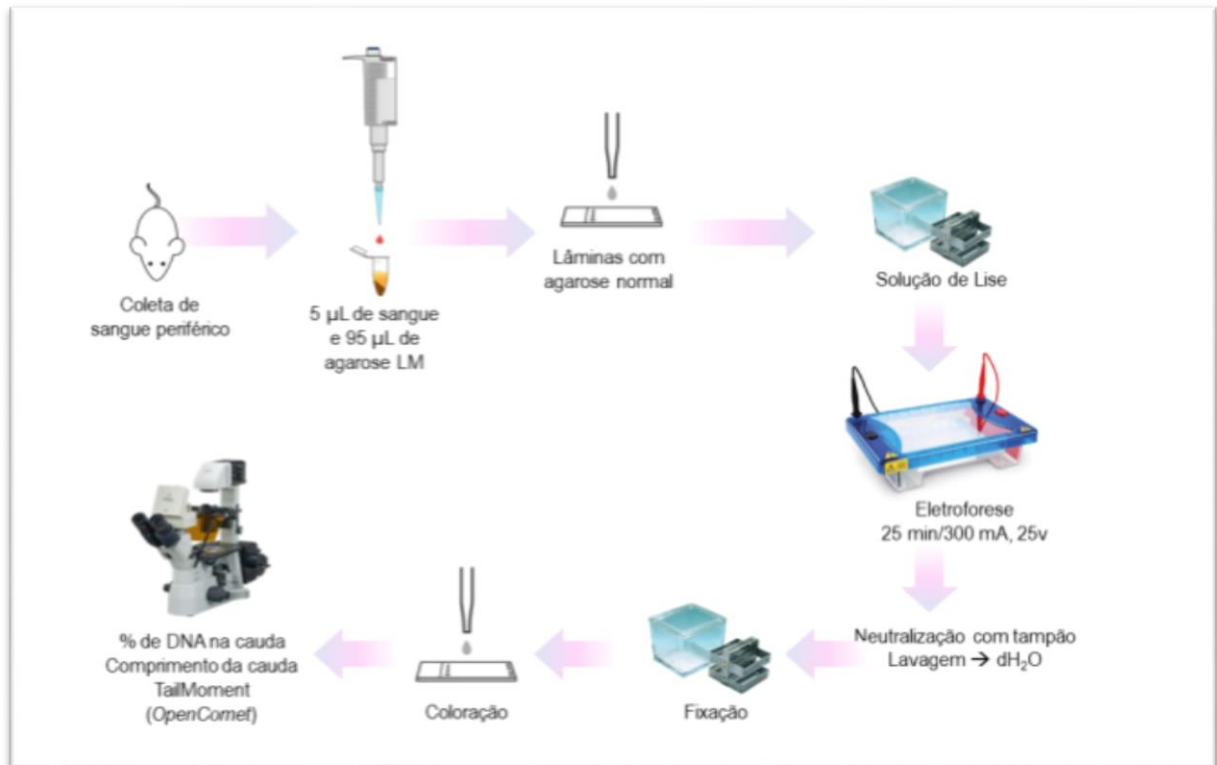
É um método rápido, seguro, de baixo custo, sensível e relativamente simples para medir danos no DNA. Essa técnica pode ser utilizada em uma vasta gama de organismos (humanos, animais e plantas), tanto em culturas *in vitro* com *in vivo*, desde que as amostras possam ser preparadas como suspensão de células únicas (NERI *et al.*, 2015; LEAL, 2017).

Apesar de apresentar sensibilidade pouco menor que outros testes de genotoxicidade, com o teste de micronúcleo, o ensaio do cometa é capaz de investigar ampla variedade de compostos com potencial genotóxico, assim como detectar seu efeito em baixas concentrações (KAWAGUCHI *et al.* 2010; SCHERER e STROHSCHOEN, 2013; ZAPATA *et al.*, 2016).

Segundo Silva, Erdtmann e Henriques (2003) relatam que a identificação do dano ao DNA pode ser feita por diferentes maneiras como, por exemplo, medindo-se o comprimento do DNA migrante com a ajuda de uma ocular para mensurações, ou ainda classificando-se visualmente, de acordo com os diferentes níveis de dano, as células analisadas, onde se pode obter um valor arbitrário que expressa o dano geral sofrido por uma população de células.

O teste se fundamenta no comportamento do DNA de células individualizadas quando submetido à eletroforese. As células em suspensão são embebidas em agarose e imersas em solução de detergente e alta concentração de sais que lizam as células e extraem as proteínas, deixando na lâmina somente as proteínas da matriz nuclear e o DNA condensado e helicoidizado, denominado nucleóide. Durante a eletroforese, o DNA fragmentado se movimenta para a região do ânodo, proporcionalmente à extensão de dano ao DNA, adquirindo a forma aparente de um cometa, com cabeça, representada pela região nuclear, e cauda, composta pelos fragmentos de DNA que migram (BRIANEZI, 2011). O esquema representativo relatado anteriormente pode ser visualizado na Figura 01.

**Figura 01 – Esquema representativo do procedimento experimental para realização do ensaio cometa**



Fonte: Adaptado de TICE et al.,2000

Este teste não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas, que podem ser reparadas e, se não reparadas, podem resultar em mutação. Também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, monitorando o dano, visto que as lesões detectadas por ele são passíveis de correção; embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (SCHERER e STROHSCHOEN, 2013).

O DNA é aplicado em um gel formado por um polímero (agarose) e um tampão (solução química capaz de transmitir eletricidade e manter o pH constante). Devido ao caráter eletronegativo, quando submetido a uma corrente elétrica, o DNA é atraído para o polo positivo, migrando através do gel. Quanto menor a molécula, ou seja, menos nucleotídeos, mais rápida será a migração e o DNA irá percorrer uma distância maior dentro do gel. Dessa forma, a corrente elétrica separa as moléculas de DNA pelo tamanho, da menor para a maior. Moléculas de mesmo

tamanho migram juntas, parando na mesma posição no gel e formam uma região denominada banda, visível por meio de corantes que se ligam ao DNA (HEPP e NONOHAY, 2016).

Após a coloração específica, o DNA da célula que não apresentar dano migrará de forma homogênea formando um círculo. Em contrapartida, o DNA danificado formará fragmentos de diversos tamanhos, originando uma forma similar à de um cometa, com a cauda correspondendo aos fragmentos que migraram. O dano pode ser quantificado em células individuais. Para interpretação dos resultados, o cometa é dividido entre cabeça e cauda. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentam cauda, enquanto que células com mais danos apresentam caudas maiores (PERES - CEREZALES *et al.*, 2009).

Para a análise do dano ao DNA, o tamanho da cauda é um parâmetro proporcional ao tamanho do dano que foi causado, mas a simples visualização do cometa já identifica danos presentes ao DNA. A detecção do dano no DNA pode ser feita por diferentes maneiras, como por exemplo, medir o comprimento do DNA fragmentado migrante com a ajuda de uma ocular de medidas, ou ainda classificar visualmente em diferentes níveis de danos as células analisadas, podendo obter valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células (SILVA, 2007; TICE *et al.*, 2000).

Conforme os estudos de Collins *et al.* (2008); Mckelvey *et al.* (1993); Azqueta *et al.* (2011); Azqueta e Collins (2013) relatam que as análises podem ser realizadas em microscópios ópticos comuns, quando as células são coradas com nitrato de Prata ou corante Giemsa, ou em microscópios de fluorescência, quando coradas com brometo de Etídio ou Acridine Orange, por exemplo. As células são classificadas de acordo com o tamanho da “cauda” em relação a “cabeça” (núcleo), em quatro classes de danos: classe 0: sem cauda, classe 1: cauda com diâmetro menor que a cabeça, classe 3: cauda longa, superior a duas vezes o diâmetro da cabeça, classe 4: cauda longa e espelhada, em forma de leque. Essa metodologia apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, dentre as quais pode-se citar a utilização de um pequeno número de células que não necessariamente estejam em divisão. Já nas células lesadas, o DNA migra do núcleo em direção ao ânodo, durante a eletroforese, mostrando uma “cauda” de fragmentos sedimentados, semelhante a um cometa e são classificados entre classes de um (dano mínimo) a quatro (dano máximo). O ID será calculado pela

multiplicação do tipo de dano celular (0 a 4) pelo número de células enquadradas nos respectivos tipos de danos. Para calcular a FD, subtrai-se o número de células em dano 0 pelo total de células de cada animal (100).

Novas técnicas para detecção de danos no DNA também têm sido utilizadas no ensaio cometa. Diversos softwares, como por exemplo, o OpenComet, utilizam fórmulas geométricas para encontrar cometas através de uma análise automatizada de imagens, possibilitando resultados mais precisos e menos propenso aos erros humanos, além de proporcionar uma análise mais rápida (GYORI *et al.*, 2014).

O software OpenComet, versão 1.3 para as análises do ensaio cometa, que são o comprimento da cauda de DNA e a porcentagem de DNA na cauda, os quais foram utilizados no presente trabalho (COLLINS, 2014).

O OpenComet é uma ferramenta desenvolvida especificamente para lidar com as dificuldades na análise automática de imagens de ensaios de cometas. Implementamos novos algoritmos de processamento de imagem para encontrar cometas e segmentar a cabeça do cometa. O tempo total de análise é reduzido significativamente em comparação com as ferramentas que exigem seleção manual de cometas (GYORI *et al.*, 2014).

#### 2.4.2 Teste do Micronúcleo

O teste do Micronúcleo foi descrito pela primeira vez por Schmid em 1975, tendo sido realizado em mamíferos *in vivo* e a única exigência era a escolha de tipos de células com elevada atividade mitótica. Ele tem a propriedade de detectar alterações cromossômicas durante a divisão celular, provocadas por substâncias mutagênicas (RIBEIRO *et al.*, 2003 ; FLORES e YAMAGUCHI, 2008).

Em 1959, Evans e colaboradores utilizaram os micronúcleos como marcadores de dano citogenético quando irradiaram *in vitro* raízes de cebola para verificar dano mutagênico. Alguns anos depois, por volta de 1970, K.Boller e W.Schmid utilizaram pela primeira vez a designação Teste do Micronúcleo. Por volta de 1900, os micronúcleos foram observados por Howell no citoplasma de eritrócitos que os designou fragmento de material nuclear (KIRSCH *et al.*, 1999).

O estudo histórico que desenvolveu o procedimento original foi realizado pelos pesquisadores Von Ledebur e W.Schmid em 1973 *in vivo* em medula óssea de

roedores. Eles estudaram os micronúcleos em eritrócitos jovens com a finalidade de avaliar danos citogenéticos (HEDDLE *et al.*, 1983).

Em 1985, Michael Fenech e A. Morley disseram que o teste foi aprimorado e foi desenvolvida a técnica de bloqueio de citocinese, utilizando um agente químico chamado citocalasina B, que leva a inibição da citocinese, mas não impede a divisão nuclear, levando a um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão nuclear, o que reflete na análise subestimada da frequência de danos (CHEQUER, 2008 ; SAMANTA e DEY, 2012).

Além disso, a citocalasina B pode causar interferência na detecção de compostos que possam inibir a citocinese ou a polimerização dos filamentos de actina (RIBEIRO *et al.*, 2003). A técnica de bloqueio da citocinese utilizando a citocalasina B, permite o reconhecimento das células por suas aparências binucleadas (FENECH *et al.*, 1999). E pode ser utilizada para o monitoramento de populações expostas a substâncias mutagênicas e para avaliação do potencial mutagênico de agentes químicos e físicos (BONASSI *et al.*, 2003).

A citocalasina B é um produto fúngico que impede a polimerização dos filamentos de actina de se ligarem às extremidades mais dos microfilamentos. Ela é um inibidor de polimerização da proteína actina requerida para a formação do anel contrátil, que induz a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas (citocinese). Na técnica de Micronúcleo *in vitro*, utiliza-se a citocalasina B para paralisar as células em citocinese, desse modo, permitindo que a célula complete a divisão nuclear e que essas células possam aparecer mono, bi ou trinucleadas (SOUZA, 2011).

A partir da publicação de Tolbert, Shy e James (1991) relataram que o teste do micronúcleo, em células esfoliadas de mucosa bucal exposta, foi considerado capaz de detectar quebra cromossômica e interferências na mitose, fenômenos importantes na carcinogênese e que, nesses epitélios, seria mais vantajoso a sua aplicação em relação ao teste quando aplicado em linfócitos. Esse teste é simples, rápido, econômico, atraumático (não invasivo) e quando aplicado em células esfoliadas é capaz de detectar direto no tecido alvo a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos. As desvantagens desse teste se referem à necessidade de divisão celular para a análise de Micronúcleo, já que esta técnica só é efetiva em populações de células em constante divisão.

O teste do micronúcleo é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Esse teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos. Por volta da década de 70, passou também a ser usado em linfócitos do sangue periférico e por fim em células esfoliadas, como por exemplo, da mucosa bucal (RIBEIRO *et al.*, 2003; UDROIU *et al.*, 2015; CORRÊA *et al.*, 2009; SOUZA, 2011).

Tolbet, Shy e James (1991) propuseram um novo protocolo em que além dos micronúcleos seriam incluídas outras anomalias nucleares como:

- Cariorréxis, cromatina condensada e picnose: associadas à citotoxicidade (necrose e queratinização) e genotoxicidade (apoptose).
- Cariólise: associada à necrose e queratinização.
- Binucleação: provavelmente resultante de interferências em estágios tardios da divisão celular

A análise em células binucleadas permite uma medida mais precisa da frequência de células com micronúcleo, pois seria necessário avaliar o dobro de células mononucleadas para observar o mesmo nível de danos binucleados. Essa técnica foi validada em todo o mundo em 1999 (FLORES e YAMAGUCHI, 2008; CHEQUER, 2008).

Esse teste é considerado padrão ouro para avaliação citogenética de lesões que ocorrem no DNA. O estudo de BORTOLI *et al.* (2009) demonstraram um aumento significativo de células com micronúcleos em trabalhadores expostos a pesticidas nos campos de soja. Os estudos realizados por GARAJ – VRHOVAC e ZELJEZIC (2002) mostraram que após um período de oito meses sem a exposição aos produtos, a frequência de micronúcleos e aberrações cromossômicas sofreu um decréscimo em relação aos grupos recentemente expostos (FARIA e BRAGA, 2015).

A formação do Micronúcleo é resultado da perda de cromossomos inteiros ou apenas fragmentos de cromossomos que não migraram para o núcleo principal após a divisão mitótica, esses fragmentos não são inclusos nos núcleos das células filhas originando assim a formação de um micronúcleo, sendo este

morfologicamente igual ao núcleo principal, porém de tamanho inferior, assim esse teste detecta mutagênese cromossômica, como clastogênese e a aneugênese (FENECH, 2000 ; SCHMID, 1975; OECD, 1997 ; NORPPA e FALCK, 2003; DA ROSA, 2009; ANCINES, 2011; COSTA e TEIXEIRA, 2012; CHEQUER, 2008; RODRIGUES, 2011).

O micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula formado por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose. Sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou decorrentes de fatores ambientais ou ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase esses elementos que não foram orientados pelo fuso celular dão origem, nas células filhas, a núcleos secundários (satélites) e bem menores que os principais (COELHO *et al.*, 2007; HEDDLE *et al.*, 1983; SILVA , 2014; SCHMID, 1975; PORTO *et al.*, 2005; HOSHI, 2009).

O protocolo básico do teste é o isolamento de linfócitos, a contagem de células, o bloqueio da divisão celular, fixação das células com uma solução de metanol: ácido acético glacial e coloração com Giemsa para a observação em microscópio. Especificamente, os micronúcleos observados em células de tecidos epiteliais esfoliadas são formados nas células da camada basal, a amostra é colhida por muco raspagem e transferida para lâminas onde será fixada em 80% etanol, coradas com corantes específicos e analisadas entre 500 a 4000 células (LOBO e BOLANOS, 2014).

Os micronúcleos são encontrados em uma grande variedade de células da medula óssea: mieloblastos, mielócitos e eritrócitos. No entanto, são principalmente observados nos eritrócitos policromáticos (jovens), que durante um período de 24 horas se coram em azul-acinzentado basofílico com Giemsa (LUIZETTI *et al.*, 2012).



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos genotóxicos em *Rattusnorvegicus* relacionados aos diferentes tempos de exposição ao uso do fotopolimerizador de diodo emissor de luz.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Identificar o dano e reparo do comprimento da cauda de animais em grupos controle e expostos ao fotopolimerizador de LED em relação aos diferentes tempos de exposição, com aplicação do teste cometa.

- Identificar o dano e reparo da porcentagem de DNA dos animais em grupos controle e expostos ao fotopolimerizador de LED em diferentes tempos de exposição, com aplicação do teste cometa.

- Determinar a frequência de micronúcleos para os animais dos grupos controle e expostos ao fotopolimerizador de LED em diferentes tempos de exposição.

- Propor um novo protocolo de utilização do fotopolimerizador nas rotinas odontológicas

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Procedimentos Éticos

O presente trabalho obedeceu às orientações preconizadas pela lei 11.794 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e foi submetido à aprovação pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Estadual do Piauí (CEUA \ UESPI), sobre o protocolo N° 01060/2018 (ANEXO A).

### 4.2 Animais e Local da Pesquisa

Foi realizado um ensaio *in vivo* para avaliar os possíveis efeitos genotóxicos em *Ratos norvegicus*, a partir da exposição destes a um fotopolimerizador de LED no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) em Teresina-Piauí.

A amostra foi constituída 120 animais sendo 60 machos e 60 fêmeas, com massa corporal de 200 a 250 g, provenientes do Biotério da UESPI. Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (03 animais em cada caixa separados por gênero), com dieta normal e água *ad libitum* em ambiente com temperatura de 25° C.

Os ratos foram divididos em três grupos: controles positivo, controle negativo e grupos experimentais de exposição não ionizante ao aparelho de fotopolimerizador de LED, nos tempos de 40 segundos, 10 minutos e 7 minutos e meio.

Nos 24 animais para o controle com parâmetro positivo (ciclofosfamida 50 mg/kg) foi administrado por via intraperitoneal e para o controle com parâmetro negativo (água destilada) foi administrado o mesmo volume do controle positivo para mais 24 animais, totalizando 48 animais para os testes do ensaio do cometa e micronúcleo.

Nos grupos experimentais, os animais foram submetidos à exposição a luz do aparelho de fotopolimerizador de LED sob os dentes anteriores superiores, sendo que os animais foram expostos por 40 segundos, a fim de representar o paciente, animais expostos por 10 minutos, representando o profissional cirurgião-

dentista e o outro tempo em que os animais foram expostos por 7 minutos e meio, representando também o profissional cirurgião-dentista.

Para estabelecer esse tempo de 40 segundos foram observados os estudos de Pereira et al. (2000) que relataram que a polimerização de incrementos de 2mm de espessura de resina composta para o procedimento de restauração é de 40 segundos, sendo assim o uso do fotopolimerizador de LED nesse tempo evita o aquecimento excessivo no dente do material restaurador e assim fornece uma resina composta com propriedades ideais.

Para os animais que foram expostos a 10 minutos ao fotopolimerizador de LED, esse é o tempo que corresponde aos cirurgiões – dentistas que atendem em uma Unidade Básica de Saúde. De acordo com Rodrigues (2011) na Estratégia de Saúde da Família, o profissional cirurgião – dentista deve atender 16 pacientes por dia, sendo 8 pacientes no turno da manhã e 8 pacientes no turno da tarde.

E o tempo de 7 minutos e meio de exposição ao fotopolimerizador de LED foi obtido aleatoriamente, no qual foi reduzido 25% de 10 minutos. Após as análises genotóxicas com o tempo de 10 minutos causar dano genotóxico foi proposto um novo tempo ao uso pelo profissional cirurgião – dentista e sua equipe de saúde bucal.

No tempo de 40 segundos, tanto para o teste do ensaio do cometa e micronúcleo, utilizamos 24 animais. No tempo de 10 minutos, para os testes citados anteriormente, usamos mais 24 animais e no tempo de 7 minutos e meio utilizamos mais 24 animais. Totalizamos nesses grupos experimentais a soma de 72 animais para esta pesquisa.

### **4.3 Aplicação do Diodo Emissor de Luz**

Primeiramente todos os animais foram anestesiados com Xilasina (5 a 10 mg/kg) combinada com a Ketamina (60 a 75 mg/kg) para melhorar o relaxamento muscular, analgesia e a duração do efeito.

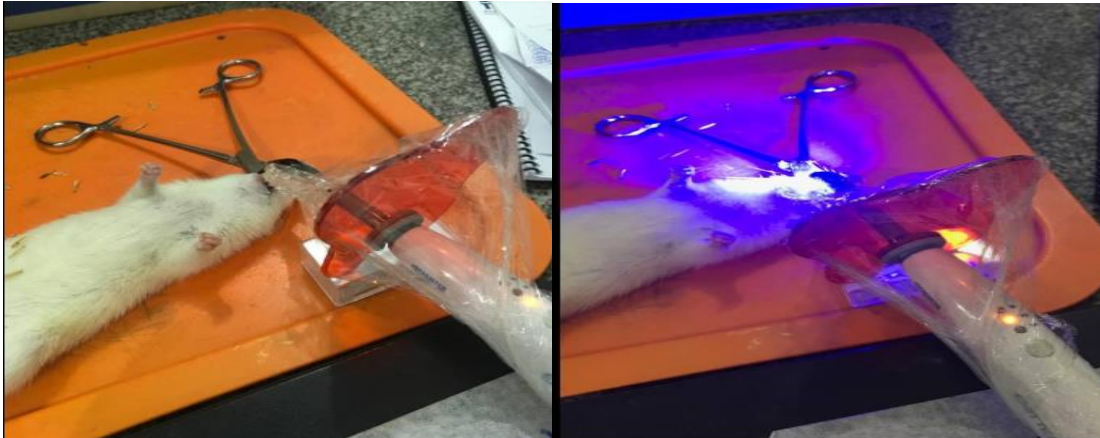
Após a anestesia, os ratos dos grupos experimentais (dos tempos de 40 segundos, 10 minutos e 7 minutos e meio) foram retirados das gaiolas e colocados em uma bandeja de plástico, nos quais utilizamos uma porta agulha para facilitar abertura da boca e também para exposição ao fotopolimerizador de LED.

A emissão de luz foi proporcionada por um aparelho fotopolimerizador novo, Emitter a Fit, fabricado pela Schuster, com intensidade de luz em torno de  $1250\text{mW}/\text{cm}^2$ , frequência: 50\60 Hz e comprimento de onda de 420 à 480 nm, obtidos 5 segundos após o início da iluminação.

Durante a aplicação da luz, a ponteira óptica do fotopolimerizador foi mantida encostada nos dentes anteriores superiores dos animais nos tempos citados anteriormente. E o aparelho do fotopolimerizador de LED se manteve parado com o auxílio de um suporte, no qual o operador apenas acionava o tempo de exposição para cada animal. Podendo ser visualizado na Figura 02 em que os animais foram expostos ao fotopolimerizador de LED.

A cada período de um minuto de exposição, foi feito um intervalo de um minuto, seguido de novo minuto de exposição e assim sucessivamente até completar o tempo predeterminado para cada grupo (PETROUCIC, 2004).

**Figura 02 – Animais expostos ao fotopolimerizador de LED**



Fonte: Arquivos da Pesquisa, 2019

#### **4.4 Preparo das Amostras**

##### **4.4.1 Ensaio do Cometa**

O ensaio do cometa foi realizado com sangue periférico retirado da cauda de cada animal após 4 horas de exposição (danos) e 24 horas de exposição (reparos). Ao final de cada período, foram coletados 40uL desta amostra,

transferindo-os para microtubos contendo 120uL de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%) a 37°C. A mistura foi homogeneizada e transferida para lâminas pré-revestidas com 5% de agarose. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas e colocadas a 3°C durante 20 minutos. As lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise, 1 mL de Triton X-100 e 10 mL de DMSO durante 1 hora a 3°C no escuro.

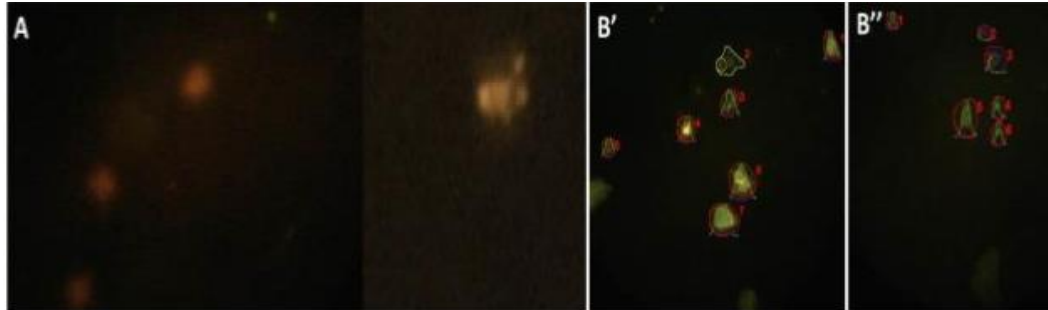
As lâminas foram colocadas numa cuba de eletroforese e as lâminas foram neutralizadas e, em seguida, secadas, fixadas com etanol 100% durante 10 minutos e armazenadas para análise posterior. Finalmente, as lâminas foram coradas com Gel Red cobertos com uma lamínula.

As lâminas foram preparadas em duplicata e utilizando um microscópio de imunofluorescência num aumento de 40 x, num ensaio cego. Utilizou-se um filtro de 420- 490 nm e um filtro de barreira de 520 nm. Foram contabilizadas 200 células por animal (100 para exposição aguda e 100 para exposição crônica). As formas dos cometas foram analisadas através do tamanho da cauda que é um parâmetro proporcional ao tamanho do dano que foi causado, mas a simples visualização do cometa já identifica danos presentes no DNA.

A detecção do dano ao DNA pode ser feita por diferentes maneiras, como por exemplo, medir o comprimento do DNA fragmentado migrante com a ajuda de uma ocular de medida, ou ainda classificar visualmente, em diferentes níveis de danos as células analisadas, podendo obter valor arbitrário que expresse o dano geral sofrido por uma população de células (NERI *et al.*, 2015).

Para a interpretação dos resultados foram avaliados o dano ao DNA pela porcentagem de medida do DNA na cauda (% de DNA – medida da proporção de DNA total presente na cauda) e o comprimento da cauda (comprimento da cauda vezes a porcentagem de DNA na cauda). Esses parâmetros foram calculados em 100 nucleíodes / amostra. Para isso, utilizamos o software OpenComet (KUMARAVEL, VILHAR e FAUX, 2009; GYORI *et al.*, 2014). Podendo ser visualizado através da Figura 3 em que mostra a fotomicrografia de cometas por meio do software OpenComet e análise de 100 cometas por indivíduos expostos.

**Figura 3 – (A) Fotomicrografia de cometas e (B' e B'') Processamento pelo software OpenComet. Análise de 100 cometas por indivíduos expostos.**



Fonte: Arquivos da Pesquisa, 2019

#### 4.4.2 Teste do Micronúcleo

As células de medula óssea foram coletadas imediatamente após a eutanásia dos animais. Para isso, usamos uma seringa de 0,1 mL preenchida com soro fetal bovino (FBS). Introduzimos a agulha na abertura da extremidade do fêmur e derramamos o soro fetal bovino pelo canal, empurrando o componente medular em direção à outra extremidade, posicionado em um tubo Falcon, previamente marcado com o código do animal. Ressuspendido o material da medula em soro fetal bovino, até atingir uma homogeneidade. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 1.000 RPM e o sobrenadante descartado no final do procedimento com pipeta Pasteur. Completou-se a amostra com 0,5 mL de soro fetal bovino e ressuspendeu até a homogeneização. Gotejaram-se 02 gotas da suspensão preparada em uma lâmina previamente marcada com o código do animal e com o auxílio de outra lâmina em um ângulo de 45 graus, foi realizado o esfregaço, sendo secado ao ar livre. Foram preparadas duas lâminas para cada animal. A coloração foi realizada 24 horas após a confecção das lâminas em Giemsa por 3 minutos. A análise foi realizada em campo cego, com aumento de 100x (objetiva de imersão) em um curto espaço de tempo, pelo mesmo observador. Determinamos a frequência de micronúcleos em 2.000 células de eritrócitos policromáticos por animal (HAYASHI *et al.*, 1994; HAYASHI *et al.*, 1990; HAMADA *et al.*, 2015). Na figura 04 é observado a sequência de procedimentos para a confecção das lâminas no teste de Micronúcleo.

Quando ocorre um dano genotóxico na célula, um fragmento da célula se fragmenta ou se rompe do seu interior e há a formação de um micronúcleo na parte

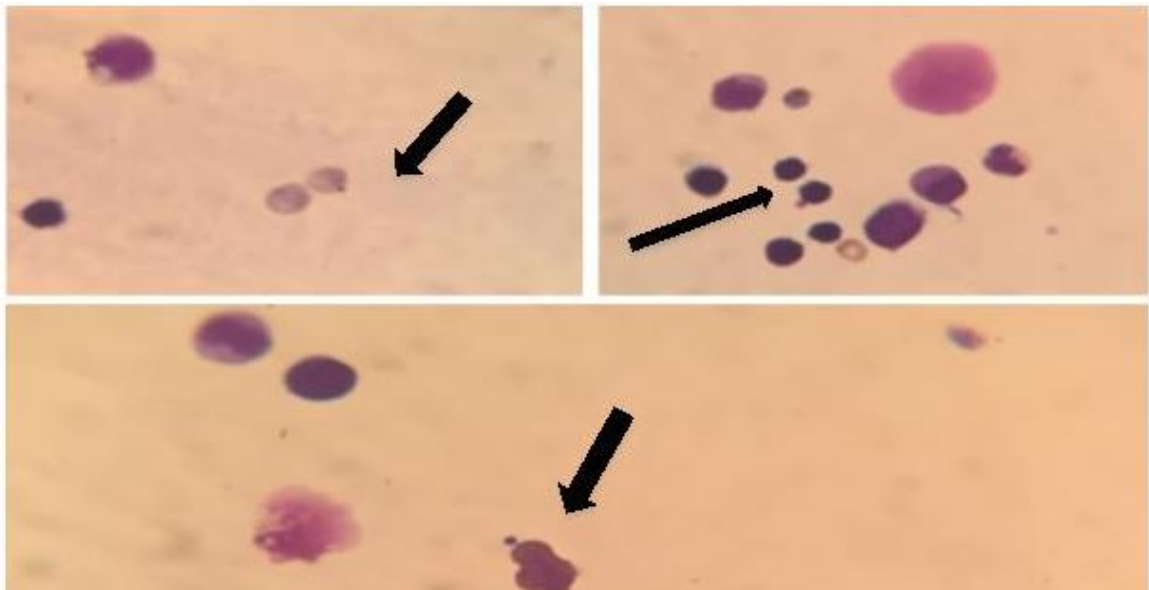
posterior da célula podendo ser visualizado na Figura 05 na imagem obtida por microscopia óptica na objetiva de 100x mostrando a presença de micronúcleo.

**Figura 04 – Sequência de procedimentos para confecção das lâminas no Teste de Micronúcleo**



Fonte: Arquivos da Pesquisa, 2019

**Figura 5 - Imagem obtida por microscopia óptica na objetiva de 100x mostrando a presença de micronúcleo nas setas**



Fonte: Arquivos da Pesquisa, 2019

#### **4.5 Organização e Análise dos Dados**

Os dados foram analisados por meio do programa GraphPadPrism versão 5.0 para a submissão da análise estatística utilizando One-Way ANOVA e teste T de Student. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Os resultados foram expressos como médias, ou seja, desvio padrão das três experiências independentes. Os resultados foram considerados positivos quando houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

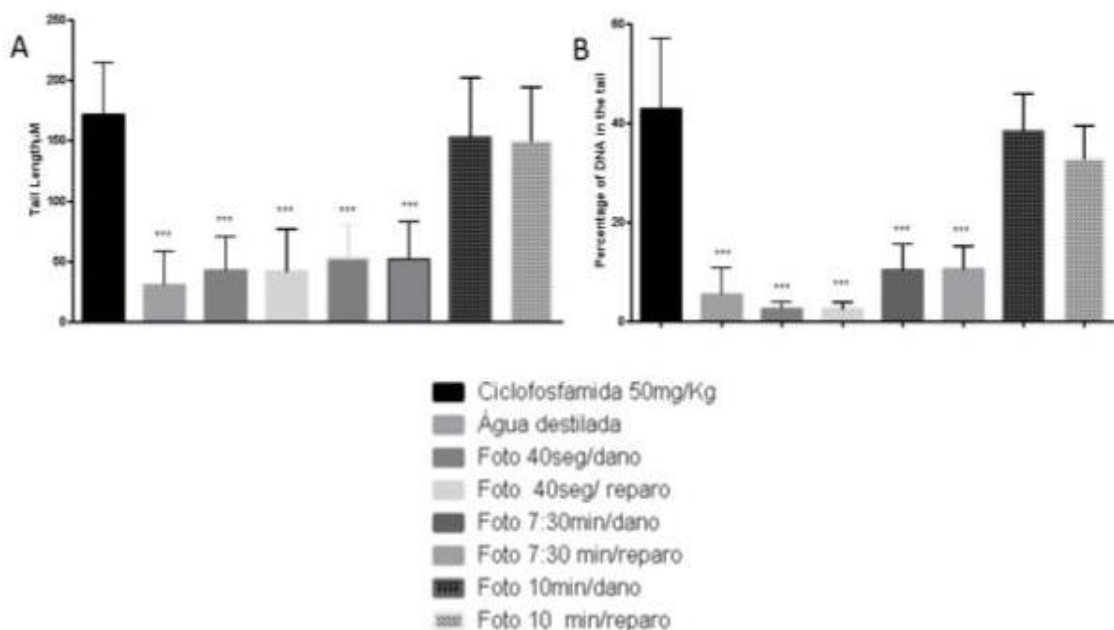


## 5 RESULTADOS

De acordo com a Figura 6 observam-se os registros dos comprimentos da cauda do DNA no gráfico A e as porcentagens de DNA na cauda no gráfico B, após análise do software OpenComet dos animais tratados respectivamente com ciclofosfamida, água destilada e exposições ao fotopolimerizador de 40 segundos (dano e reparo), 7 minutos e meio (dano e reparo) e 10 minutos (dano e reparo).

A análise do teste estatístico de cometa demonstrou que houve uma diferença significativa, evidenciando que o tempo de exposição de 10 minutos ao fotopolimerizador de LED, tanto no dano como no reparo apresentaram efeitos genotóxicos em ratos, mas não houveram diferenças significativas no grupo controle negativo com o uso da água destilada e nos grupos tratados com fotopolimerizador de LED nos tempos de 40 segundos e 7 minutos e meio.

**Figura 6 – Registros dos comprimentos da cauda (A) e as porcentagens de DNA na cauda (B), após análise do software OpenComet dos animais tratados respectivamente, com ciclofosfamida (50mg/Kg), água destilada, e exposições ao fotopolimerizador de 40 segundos, 7 minutos e meio e 10 minutos.**

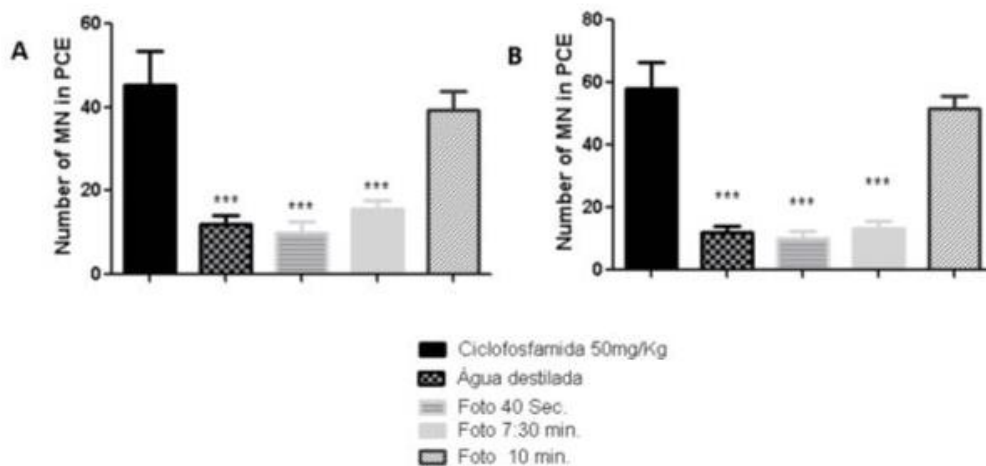


Legenda: \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Ciclofosfamida 50mg / Kg

A Figura 7 apresenta as médias de micronúcleos encontrados em 2.000 eritrócitos policromáticos, após exposições aguda no gráfico A e exposição crônica no gráfico B, dos animais tratados respectivamente, com ciclofosfamida, água destilada, e exposições ao fotopolimerizador de 40 segundos, 7 minutos e meio e 10 minutos.

A análise do teste estatístico de micronúcleo demonstrou que o tempo de exposição de 10 minutos ao fotopolimerizador de LED tanto em exposição aguda como em exposição crônica apresentaram efeitos toxicológicos em ratos, comparando com a ciclofosfamida, que é um parâmetro toxicológico. Porém, não houve diferença significativa no controle negativo (com o uso da água destilada) e nos grupos tratados nos tempos de 40 segundos e 7 minutos e meio tanto em exposição aguda e exposição crônica do micronúcleo.

**Figura 7 – Média de micronúcleos encontrados em 2.000 eritrócitos policromáticos após exposição aguda (A) e exposição crônica (B), dos animais tratados respectivamente, com ciclofosfamida(50mg/Kg), água destilada, e exposições ao fotopolimerizador de 40 segundos, 7 minutos e meio e 10 minutos.**



Legenda: \*\*\* =  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Ciclofosfamida 50mg / Kg

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram utilizados dois métodos para investigar a genotoxicidade *in vivo* do LED de coloração azul. O teste do cometa quantifica lesões para DNA em células individuais e o teste de micronúcleos indica a instabilidade cromossômica (MILHOMEM-PAIXÃO *et al.*, 2016).

Os resultados do ensaio cometa foram observados nas Figuras 06 e 07 que mostraram alterações genotóxicas tanto para o dano e reparo no tempo de 10 minutos. Resultados estes que se mantiveram no teste de micronúcleo tanto para exposição aguda, como para crônica.

Trabalhos de YOSHIDA *et al.* (2013) e GEA *et al.* (2018) observaram que as células epiteliais do pigmento da retina humana quando expostas a radiações de LED de diferentes cores que variaram desde a cor azul com comprimento de onda de 468 nanômetros, a cor verde com comprimento de onda de 525 nanômetros e a cor vermelha com comprimento de onda 616 nanômetros e a cor branca, o LED na cor azul diminui de 75 a 99% a viabilidade celular, aumenta de 66 a 89% a apoptose celular, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e ocasiona o dano ao DNA.

Os aparelhos à base de LED foram lançados com o principal objetivo de emitirem luz fria, mas quando os aparelhos de fotopolimerizadores apresentam alta intensidade de luz, eles também produzem uma alta elevação na temperatura, perdendo a principal vantagem, que é a de não emitirem calor. Essa afirmação é concordante com a pesquisa em que as células do epitélio proveniente da retina e as células dos epitélios dos brônquios foram expostas a diferentes tipos de lâmpadas tais como: lâmpadas incandescentes, lâmpadas de halogênio, LED de luz quente e LED de luz fria. Os resultados apresentaram que as lâmpadas de LED frio causaram um ligeiro dano genotóxico significativo após 4 horas de exposição ao fotopolimerizador, sendo equivalente a presente pesquisa nos quais utilizamos o LED de luz azul fria e foram observados danos genotóxicos no tempo de 10 minutos de exposição ao fotopolimerizador (SILVA, 2014).

Uma das explicações para estas alterações é que a radiação eletromagnética não ionizante do LED é absorvida pela pele e por níveis mais profundos do corpo, dissipando-se com profundidade, podendo causar o aumento de

temperatura não percebido pelos sensores térmicos naturais, localizados superficialmente. O aquecimento gerado internamente depende do tempo de exposição, da intensidade do campo e da espessura do tecido, não podendo às vezes ser compensado pelo organismo, ocasionando efeitos biológicos (BRASIL, 2006).

Em um estudo que utilizou a microscopia eletrônica de transmissão, em que foram analisadas as mitocôndrias dos fibroblastos gengivais, observou-se que as mesmas foram danificadas por LED azul no tempo maior que 5 minutos em um tratamento dentário, aumentando o efeito citotóxico de espécies reativas de oxigênio em tecidos moles da boca. E foram observados também que os comprimentos de onda menores que 500 nanômetros, indicaram que a luz é mais rica em radiação induzindo citotoxicidade mais elevada (YOSHIDA *et al.*, 2013).

A utilização de equipamentos fotopolimerizáveis aumentou significativamente nos últimos anos na prática profissional odontológica em função do alto número de estudos acerca de sua otimização, potências mais adequadas e tempos de operação necessária para cada procedimento. Os estudos relativos aos riscos ocupacionais oriundos destas técnicas, no entanto, ainda são escassos, sendo esse campo carente de legislação e literatura específica. De acordo com a NR-15 (Norma Regulamentadora das atividades e operações insalubres) instituída pelo Ministério do Trabalho e Emprego, estabelece como insalubres atividades que exponham o trabalhador às radiações não ionizantes, mas não especifica limites máximos de exposição (BRASIL, 2011).

A RDC-185 (Resolução de Diretoria Colegiada) classifica o risco de equipamentos médicos e odontológicos em 4 classes, e os modelos atuais de fotopolimerizador fazem parte da classe de risco II, sendo de risco médio para indivíduos envolvidos com o equipamento (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

Todos os riscos ocupacionais que podem ocorrer durante o atendimento odontológico podem ser minimizados com o uso de equipamentos de proteção coletivos e individuais, cumprindo a NR-32 (Norma Regulamentadora que estabelece diretrizes básicas para a implementação de medidas de promoção e prevenção à saúde, a exemplo do uso correto do equipamento, seguindo a lei de ergonomia, ambiente adequado (COSTA e PAZ, 2006).

## 7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, levando em consideração o tempo de exposição usado na presente pesquisa, por meio dos testes realizados, a luz que é emitida pelo aparelho de fotopolimerizador de LED no tempo de 10 minutos apresentou efeitos genotóxicos nos testes do cometa e do micronúcleo.

E nos grupos experimentais nos tempos de 40 segundos e 7 minutos e meio de exposição ao fotopolimerizador de LED, não foram observados efeitos genotóxicos, sugerindo que estes tempos se mostram seguros para o profissional cirurgião-dentista e seu auxiliar bucal, durante os atendimentos clínicos. E como a temática tem poucos estudos, sugiro mais estudos para esclarecer efeitos acumulativos aos longos dos anos.

### RECOMENDAÇÕES:

#### **Protocolo de uso do Fotopolimerizador de LED nas rotinas odontológicas**

Diante dos resultados foi constatado que os cirurgiões-dentistas no tempo de 10 minutos estão sujeitos a riscos reais dos efeitos resultantes da genotoxicidade em decorrência da exposição à radiação não ionizante de diodo emissor de luz. Nesse sentido reforça-se a esses profissionais a necessidade de:

1. Alternância de procedimentos que não utilizem o uso do fotopolimerizador tais como: exodontias, limpeza dentária, raspagem dentária, curativos temporários que não sejam fotopolimerizáveis, aplicação de flúor, educação continuada através de palestras sobre a correta higienização bucal.

2. Uso obrigatório de Equipamentos de Proteção Individual (EPI): Proteção das membranas mucosas de olhos, nariz e boca durante os procedimentos.

A sequência de paramentação do profissional, com o EPIs devem ser rigorosamente obedecida, sendo a seguinte:

- Higienização das mãos, preferencialmente com a lavagem rigorosa das mãos com água e sabão ou, com fricção com álcool em gel a 70%, no tempo mínimo de 20 segundos. se não estiverem com sujidade visível.

- Lavar o rosto com água e sabão por 20 segundos, após a higiene das mãos antes do atendimento odontológico.
- Colocar avental ou capote
- Colocar Máscaras (N95 ou PFF<sub>2</sub>), se for com procedimentos com aerossol.
- Colocar Óculos de Proteção
- Colocar Protetor Facial
- Prenda o cabelo e coloque o gorro
- Higienização das mãos

**Jalecos, Aventais ou Capotes:** Podem ser estéreis (descartáveis, com abertura nas costas) para procedimentos críticos ou não estéreis (de tecido) para procedimentos semi ou não críticos. Os descartáveis são de mangas longas e impermeável, com gramatura mínima de 50g/m<sup>2</sup>, punhos com elásticos e gola tipo colarinho. Devem ser utilizados durante atendimento e descartados após cada atendimento em lixeira de conteúdo infectante. Devem ser usados durante o contato direto com o paciente, e retirados no momento da consulta (escrita e digitação em computador). Os de tecido devem ser de mangas compridas, gola alta, com punho elástico, cobrindo o joelho. Ambos devem ser usados sempre fechados. Recomenda-se retirá-los dentro da clínica e acondicioná-los em saco plástico para posterior lavagem. A lavagem deve ser realizada separadamente das demais roupas. Antes da lavagem devem permanecer por trinta minutos em solução aquosa de peróxido de hidrogênio (diluída conforme recomendação do fabricante). O uso destes deve ser restrito ao ambiente clínico ou laboratorial. Cabe ressaltar que devem ser utilizados jalecos diferentes na clínica e no laboratório ou sala de aula.

**Scrubs:** Vestimenta exclusiva para o atendimento clínico, os pijamas cirúrgicos. Essa roupa ainda será sobreposta pelo avental de mangas longas. Os Scrubs devem ser imensos em solução de hipoclorito de sódio (roupas brancas) ou Lysoform (roupas coloridas), como etapa de desinfecção prévia à lavagem. Depois disso, lavar separado de outras roupas, com água e sabão.

**Gorros ou Toucas:** Protegem da contaminação por secreções, aerossóis e produtos, além de evitarem a queda de cabelos do profissional na área de procedimento. Preferencialmente descartáveis, polipropileno com gramatura superior à 20g/m<sup>2</sup>, sendo colocados após a remoção de brincos e colares, cobrindo todo o

cabelo e orelhas e precisam ser trocados a cada turno, ou antes deste prazo se estiverem molhados ou com matéria orgânica visível.

**Óculos:** Devem possuir vedamento lateral e serem utilizados nos atendimentos dentro do consultório durante o contato direto com o paciente, exame físico e procedimentos e retirados no momento administrativo da consulta (escrita, digitação em computador). À cada paciente precisam ser lavados e desinfetados com álcool 70%. Devem ser usados pelos pacientes também. Para os procedimentos envolvendo o uso do aparelho fotopolimerizador de LED, profissional e auxiliar devem usar **Óculos de Proteção de cor alaranjada**, pois bloqueia a luz azul do aparelho. Caso o fotopolimerizador de LED não possua a proteção ocular alaranjada, é necessário o uso dos óculos de cor alaranjada.

**Protetor Facial:** Para procedimentos com produção de aerossóis, a equipe deve complementar a proteção com a utilização de protetor facial como barreira física sendo que esta pode ser lavada com água e sabão ou desinfetada com álcool 70% entre cada atendimento.

**Máscaras:** Devem ser descartáveis, com tripla proteção. Inserir após o gorro e antes dos óculos de proteção. Não devem ser tocadas durante os procedimentos e nem ficar penduradas no pescoço ou orelha. Em procedimentos sem o uso de aerossol utiliza – se o uso de máscaras cirúrgicas e precisam ser trocadas a cada paciente. O mesmo deve ser usado pela equipe de recepção do paciente. Para procedimentos com aerossol devem ser utilizadas máscaras N95 ou PFF<sub>2</sub> sem válvula expiratória.

**Luvas:** Devem ser de boa qualidade e usadas em todos os procedimentos. Protegem o profissional por funcionarem como uma barreira eficaz além de minimizarem os riscos de acidentes. O uso de luvas não dispensa a higiene das mãos, que devem ser lavadas antes e após o procedimento. As luvas podem ser de vinil, nitrilo, látex, grossa de borracha e plástico. Para procedimentos invasivos, sempre reforçar a proteção com luvas cirúrgicas. Evitar tocar em gavetas, refletor e materiais. Na necessidade de tocar nessas áreas sem barreiras de proteção, deve – se posicionar sobreluvas. Ao final, as mãos devem ser higienizados com água e sabão e \ ou álcool 70%.

Os tipos de Luvas e suas indicações:**Latéx Descartável:** Não estéreis para procedimentos clínicos e estéreis para procedimentos cirúrgicos.**Nitrilo Descartável:** Para profissionais alérgicos ao látex.**Grossa de Borracha:** Devem ter cano longo, para processos de limpeza de instrumentais, superfícies e

equipamentos. **Plástico:** Para serem usadas como sobreluvas, quando necessário manusear artigos fora do campo de trabalho. Com exceção das luvas de limpeza, todas as luvas devem ser descartadas a cada paciente. Superfícies ou objetos fora do campo operatório não podem ser tocados pelas luvas de procedimento. Devem ser usadas sobreluvas ou as luvas devem ser removidas e as mãos novamente higienizadas.

**Calçados:** Fechados e com solado antiderrapante a fim de proteger os pés das quedas de objetos, produtos e aerossóis.

**Cuidado com a produção de aerossóis:** O aerossol é gerado por equipamentos de ultrassom, jato de bicarbonato, seringa tríplice e turbinas de alta de rotação, durante a realização de procedimentos com o uso destes.

- Colocar o paciente na posição mais adequada possível
- Bochecho prévio ao procedimento odontológico o uso de peróxido de hidrogênio de 1%.
- Evitar o uso da seringa tríplice, prefira secar com algodão ou gaze.
- Regular a saída de água das canetas de rotação
- Deixar portas e janelas abertas, para propiciar a ventilação do ambiente
- Não utilizar aparelhos que utilizem muitos aerossóis como o jato de bicarbonato e ultrassom, prefira utilizar as curetas e colheres de dentina.

#### **Limpeza e Desinfecção do Fotopolimerizador de LED:**

Desinfecção por fricção com gaze e álcool 70% por 30 segundos, realizado a cada atendimento, tendo como barreira protetora o auxílio do filme plástico.

Limpe e inspecione a ponta óptica com água e sabão e desinfete com lenços umedecidos com álcool 70%, além de aplicar uma barreira protetora de filme plástico, para o controle de infecção.

Redução do tempo de uso do fotopolimerizador de LED de comprimento de onda no intervalo de 420 a 480 nanômetros para 7 minutos e meio.

#### **Desparamentação dos Equipamentos de Proteção Individual:**

É fundamental que todos os passos de higiene das mãos, entre a retirada de EPIs , sejam rigorosamente e seguidos conforme a sequência:

- ✓ Retirar as luvas
- ✓ Retirar o avental
- ✓ Higienizar as mãos
- ✓ Retirar o gorro



- ✓ Retirar o protetor facial e óculos de proteção
- ✓ Higienizar as mãos com água e sabão
- ✓ Retirar a máscara N95\ PFF<sub>2</sub>
- ✓ Higienizar as mãos com água e sabão

### **Referências do Protocolo de uso do Fotopolimerizador de LED nas rotinas odontológicas**

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos** / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

Costa, AKG, Paz CRP. **Equipamentos de proteção individual**. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços odontológicos: prevenção e controle de riscos. Brasília, DF: Editora Anvisa, 2006. cap. 7, p. 69-74.

LAGES, V.A.; LAGES, R.B.; SILVA JUNIOR, M.M.; TAVARES, C.P. **Práticas de biossegurança para consultórios odontológicos durante a pandemia de Covid-19**. Conselho Regional do Piauí.2020.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA – CFO. **Recomendações AMIB\ CFO para enfrentamento da COVID – 19 na odontologia**. 2020.

CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA – CFO. **Manual de Boas Práticas em Biossegurança para Ambientes Odontológicos**, 2020.

## REFERÊNCIAS

- ACETTA, D.F. FILHO, T.R.M.; WEING, K.M.; FRAGA, R. C. Influência dos fotopolimerizadores (luz halógena x led) na resistência à compressão de resinas compostas. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**.v.49, n.3, p.17 – 19, 2007.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC n.185, de 22 de outubro de 2001**. Registros de Produtos Médicos, 2001. Dispõe sobre orientação, sobre registro, cadastramento, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos. Brasília, 2001.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. WALTER, P. A. **Biologia Molecular da Célula**.6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. WALTER, P. A. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed. Artmed Editora, 2009.
- ANCINES, C. **Biomonitoramento em trabalhadores do setor coureiro – calçadista do Rio Grande do Sul**. Trabalho de conclusão de curso (graduação em ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ANDRADE, S.B.M.; CALDEIRA, A.M.A.O modelo de DNA e a biologia molecular: inserção histórica para o ensino de biologia. **Filosofia e História da Biologia**. v. 4, p. 139 -165, 2009.
- ANDRADE, V.S.N.F. **Uso do laser de baixa intensidade na disfunção temporomandibular**: revisão sistemática. 2015. 44f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, 2015.
- ANGUERA, M.G. **Exposição à radiação não ionizante emitida por equipamentos terapêuticos de micro-ondas e morbidade referida em fisioterapeutas**. 2012.141f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012
- ARAUJO, T. S.; SOUZA, S. O.; Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. **Scientia Plena**. 2008, v.4, n.11,2008.
- ASSIS, C. Instruções e cuidados com a fotopolimerização do dia a dia. **Revista Brasileira Odontológica**.v.71, n.2, Rio de Janeiro, 2004.
- AUGUSTO JULIANI, F. **Efeitos da ciclofosfamida na odontogênese e propriedades da fototerapia**: revisão de literatura. 36f.2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

AZQUETA, A.; MEIER, S.; PRIESTLEY, C.; GUTZKOW, K.B.; SALLETTE, J.; SOUSSALINE, F.; COLLINS, A. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. **Mutagenesis**, v. 26, n. 3, p. 393–9, 2011.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949–68, 2013.

BARRETO, A.R.S. **A genotoxicidade dos biomateriais em medicina dentária**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária) – Universidade do Porto, 2012.

BENIGNI, R.; BOSSA, C.; TCHEREMENSKAIA, O.; BATTISTELLI, C.L.; CRETTAZ, P. The new ISSMIC database on in vivo micronucleus and its role in assessing genotoxicity testing strategies. **Mutagenesis**, v.27, p.87 – 92, 2012.

BIRT, D.F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology e Therapeutics**, v.90, n.2, p.157 – 177, 2001.

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**, p.1- 4, 2009.

BONASSI, S.; NERI, M.; LANDO, C.; CEPPI, M., LIN, Y.P.; CHANG, W.P.; HOLLAND, N.; VOLDERS, M.K.; ZEIGER, E.; FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus project. **Mutation Research**. v.543, p.155 -166, 2003.

BRASIL. **NR-15 Atividades Insalubres (115.000-6)**, Ministério do Trabalho e Emprego, Portaria SIT n.º 203, de 28 de janeiro de 2011. **NR – 32 Segurança e Saúde do trabalhador em serviços de saúde**. Ministério do Trabalho e Emprego, Portaria SIT n 20, de 28 de janeiro de 2011. Portaria GM n 1.748, de 30 de agosto de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos**. \ Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRENDLER, S.S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245 – 254, 2005.

BRIANEZI, G. **Desenvolvimento de um método de análise digital para o teste do cometa corado pela prata**. 2011.101f. Dissertação (Mestrado em Patologia). Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2011.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J.L.V.; MIOT, H.A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**.v.45, 2009.

BRUZINGA, F.F.B.; SANTA ROSA, T.T.A.; BRAGA, N.M.A.; POPOFF, D.A.V.; PAULA, A.C.; FERREIRA, R.C. Fatores relacionados à intensidade da luz de aparelhos fotopolimerizadores, Montes Claros, MG. **Revista Digital Buenos Aires**, ano 19, n.197, 2014.

CALDARELLI, P.G.; BELTRANI, F.C.; PEREIRA, S.K.; CARDOSO, S.A.; HOEPPNER, M.G. Aparelhos fotopolimerizadores: evolução e aplicação clínica – uma revisão da literatura. **Revista Odontológica Clínica Científica**.v.10, n.4, Recife, 2011.

CAMPREGHER, U. B. **Eficácia do LED como fonte de polimerização de um compósito**.2003.61f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2003.

COELHO, C.V.; HERNANDES, C.C.; FERREIRA, L.A.; SILVA, L.I.; RADOS, P.V. Teste dos micronúcleos – um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. **Revista da Faculdade Odontológica de Porto Alegre**, v. 48, n. 1, p. 77 – 81, 2007.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143–51, 2008.

COLLINS, A. R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. **BiochimBiophys Acta**.v.1840, p.794 – 800, 2014.

CONTARIN, C.R.; CASALLI, J.L.; RIGO, L.Avaliação da potência dos aparelhos fotopolimerizadores utilizados no curso de Odontologia da IMED.**Journal of Oral Investigation**, v.4, n.1, p. 19-25, 2015.

CORRÊA, N.S.; BASSAN, J.S.; CUNHA, C.J.; FERNANDES, R.R.; BACHETTINI, P.S.; GARCIAS, G.L.; ROTH, M.G.M. Monitoramento da ação genotóxica em trabalhadores de sapatarias através do teste de micronúcleos. Pelotas, Rio Grande do Sul, **Ciências Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.14, n.6, p.2251 – 2260, 2009.

CORAZZA, A.V. **Fotobiomodulaçãocomparative entre o laser e led de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutânea de ratos**.2005.89f. Dissertação de Mestrado (Mestre em Bioengenharia). São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2005.

COSTA, A.K.G.; PAZ, C.R.P. **Equipamentos de proteção individual**. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Serviços odontológicos: prevenção e controle de riscos. Brasília, DF: Editora Anvisa, cap.7, p.69 – 74, 2006.

COSTA, C. TEIXEIRA, J.P. Efeitos genotóxicos dos pesticidas. **Revista de Ciências Agrárias**, n.2, p.19 – 31, 2012.

CHAMORRO, E.C.; ARIAS, C.B.; CARRASCO, M.J.P.; LUNA, J.M. Effects of light emitting diodes on human retina pigment epithelial cells in vitro.**Photochemistryand**

**Photobiology**.v.89, n.2, p.468 – 473, 2013.

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do teste de micronúcleo na avaliação da toxicidade dos corantes Disperse Red .1, Disperse Orange 1 e Disperse Orange 13**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2008.

DA ROSA, L.A.Z.C. **Avaliação de fator de risco ocupacional no setor de fabricação de tintas em uma fábrica localizada na região Sul de Santa Catarina**. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2009.

DUSINSKA, M.; and COLLINS, A. The comet assay in human biomonitoring: gene environment interactions. **Mutagenesis**.v.23, p.191- 205,2008.

FARIA, L. E. M. ; BRAGA, J. R. M. Aplicação do teste de micronúcleos para avaliação de potencial genotóxico em epitélio oral de estudantes universitários. **Revista Eletrônica Atualiza Saúde**, n.1, p.36 – 41, 2015.

FENECH, M.; HOLLAND, N.B.; CHANG, W.P.C.; ZEIGER, E.D.; BONASSI, S. The Human Micronucleus Project – An internacional collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, Amsterdam, v.428, p.271 – 283, 1999.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. v.455, p.81 - 95, 2000.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M.U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FRANCO, J. de. M. **Avaliação da eficácia do Led na fotoativação de diferentes resinas compostas**. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.

FREITAS, S. A. A.; COSTA, J.F.; BAUER, J.R.O. Avaliação da intensidade da luz dos aparelhos fotopolimerizadores utilizados em clínicas odontológicas de São Luís – Ma. **Revista Pesquisa em Saúde**.v.12, n.2, p.27- 31, 2011.

GARAJ – VRHOVAC, V. ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, p.255, 2002.

GEA, M.; SCHILIRO, T.; IACOMUSSI, P.; DEGAN. R.; BONETTA, S. GILLI, G. Cytotoxicity and genotoxicity of light emitted by incandescente, halogen, and LED bulbs on ARPE – 19 and BEAS – 2B cell lines. **Journal Toxicologico Environ Health**.v.81, p.998 – 1014, 2018.

GODOY, E.P. **Avaliação da capacidade de polimerização e elevação de temperatura produzida por aparelhos fotopolimerizadores**. 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2008.

GONÇALVES, P. M. **Terapia fotodinâmica uma alternativa antimicrobiana coadjuvante no tratamento periodontal**. 2010.51f. Monografia (Especialização em Periodontia) – Colegiado do Programa de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

GUIDOTI, D.G.G., GUIDOTI, D.T., BERTI, A.P., DUSMAN, E., VICENTINI, V.E.P. 41 Potencial mutagênico do extrato aquoso de *Allium cepa* L. em células hematopoiéticas de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 12, n. 1, p. 42, 2014.

GUIRALDO, R.D.; BERGER, S.B.; CONSANI, S.; CONSANI, R.L.X.; OLIVEIRA, G.G.; MENDES, W.B. Fenômenos relacionados à fotoativação dos compósitos restauradores odontológicos. **Journal of Oral Investigations**, v.3, n.1, p.10 – 16 , 2014.

GYORI, B.M.; VENKATACHALAM, G.; THIGARAJAN, P.S.; HSU, D.; CLEMENT, M. *et al.* Open Comet: An automated tool for comet assay image analyse. **Journal Redox Biology**.v.2, p.457- 465, 2014.

HAMADA, S.; OHYAMA, W.; TAKASHIMA, R.; SHIMADA, K.; MATSUMOTO, K.; KAWAKAMI, S.; UNO, F. *et al.* Evaluation of the repeated – dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats: Summary of the collaborative study by the collaborative study group for the micronucleus test (CSGMT) \ The Japanese Environmental. Mutation Research \ Genetic Toxicology and Environmental. **Mutagenesis**.v.780, p. 2 – 17, 2015.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M.J. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. **Mutation research**. v.312, p.293 – 304, 1994.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. J. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange - coated slides. **Mutation research**. v.29, p.187 – 197, 2010.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J.T.; NEWELL, G.W.; SALAMONE, M.F. A report os the environmental protection agency gene – tox program. **Mutation Research**, v.123, p.61 – 118, 1983.

HEPP, D.; NONOHAY, J.S. A importância das técnicas e análises de DNA. **Revista de Educação, Ciência e Tecnologia do IFRS**, v.3, n.2, p.114 – 124, 2016.

HOSHI, L. **Genotoxicidade em floricultores da região serrana do Rio de Janeiro: Uso do teste de micronúcleo na mucosa oral**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente). Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2009.

KANG, S. H.; KWON, J. Y.; LEE, J.K.; SEO, Y. R. Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. **Journal of Cancer Prevention**, v. 18, n. 4, p. 277-288, 2013.

KAWAGUCHI, S.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, A.; HONDA, G.; SASAKI, Y.F. Is the comet assay a sensitive procedure for detecting genotoxicity. **Journal of Nucleic Acids**.v.54, p.10 – 50, 2010.

KIRSCH, V.M., SOFUNI, T.; AARDEMA, M.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; ISHIDATE, M.J.; LORGE, E.; NORPPA, H.; SURRALLÉS, J.; HUDE, W.V.D.; WAKATA, A. A report from the in vitro micronucleus formation for oral cavity cancer. **Tumori**.v.85, p.253 – 258, 1999.

KUMARAVEL, T. S; VILHAR, S.P.; FAUX, A.N.JHA. Comet assay measurements: a perpective. **Cell. Biology Toxicology**. v.25, n.1, p.53 – 64, 2009.

KUSE, Y.K.; OGAWA, K.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M. Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. **Scientific Reports**,v.4, 2014.

LAZZARI, O. N.M.; BORGES, R.L.; MENEZES, M.E; BANDEIRA, B.T. Atuação da luz halógena do LED na resistência da união de brackets colados no esmalte dentário humano. **Revista Odonto Ciência**, v. 22, n. 57, p.238 – 242, 2007.

LEAL, S.R. M. D. **Estudo Genotóxico e carcinogênico da exposição ao pó de cromo trivalente em rattus norvegicus**.2017.106f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

LUIZETTI, F.; AVANCINI, C.S.; FILHO, J.P.V.; SILVA, T.G.; YAMAGUCHI, M. U. Efeito Genotóxico nos eritrócitos de camundongos tratados com creolina via oral. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, p. 433-440, 2012.

LOPES, L. Laserterapia na Odontologia, Clínica Odontológica Integrada - **Biodonto**, v.1, n.1, Mar/abr, 2004.

LOBO, T.M.; BOLANOS, A. Micronúcleos: biomarcador de genotoxicidade em expostos a plaguicidas. **Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud** ,n.2, p.18-26 , 2014.

MANDEL, I.D. Occupational risks in dentistry: comforts and concerns. **Journal of the American Dental Association**. United States. v.124, p.41- 49, 1993.

MARSON, F. A.; MATTOS, R.; SENSI, L.G. Avaliação fotopolimerizadores. **Revista Dental online**.v.9, n.19, 2010.

MILHOMEN – PAIXÃO, S.S.R.; FASCINELI, M.L; ROLL, M.M.; LONGO, J.P.F.; AZEVEDO, R.B.; PIECZARKA, J.C; SALGADO, H.L.C.; SANTOS, A. S.; GRISOLIA, C.K. The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. **Genetics and Molecular Biology**, v.39, n.2, p.248 – 256, 2016.

MONTEIRO, L.A.;CHAVES, D.C.E.; FIGUEIREDO, L.F. Conhecimento dos Profissionais de enfermagem sobre a ciclofosfamida em um hospital universitário.**Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.15, n.2, 2013.

MCKELVEY,M.; GREEN, M.H.L.; SCHMEZER, P.; POOL- ZOBEL, B.L.; MÉO, M.P.; COLLINS, A.The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review. **Mutation Research**, v. 288, p. 47-63, 1993.

NERI, M.; MILAZZO, D.; UGOLINI, D.; MILIC, M.; CAMPOLONGO, A.; PASQUALETTI, P.; BONASSI, S. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. **Mutagenesis**.v.30, p.155 – 163, 2015.

NORPPA H.; FALCK G.C.M. What human micronuclei contain? **Mutagenesis**.v.540, p.153- 163, 2003.

OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development. OECD Guideline for the testing of Chemicals - **Mammalian Erythrocyte Micronucleous Test**. v.474, 1997.

OLIVEIRA, L.I.M. **Avaliação do desempenho dos seus aparelhos fotopolimerizadores**. 2014. 57f Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária) Universidade do Porto, Porto, 2014.

OKUNO, E. Efeitos biológicos das radiações ionizantes. Acidente radiológico de Goiânia. **Estudos Avançados**.v.27, n.77, p.1 -16, 2013.

PEREIRA, S.K.*et al*. Avaliação da dureza superficial de uma resina composta híbrida em função de cor, tempo de exposição, intensidade de luz e profundidade do material. **Jornal Brasileiro de Clínica de Estética Odontológica**.v.4, n.23, p.63 – 67, 2000.

PEREIRA, S.K. PORTO, C.L.A.; MENDES, A.J.D. Avaliação da dureza superficial de uma resina composta híbrida em função de cor, tempo de exposição, intensidade de luz e profundidade do material. **Jornal Brasileiro de Clínica de Estética Odontológica**.v.4, n.23, p.63 – 67, 2000.

PEREIRA, S.K.; PASCOTTO, R.C. Avaliação dos aparelhos fotopolimerizadores utilizados em clínicas odontológicas. **Jornal Brasileiro de Dentística e Estética**.v.2, n.5, p.29 – 35, 2003.

PERES – CEREZALES S.; MARTÍNEZ, S.P.; CABRITA, E.; MARTÍNEZ – PASTOR, F.; PAZ, P.; HERRÁEZ, M.P.Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex – reversed rainbow trout. **Journal Theriogenology**.v.71, p.605 – 613, 2009.

PETROUCIC, F.; MARTÍNEZ – PÁRAMO, S.; CABRITA, E.; MARTÍNEZ – PASTOR, F.; PAZ, P.; HERRÁEZ, M.P. Efeitos da Luz visível emitida por um aparelho fotopolimerizador sobre a pele do lábio de coelhos. **Revista Odontológica da UNESP** , v.33, n.3, p.101 – 108 , 2004.



PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C.S.O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronucleus test on three Amazonian fish species. **Environmental Research**. v. 97. p. 287-292. 2005.

PRICE R.B.T. Light Curing in Dentistry. **Dental clinics of North America**.v.61, n.4, p.751-78, 2017.

RAHIOTIS C.; KAKABOURA, A.; LOUKIDIS, M.; VOUGIOUKLAKIS, G. Curing efficiency of various types of light-curing units. **European Journal of Oral Sciences**.v.112, p.89 - 94, 2004.

RAYMUNDO, T.M.; FAVILLA, M.; NIERO, R.; ANDRADE, S.F.; MAISTRO, E.L. Genotoxicity of the medicinal plant *Maytenus robusta* in mammalian cells in vivo. **Genetics and Molecular Research**., v.11, n.3, p.2847 – 2854, 2012.

RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 21-28, 2003.

RIBEIRO, E.L.; PESSOA, M.B. Os efeitos da radiação eletromagnética na vida dos ser humano: uma análise de paradigma ambiental. **Revista de tecnologia e sociedade**.p.15 – 31, 2007.

ROCHA, R.D.S. **Avaliação da genotoxicidade de extratos de boldo (*Plectranthus ornatus*) e graviola (*Annonamuricata*) através do ensaio cometa e do teste de micronúcleo em linfócitos humanos**. 2016. 85f. Tese (Doutorado Acadêmico em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.

RODRIGUES, R.R. **Acolhimento, uma ferramenta usada na organização e planejamento das atividades da equipe de saúde bucal**. 2011. 24f. Monografia (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família). Curso de Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família, Universidade Federal de Minas Gerais, Araçuaí, 2011.

RODRIGUES NETO, E.; ELOSSAIS, A.A.; CHAVEZ, O.F.M.; PEREIRA, N.R.S.; SILVA, P.G.; SAAD, J.R.C. Estudo comparativo de aparelhos fotopolimerizadores para determinar o grau de conversão de resinas compostas utilizando o espectrofotômetro de infravermelho. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 55, n.4, p. 357- 361, 2007.

RUEGGERBERG, FA. State-of-the-art: dental photocuring--a review. **Journal Dental Materials**.v.27, p.39 - 52, 2011.

SAMPAIO, J.; TREMÉA, R.; MARCO, M.G.; VIEIRA, R. B.; TACCA, J.A.; STROHER, D.J.; PLIAR, B.C.; GULLICH, A.C.; SCHWANZ, M.; MANFREDINI, V. Estudo da genotoxicidade in vitro e in vivo após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St. – Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, v.10, n.4, p.462 – 467, 2012.

SAMANTA, S; DEY, P. Micronucleus and its applications. **Diagnostic Cytopathology**. v. 40, n. 1, p. 84-90, 2012.

SANCAR, A.; LIDSEY BOLTZ, L.A.; UNSAL KACMAZ, K.; LINN, S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. **Annual review of biochemistry**.v.73, n.1, p.39 – 85, 2004.

SILVA J. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora alcance, p. 422, 2003.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. **Genética na Escola**. v.2 , n.2, p.30-33, 2007.

SILVA, D. T. C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e mutagênica de microemulsão tópica contendo óleo de copaíba**.2014. 30f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Setor da Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande , 2014.

SILVA, J.; ERDTMANN B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora alcance.p.422 – 430, 2003.

SILVA, F.F. **Proposta de metodologia para avaliação do processo tecnológico de fotopolimerizadores em serviço de odontologia em atenção primária**.2019. 87f. Monografia (Graduação em Engenharia Eletrônica) – Departamento de Engenharia Elétrica e Eletrônica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

SILVA, D.T.C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e mutagênica de microemulsão tópica contendo óleo de copaíba**. 2014. 30f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Setor da Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**.v.175, p.184 – 191,1988.

SOARES, C.C.P.; PEÇANHA, M.M.; BATITUCCI, R.G.; NETO, R.G.; BATITUCCI, E.; BATITUCCI,M.H.G.Eficácia da polimerização de uma resina composta fotopolimerizada por aparelhos de luz halógena e LED da Clínica Integrada do curso de Odontologia da UFES. **Revista Odontológica**., v.7, n.3, p.58-65, 2005.

SOUZA, P.C. **Modelo experimental de imunossupressão com ciclofosfamida em Rattus Norvegicus da linhagem wistar e primatas não humanos da espécie Cebus Apella: Análise genotóxica**. 2011. 80 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) Programa de Pós Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A.A.G. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista Destaques Acadêmicos**.v.5, n.3, p.1 – 12, 2013.

SCHMID W. The micronucleus test. **Mutation Research**.v.19, p.9-15, 1975.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON,B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE,Y.; ROJAS, E; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. IX Fórum Ambiental da Alta Paulista, v. 9, n. 11, 2013, pp. 399-417 gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-21, 2000.

TOLBERT, P.E.; SHY, C.M.; JAMES, W.A. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. **Mutation Research**. v.271, n.1, p.69 – 77, 1991.

UDROIU, I.; SGURA, A.; VIGNOLI, L.; BOLOGNA, M.A.; AMEN, M.D.; SALVI, D.; RUZZA, D.; RUZZA, A.; ANTOCCIA, A.; TANZARELLA, C. Micronucleus test on *Triturus carnifex* as a tool for environmental biomonitoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis Environ Mol Mutagen**, v. 56, n. 4, p. 412-417, 2015.

VELUDO, P.C. **Efeitos da radiação X e níveis de exposição em exames imagiológicos**: inquéritos a clínicos gerais. 2011.65f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Curso de Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, 2011.

ZAPATA, L.M.; BOCK, B.C.; OROZCO, L.Y.; PALACIO, J.A. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 108-116, 2016.

YOSHIDA, A.F.; YOSHIDO, F.; MAKITA, T.; MAEHATA, Y.; HIGASHI, K.; MIYAMOTO, C.; WADA – TAKAHASHI, S.; TAKAHASHI, S.S.; TAKAHASHI, O.; LEE, M. C. Production of reactive oxygen species in mitochondria of human gingival fibroblasts induced by blue light irradiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**.v.129, p.1 – 5, 2013.

WUNDERLICH JUNIOR, A.E.; SIQUEIRA, D.F.; SCANAVINI, M.A.; KANASHIRO, L.K. Avaliação da potência de fotopolimerizadores à LED utilizados em consultórios. **Ortodontia - Sociedade Paulista de Ortodontia**. v.42, n.2, p.95 -100, 2009.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A - ARTIGO

### DENTAL CURING LIGHT: NON-IONIZING ELECTROMAGNETIC RADIATION AND ITS POSSIBLE GENOTOXIC EFFECTS

Michele de Sampaio Sousa<sup>1,2</sup>, Laryssa Roque da Silva<sup>2</sup>, Dannel Cabral Leão Ferreira<sup>2</sup>, Fabrício Pires Moura do Amaral<sup>2</sup>, RosemarieBrandim Marques<sup>2</sup>, Antonio Luiz Martins Maia Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Master's degree student in Biotechnology Program on Human and Animal Health, State University of Ceará, Fortaleza - Ceará, Brazil.

<sup>2</sup> Biotechnology and Biodiversity Research Center, State University of Piauí – UESPI, Teresina – Piauí, Brazil.

Corresponding Author:

Michele de Sampaio Sousa

Address: Boulevard Gonalo Rodrigues Magalhães, 2060 B. F tima

Piracuruca \ Zip Code: 64240.000

E-mail: [michelesampaio@hotmail.com](mailto:michelesampaio@hotmail.com)

Phone number: 86 99825-9103 / 86 3343-1094

**Abstract:** The Dental curing light is an essential device in clinical practice of the surgeon-dentist, being responsible for ensuring the success of dental restorations. In the literature, there are few studies evaluating the existence of genotoxicity by the use of the Light-Emitting Diode (LED) photopolymerizer in dental clinics.

**Objective:** In this scientific study, we aimed to evaluate genotoxic effects in rats (*Rattus norvegicus*), related to different periods of exposures to the LED curing light. In the genotoxicity evaluation, the rats received lights from the LED photopolymerizer for 40 sec, 10 min and 7-and-a-half minutes, while the negative and positive control groups were treated with distilled water and cyclophosphamide by intraperitoneal, respectively. A sample of peripheral blood was collected from the animals for the comet assay. The bone marrow was collected from each rat for the micronucleus test.

**Results:** It was observed that in the comet assay and micronucleus test, the animals exposed to LED for 10 min, showed genotoxic damage, and they have not presented toxicity degree in the periods of 40 sec and 7-and-a-half minutes.

**Conclusion:** It is possible to conclude that, there was genotoxic effects on the animals' teeth when exposed to the LED curing light in 10 min. However, in the periods of 40 sec, and 7- and-a-half minutes, have been not observed genotoxic effects. This means these times are safe for professional dentists in clinical care.

**Clinical significance:** This scientific study, has shown that time used of photopolymerization device by the dental surgeon, should be controlled to perform your profession with safety.

**Keywords:** Photopolymerizer; Genotoxicity; Comet assay; Micronucleus; Non-ionizing radiation.

## 1. INTRODUCTION

The Dental curing light is an essential instrument for the dental surgeon at dental restorations. Photopolymerization consists in activating the polymerization reaction of resinous material when exposed to a light source. It begins by the light absorption from a photo-initiator, usually camphorquinone (1).

Camphorquinone is the photo-initiator present in most of composed resins available on the market and it is capable to absorb energy into the specific wavelength of light, where initiates the polymerization process. The polymerization of photoactivated composed resins by visible light, begins when camphorquinone is exposed to light with a wavelength varying from 450 to 500 nanometers(nm), absorbing the photons, so that enter in a reactive state (2).

Dental curing light devices are differentiated by the type of light source used, by its variation in the wavelength interval, and by the type of pulse and light intensity (3). Light is measured in wavelengths and expressed in units of nanometers. The wavelengths are often designated according to their associated color, such as: blue color (ranges from 400-700 nm); green color (ranges from 470-550 nm); red color (ranges from 630-700 nm) and the infrared (ranges from 700- 1200 nm). In general, the longer is the wavelength, deeper is the tissue penetration (4).

In relation to photopolymerization, so many factors may influence in the success or failure of resinous materials in the oral cavity (5). Therefore, the photoactivation process depends of the irradiation (mW/cm<sup>2</sup>) emitted by the light source and the exposure time. If dental materials do not receive enough energy, the degree of monomer conversion will be low, resulting in a possible increase in cytotoxicity, as well as a reduction in hardness and elastic modulus (6).

The identification and study of the action of a physical, chemical or biological agent that can cause any type of damage to the genetic material, refers to genotoxicity. Genotoxicity tests provide an indication of changes associated with deoxyribonucleic acid (DNA), DNA breaks or mitotic anomalies (7).

There is a great difficulty to obtain in the literature, toxicological effects caused by the use of the LEDs curing light over the biological tissues of the people.

However, dentists should be conscious that radiation absorbed by endogenous and exogenous substances that accumulate in the eyes and skin(hands) of the operators, as well as in oral mucosa of the patients might cause different phototoxic and photoallergic reactions (8).

Health care workers are exposed to the same risks (chemical, physical and ergonomic) as other workers in general way. Changes have been happening recently in the risk behaviors concepts, in relation to the biosafety of health professionals, which required alterations in the Standard Operating Procedures (SOP), with the purpose to establish the basic guidelines for health and safety measures implementation to protect workers (9, 10).

Faced with this perspective, taking into consideration the interest in verifying the light interaction over the patient's dental organ, hands and eyes of the professional dentist in clinical care, the objective of this scientific study was evaluate the occurrence of genotoxic alterations through the light emitted by the LED photopolymerizer in different periods of time, as well as establish a minimum time necessary of light exposure for the no appearance of toxicity, using the comet and micronucleus assays. Therefore, the hypothesis of this research is that the LED curing light causes a genotoxic action in *Rattus norvegicus*.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Ethical Procedures

This present research followed the guidelines recommended by the Law 11.794 of the Ethics Committee on Animal Use, and was submitted for approval by the Committee on Animal Research and Ethics of the *Universidade Estadual do Piauí*, under Protocol number 01060/2018.

### 2.2 Animals and Research Location

In this study, an *in vivo* test was carried out to evaluate possible genotoxic effects in *Rattus norvegicus* in exposure to the LED photopolymerizer at the *Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade* in Teresina - Piauí.

The sample was consisted by 120 rats (60 males / 60 females), weighing 200g to 250g from the "*Biotério*". All the animals were kept at collective cages (03 in each box) separated by gender, with normal diet and water ad libitum in an environment at 25 °C.

The rats were divided into three groups: positive and negative control groups and the experimental groups of non-ionizing exposure to the LED curing light, in periods of 40 sec, 10 min and 7-and-a-half minutes.

In the 24 animals for the control with positive parameter (cyclophosphamide 50 mg / kg), was administered by intraperitoneally and for the control with negative parameter (distilled water), was administered the same dosage as the positive control for more 24 animals, totaling 48 animals for the comet and micronucleus assay.

In the experimental groups, the animals were submitted to the LED curing light under the upper anterior teeth. The animals were exposed for 40 sec representing the patient, others animals were exposed for 10 min representing the dental surgeon and in other period in which the animals were exposed for 7 and-a-half-min, the dental surgeon was represented again.

In the period of 40 sec, both for the comet and micronucleus assay, was used 24 animals. In the 10 min, for the tests mentioned above, was used 24 animals



and in the time of 7 and-a-half-min was used more 24 animals. In this research was totaled 72 animals in the experimental groups.

### **2.3 Applications of Light Emitting Diode**

Initially, all the animals were anesthetized with Xylazine (5 to 10 mg / Kg) combined with Ketamine (60 to 75 mg / Kg) for improve muscle relaxation, and analgesia for duration of the effect.

After anesthesia, the rats of the experimental groups (periods of 40 sec, 10 min and 7-and-a-half-min) were removed from the cages and placed in a plastic tray, in which was used a needle-holder to facilitate the opening of the mouth and also for the LED exposure. During the application of the light, the optical top of the LED curing light was kept leaned in the animals' upper central incisor teeth and the device remained stationary with a help of a holder, where the operator was only necessary to activated the time exposure for each animal.

At each period of one-minute exposure, one-minute of interval was realized, followed by a new exposure minute, and so on, until was completed the predetermined time for each group (8).

### **2.4 Sample preparation**

#### **2.4.1 Comet Assay**

The Comet assay was carried out with peripheral blood retired from the animal's tail, after 4 hours of exposure(damage) and after 24 hours of exposure(repair). At the end of each period, was collected 40uL of this sample and transferred to microtubes containing 120uL of agarose (1.5%) at 37 °C. That mixture was homogenized and transferred to pre-coated microscope slides with 5% agarose. After that, the slides were covered with coverslips and placed on the refrigerator for 20 min at 30 °C. The coverslips were removed and the slides were immersed in a lysis solution (1ml of Triton X-100 and 10ml of DMSO) during 1 hour in the dark at 3 °C.

The slides were placed in an electrophoresis trough and neutralized. They were dried and fixed with 100% ethanol for 10 min and stored for subsequent analysis. Finally, the slides were stained with Gel Red and covered with a coverslip.

The slides were prepared in duplicates by using an immunofluorescence microscope (40x magnification) in a blind assay and was used a 420- 490 nm filter and a 520 nm barrier filter, then, 200 cells per animal have been counted (100 for acute exposure /100 for chronic exposure). This test analyzes the DNA through the stature of tail, which is a proportional parameter to the size of the damage caused, where the mere visualization of the comet, already identifies DNA damages.

The DNA damage detection can be done in different ways, e.g.: measure the length of a fragmented migrant DNA with a measuring eyepiece, or rank visually in different levels the cells damage analyzed, obtaining arbitrary value which expresses the general damage suffered by a cell population (10).

For interpretation of results, the DNA damage was evaluated by the percentage of DNA measure in the tail (% of DNA - measure of the proportion of total DNA present in the tail) and the tail length (tail length times the percentage of DNA in the tail). These parameters were calculated in 100 nucleiodes / sample. For this, it was used the Open Comet software (11, 12).

#### 2.4.2 Micronucleus Test

Bone marrow cells were collected immediately after the animals' euthanasia. For this, a syringe (01 mL) was filled with fetal bovine serum (FBS) and the needle was inserted into the aperture of one end of the femur, thus, the fetal serum was spilled through the canal, pushing towards other side the medullary component, where was the Falcon tube, previously marked with animal's code. Then, the marrow material in fetal bovine serum was resuspended until reaches homogeneity. The suspension was centrifuged by 5 min at 1,000 revolutions per minute (RPM), excluding the supernatant with a Pasteur pipette at the end of the procedure. The sample was completed with fetal bovine serum (0.5 mL), and suspended until its homogenization. The smears were prepared by adding 02 drops of the suspension in a slide (previously marked with the animal's code) with help of another slide (2 slides per animal) at a 45 degree angle, being dried at open air. Staining was performed 24 h after the slides confection in Giemsa for 3 min, and the

analysis was accomplished in a blind field by using an optical microscope at 100x magnification (immersion objective) in a short period of time by the same observer. Micronuclei frequency was determined in 2,000 cells of polychromatic erythrocytes per animal. (13,14,15).

## **2.5 Data Organization and Analysis**

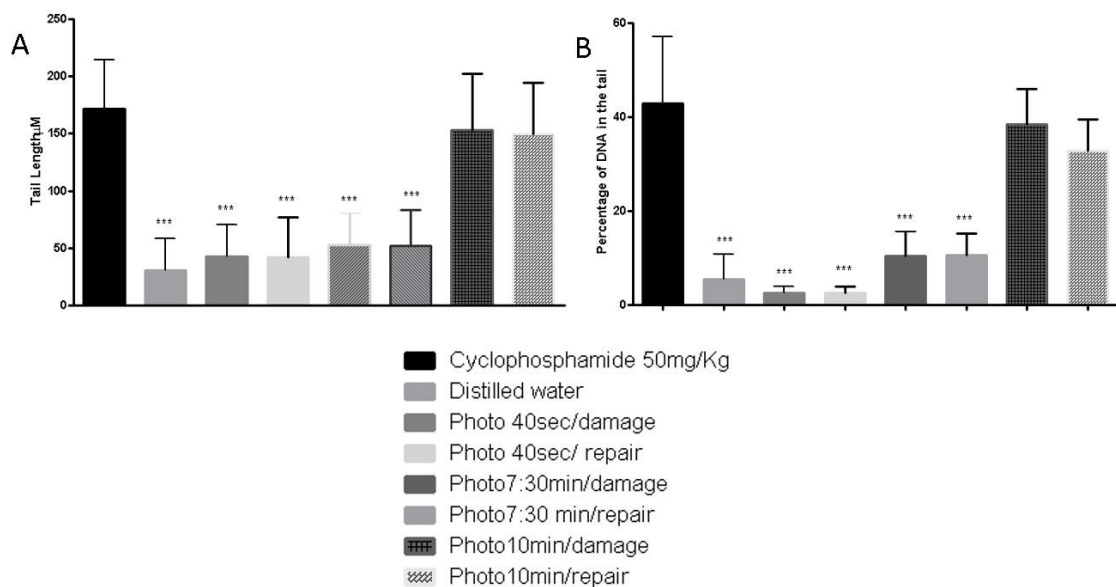
The collected data were analyzed by the Graph Pad Prism software version 5.0 for the submission of the statistical analysis using the One - Way ANOVA and the Student t-test. The results were expressed as averages, that is, standard deviation of the three independent experiments. For all tests, a significance level of 5% was considered. The result was considered positive when there was a statically significant increase ( $p < 0.05$ ).

### 3. RESULTS

According to Figure 1, it is possible to observe the records of the DNA tail lengths and the percentages of DNA in the tail after analysis of the animals in the Open Comet software, respectively, in exposures of 40 sec, 10 min and 7-and-a-half-minutes.

The statistical test of the comet demonstrated that there was a significant difference, showing the exposure time of 10 minutes to the photopolymerizer (both in damage and repair) had genotoxic effects in rats, but there were no significant differences in the negative control group and in groups treated with LED curing light in 40 sec and 7-and-a-half-minutes.

Figure 1. Records of tail lengths(A) and percentages of DNA in the tail(B) after analysis of the treated animals in the Open Comet software, respectively, with cyclophosphamide (50mg / Kg), distilled water and exposures to the photopolymerizer for 40 sec, 10 min and 7-and-a-half-minutes.



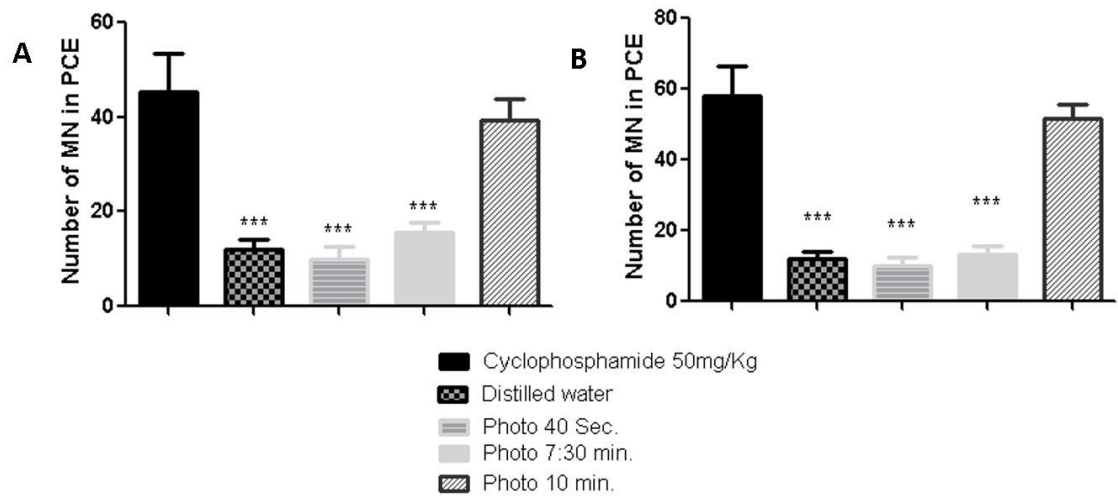
Subtitle: \*\*\* =  $p < 0.001$  when compared to Cyclophosphamide group (50mg / Kg)

Figure 2 presents micronuclei averages found in 2,000 polychromatic erythrocytes, after exposures of 40 sec, 10 min and 7-and-a-half-minutes.

The statistical test of the micronucleus demonstrated that the exposure time of 10 min to the LED curing light (acute and chronic exposure) presented toxicological effects in the rats in comparison to cyclophosphamide, which is a toxicological

parameter. However, there were no significant differences in the negative control groups and in the treated groups for 40 sec and 7-and-a-half-minutes in micronucleus exposure (acute and chronic).

Figure 2. Micronuclei average found in 2,000 polychromatic erythrocytes after acute exposure(A) and chronic exposure(B) of the treated animals, respectively, with cyclophosphamide (50mg / Kg), distilled water, and exposures to the photopolymerizer for 40 sec, 10 min and 7-and-a-half-minutes.



Subtitle: \*\*\* =  $p < 0.001$  when compared to Cyclophosphamide group (50mg / Kg)

#### 4. DISCUSSION

In this study, was evaluated genotoxic effects in the rats' teeth on blue LED curing light exposure, confirming with the research in which the epithelial cells of human retinal pigment were exposed to different LEDs radiations of different colors that varied from blue color with 468 nm wavelength, green color with 525 nm, and red color with 616 nm. The wavelength in the white color was not mentioned in this research. It was observed that LED blue light exposure decreases cell viability from 75 to 99%; increased cell death from 66% to 89%; increased the production of reactive oxygen species and DNA damage (16,17).

Meanwhile, in another study is reported that light emitted by the LED above 400 nm is not harmful to the hand's skin of professionals and dental assistants or to the patient's oral tissues. This is explained or by the presence of optical filters or by the light transmission system or by the way they are used as well (8).

The LED-based devices were launched with the main objective of emitting cool light, but was confirmed in this study that when the device has a high light intensity, it also produces a rising on the temperature, losing its main advantage, which is the no heat emission. This statement is in agreement with the research in which the epithelial cells of the retinal and the bronchial epithelial cells were exposed to different types of lamps, such as: incandescent lamps, halogen lamps, warm and cool LEDs lamps. The results presented the cool LED lamps caused a slight significant genotoxic damage after 4 hours of exposure to the photopolymerizer, being equivalent to the present research in which was used the cool blue light LED and was observed genotoxic damage in 10 min of exposure to the curing light (18).

The non-ionizing electromagnetic radiation of LED is absorbed by the skin and deeper levels of the body, dissipating profoundly. It may cause temperature increase not perceived by the natural thermal sensors located on the surface. The internally heating generated depends on the time exposure, the field strength, the tissue thickness, and sometimes it cannot be compensated by the organism, causing biological effects (19).

In a study that used the Transmission Electron Microscopy(TEM), was observed that only the mitochondria of gingival fibroblasts was damaged by blue LED curing light in more than 5 minutes in a dental treatment, increasing the cytotoxic effect of reactive oxygen species(ROS) in soft tissues of the mouth, and that light is

richer in radiation when the wavelengths is shorter than 500 nm, inducing to higher cytotoxicity (17).

The use of photopolymerizable equipments have been increased significantly in recent years in professional dental practice, due to the elevated number of studies about its optimization, powers more adequate and times of necessary operation for each procedure. However, relative studies to occupational risks from these techniques are still scarce, making this field poor in specific legislation and literature. The Unhealthy Activities and Operations (NR-15) instituted by the Ministry of Labor and Employment, establishes as unhealthy activities those that expose workers to non-ionizing radiations, but do not specify maximum exposure limits (9).

The Directors' Collegiate Resolution (RDC-185) classifies into 4 categories the risk of medical and dental equipment, and the current models of photopolymerizer are part of risk category II, being of medium risk for individuals involved with these equipments (20).

All the occupational risks of dental care can be minimized by the using of personal and collective protection equipment, in compliance with Regulatory Norm(NR-32) that establishes basic guidelines for the protection implementation for the safety and health of workers in health services, adopting health promotion and prevention measures, such as the correct use of the equipment, following the ergonomics law and adequate environment (21).

## **CONCLUSION**

In view of the results obtained, taking into consideration the exposure time used in this research, it's possible to conclude that the light emitted by the LED photopolymerizer presented genotoxic effects in a period of 10 minutes. In the experimental groups were not observed genotoxic effects in periods of 40 sec and 7-and-a-half-minutes to the LED photopolymerizer, suggesting that times are safe for the dental surgeon and your assistant during clinical care.

### **Competing Interest Statement:**

The authors declare no conflict of interest.



## REFERENCES

- [1] Oliveira, L.I.M. **Avaliação do desempenho dos seus aparelhos fotopolimerizadores.**[Performance evaluation of your curing-light devices] Dissertação de Mestrado (Mestrado Integrado em Medicina Dentária) Porto, 2014.
- [2] Franco, J.De. M. **Avaliação da Eficácia do Led na fotoativação de diferentes resinas compostas.**[Evaluation of Led Effectiveness in photoactivation of different composed resins] Dissertação de Mestrado (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.
- [3] Soares, C.C.P. *et al.* **Eficácia da polimerização de uma resina composta fotopolimerizada por aparelhos de luz halógena e LED da Clínica Integrada do curso de Odontologia da UFES.**[Efficiency of the polymerization of a composed resin curing-light by halogen and LED devices from the Integrated Clinic of the Dentistry of UFES course.] Revista Odontológica.v.7, n.3, p.58 – 65, 2005.
- [4] Gonçalves, P.M. **Terapia fotodinâmica uma alternativa antimicrobiana coadjuvante no tratamento periodontal.** [Photodynamic therapy an antimicrobial alternative in periodontal treatment] 2010. 51f. Monografia (Especialização em Periodontia) – Colegiado do Programa de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- [5] Assis, C. **Instruções e cuidados com a fotopolimerização do dia a dia.** [Instructions and care for curing-light of day-to-day] Revista Brasileira de Odontologia, v.71, n.2, Rio de Janeiro, 2014.
- [6] Guiraldo, R. D.; Berger, S.B.; Consani, S. *et al.* **Fenômenos relacionados à fotoativação dos compósitos restauradores odontológicos.** [Phenomena related to photoactivation of dental restorative composites] Journal of Oral Investigations, v.3, n.1, p.10 – 16, 2014.
- [7] Barreto, A. R. S. **A genotoxicidade dos biomateriais em medicina dentária.** [Genotoxicity of biomaterials in dental medicine] Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Dentária) – Universidade do Porto, 2012.
- [8] Petroucic, F. *et al.* **Efeitos da Luz visível emitida por um aparelho fotopolimerizador sobre a pele do lábio de coelhos.** [Effects of visible light emitted by a photopolymerizer on the skin of rabbits' lips] Revista Odontológica da UNESP , v.33, n.3, p.101 – 108 , 2004.
- [9] Brasil. **NR-15 Atividades Insalubres (115.000-6)**, Ministério do Trabalho e Emprego, Portaria SIT n.º 203, de 28 de janeiro de 2011. **NR-32 Segurança e Saúde do trabalhador em serviços de saúde.** Ministério do Trabalho e Emprego, Portaria SIT n.º 203, de 28 de janeiro de 2011. Portaria GM n.º 1.748, de 30 de agosto de 2011.
- [10] Neri, M. *et al.* **Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study.** Mutagenesis.v.30, p.155 – 163, 2015.

- [11] Kumaravel, T.S.; Vilhar B., Faux, S.P.; Jha, A.N. Comet assay measurements: a perspective. ***Cell Biol Toxicol.* v.25 (1), p. 53-64, 2009.**
- [12] BM Gyori, G. Venkatachalam, PS Thigarajan, D. Hsu e M.Clement. **Open Comet: Uma ferramenta automatizada para ensaio de cometas análise de imagem.** [Open Comet: An automated tool for comet testing and image analysis] *Redox Biology.* v.3, p.457 -465, 2014.
- [13] Hayashi, M. *et al.* **In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay.** *Mutation research* v.312, p.293 -304, 1994.
- [14] Hayashi, M. *et al.* **The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine Orange – coated slides.** *Mutation research.* v.29, p.187 – 197, 2010.
- [15] Hamada, S. *et al.* **Evaluation of the repeated – dose liver and gastrointestinal tract micronucleus assays with 22 chemicals using young adult rats:** Summary of the collaborative study by the collaborative study group for the micronúcleos test (CSGMT)\ The Japanese Environmental. *Mutation Research\ Genetic Toxicology and Environmental. Mutagenesis.* v.780, p. 2 – 17, 2015.
- [16] Gea, M. *et al.* **Cytotoxicity and genotoxicity of light emitted by incandescente, halogen, and LED bulbs on ARPE – 19 and BEAS – 2B cell lines.** *Journal Toxicologico Environ Health.* v.81, p.998 – 1014, 2018.
- [17] Yoshida, A.F. *et al.* **Production of reactive oxygen species in mitochondria of human gingival fibroblasts induced by blue light irradiation.** *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology.* v.129, p.1 – 5, 2013.
- [18] Silva, D.T.C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e mutagênica de microemulsão tópica contendo óleo de copaíba.** 2014.30f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Setor da Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2014.
- [19] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Serviços Odontológicos: Prevenção e Controle de Riscos** [Dental Services: Prevention and Control of Risks] / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.
- [20] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n.185, de 22 de outubro de 2001.** Registros de Produtos Médicos, 2001. Dispõe sobre orientação, sobre registro, cadastramento, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos. Brasília, 2001.
- [21] Costa, A.K.G, Paz C.R.P. **Equipamentos de proteção individual** [Individual protection equipment]. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Serviços odontológicos: prevenção e controle de riscos.** Brasília, DF: Editora Anvisa. cap. 7, p. 69-74, 2006.

**ANEXOS**

## ANEXO A - CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAIS



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



## CERTIFICADO

protocolo número 0160/2018, sob responsabilidade de *Antonio Luiz Martins Maia Filho*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

VIGENCIA DO PROETO	11 MESES
ESPÉCIE /LINHAGEM	RATO HETEROGÊNICO
N. DE ANIMAIS	100
PESO/IDADE	250g/2 meses
SEXO	MACHO
ORIGEM	Biotério

TERESINA, 09 DE MARÇO DE 2018

  
 Dr. Francisco Araújo  
 Sub-Coordenador CEUA/UESPI  
 Portaria Nº 1347 - 20/11/14  
 CRMV - 0415/17