



Editorial

Genotoxicidad por tratamiento con ortodoncia fija

Nadia Mabel Pérez-Vielma¹, Maritere Domínguez-Rojas²,
Sheila Verónica Mendoza-Tapia¹, Lucia Angeles-Estrada³,
Virginia Sánchez-Monroy⁴

- ¹. Centro Interdisciplinario de Ciencias de la Salud Unidad Santo Tomás, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.
- ². Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México
- ³. Unidad de Especialidades Odontológicas, Secretaría de la Defensa Nacional, Estado de México, México
- ⁴. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

Autor de correspondencia

Virginia Sánchez Monroy
E-mail: vickysm17@hotmail.com

Recibido: marzo 2023

Aceptado: enero 2024

Citar como:

Pérez-Vielma NM, Domínguez-Rojas M, Mendoza-Tapia SV, Angeles-Estrada L, Sánchez-Monroy V. Genotoxicidad por tratamiento con ortodoncia fija. [Genotoxicity of Fixed Orthodontic Treatment]. *Rev Odont Mex.* 2023; 27(4): 3-11. DOI: 10.22201/fo.1870199xp.2023.27.4.85376

Resumen

Introducción: el tratamiento de ortodoncia fija implica el uso de materiales, incluyendo metales que pueden generar daños celulares como alteraciones genéticas durante la división celular, algunas de ellas como la presencia de micronúcleos (MN), la oxidación de del ácido desoxiribonucleico (ADN) y su degradación. **Objetivo:** evaluar el daño genotóxico por la terapia de ortodoncia fija con metales. **Material y Métodos:** se evaluaron las células epiteliales bucales de 51 pacientes antes y un año después de la colocación de tratamiento de ortodoncia fija con Brackets Dentaurem Equilibrium 2, de acero inoxidable. Se analizó la frecuencia MN por tinción de Feulgen, se realizó

extracción de ADN con el kit DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen Ltd) y se observó la degradación de ADN por electroforesis. Además, se evaluó la oxidación del ADN por cuantificación de la molécula de 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG) mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) de la marca Enzo life sciences. **Resultados:** se detectó incremento de la frecuencia de MN en las células epiteliales bucales al comparar los resultados antes (0%) y después del tratamiento (18%) ($p < 0.004$). La degradación de ADN también incrementó, detectando un 45% de muestras degradadas antes del tratamiento y 88% después del tratamiento ($p = 0.002$). La concentración de 8-OHdG se incrementó aproximadamente al doble después del tratamiento (13.6 ± 1.2 ng/mL) en comparación con la medición previa al tratamiento (5.8 ± 0.49) ($p = 0.04$). **Conclusiones:** los resultados presentados aquí demuestran daño en el ADN después de un año de la terapia de ortodoncia fija con metales.

Palabras clave: ortodoncia fija, 8-hidroxidesoxiguanosina, ADN, micronúcleos.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento de ortodoncia fija empleando materiales que se fabrican a partir de metales implica la generación de corrosión de éstos en la cavidad bucal, lo cual puede causar efectos en las células epiteliales bucales que incluyen daño al ácido desoxiribonucleico (ADN), lo que representa un impacto importante ya que pueden iniciar lesiones malignas¹.

El daño por metales en la molécula de ADN puede ser directamente por hidrólisis del enlace fosfodiéster generando fragmentación de la molécula²⁻⁴ o bien, de forma indirecta, inhibiendo mecanismos de reparación al ADN⁵ o por procesos de oxidación que generan especies reactivas que oxidan al ADN⁶⁻⁷. El daño oxidativo causa lesiones en el ADN; la más frecuente es la oxidación en sus bases nitrogenadas, en especial sobre la guanina que se oxida más fácilmente formando la 8-hidroxidesoxiguanosina (8-OHdG). Dicha molécula es considerada como uno de los biomarcadores más significativos para daño oxidativo del ADN⁸. Buljan *et al.*⁹ demostraron incremento de 8-OHdG en líneas celulares de ratón expuestas durante 48 h a materiales utilizados en tratamientos de ortodoncia. Los trabajos realizados *in vivo* en humanos investigando el daño oxidativo en el ADN inducido por el tratamiento de ortodoncia fija y cuantificación de 8-OHdG son limitados, controversiales y solo evalúan tiempos menores y de hasta 6 meses posteriores al tratamiento¹⁰⁻¹². Guler *et al.*¹⁰ demostraron incremento de 8-OHdG en saliva de niños después de 3 meses de tratamiento de ortodoncia fija con metales y diferentes materiales de adhesión. En contraste, Atug Özcan *et al.*¹¹ no detectaron cambios de los niveles de 8-OHdG en saliva y líquido crevicular gingival después de 6 meses del tratamiento ortodónico. De igual manera, Esenlik *et al.*¹² realizaron evaluaciones a los 7 días de iniciado el tratamiento ortodónico con metales y no detectaron cambios en niveles de 8-OHdG.

A nivel celular, la presencia de núcleos pequeños o micronúcleos (MN) que se forman a partir de cromosomas o fragmentos de éstos cuando no se incorporan a uno de los núcleos de la célula hija durante la división celular, es uno de los ensayos más utilizado para evaluar el daño al ADN¹³. Una revisión reciente exploró el promedio de incremento de los MN por el uso del tratamiento de ortodoncia fija y detectó que el incremento de MN fue 3 veces mayor con respecto a las células epiteliales bucales sin tratamiento ortodónico¹⁴. En relación al tiempo de exposición al procedimiento, los MN se han analizado desde 7 días hasta 6 años posteriores al

tratamiento; observando que el daño inicia a partir de la primera semana de colocación, pero sugiere que puede disminuir con el tiempo de exposición^{15,16}.

A nivel institucional, en la Secretaría de la Defensa Nacional, el tratamiento ortodóntico utilizado en los últimos 15 años en la Unidad de Especialidades Odontológicas (UEO) es la Aparatología Ortodóntica Fija basada en la técnica MBT. La filosofía MBT pertenece a la tercera generación de aparatología preajustada, creada a partir del conocimiento y la experiencia clínica de los doctores Richard McLaughlin y John Bennet¹⁷. El presente estudio evaluó el daño al ADN mediante análisis de frecuencia de MN, visualización de degradación de ADN mediante electroforesis y cuantificación de la molécula 8-OHdG antes y después de un año de la colocación de ortodoncia fija.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron pacientes que acudieron al servicio de Ortodoncia de la UEO en la Secretaría de la Defensa Nacional. Se seleccionaron 51 pacientes candidatos a tratamiento de ortodoncia de edades entre 12 y 36 años, sin caries, sin tratamientos previos de ortodoncia, ni enfermedad periodontal y sin restauraciones metálicas. Se emplearon los insumos ortodónticos proporcionados en la UEO basados en MBT 0.022" y que incluyeron: Brackets de acero inoxidable (Equilibrium[®] 2, Dentaaurum GmbH & Co. KG, Ispringen, Alemania), bandas con tubo bucal (3M[™] Unitek[™], Victory Series[™] Bands, 3M[™], Minnesota, Estados Unidos) con contorno anatómico de acero inoxidable, minitubos para bondear de acero inoxidable (3M[™] Victory Series[™] Mini Tubes, 3M[™], Minnesota, Estados Unidos), Arcos de nitinol termoactivado (3M[™] Unitek[™] Nitinol Heat-Activated Archwire, 3M[™], Minnesota, Estados Unidos) calibres: 0.014", 0.016", 0.016x0.022" y 0.019x0.025", Arcos de acero inoxidable 0.019x0.025", Arcos trenzados de acero inoxidable multifilamentos 0.019x0.025" (Dentaflex[®], Dentaaurum GmbH & Co. KG, Ispringen, Alemania), ligadura de alambre de acero inoxidable 0.010", alambre de latón 0.021", y resorte de apertura de nitinol.

Los pacientes y tutores legales de pacientes menores de edad aceptaron voluntariamente participar en el estudio y firmaron la carta de consentimiento informado y, los menores de edad firmaron una carta de asentimiento informado. El comité institucional de la Unidad de Especialidades Odontológicas en la Secretaría de la Defensa Nacional aprobó el protocolo y el consentimiento informado (número de aprobación 19CI09016025). Se tomaron dos muestras de las células epiteliales bucales de cada uno de los pacientes con ayuda de un cepillo citológico. Una muestra se utilizó para el análisis de MN y otra para extracción de ADN. La recolección de la muestra se realizó antes de la colocación del tratamiento y posteriormente al año del procedimiento.

Las muestras de células epiteliales bucales se obtuvieron después de enjuagar la cavidad oral con agua, raspando suavemente la mejilla derecha e izquierda con el cepillo citológico. Para el análisis de MN la muestra se extendió sobre un portaobjetos limpio, y se fijó con etanol durante 10 minutos. Finalmente, se realizó la tinción de Feulgen. Después de la tinción, las células se examinaron bajo un microscopio óptico (VE-B2 Binocular Microscope, VELAB Co., Texas, Estados Unidos). Los portaobjetos se prepararon por triplicado para cada paciente, y de la misma manera, para cada uno se contaron 2000 células epiteliales para evaluar la frecuencia de MN. Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial (DNeasy[®] Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Alemania), se siguió el protocolo de extracción considerando las sugerencias del fabricante. La concentración de ADN se midió en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Fisher

Scientific Inc., Delaware, Estados Unidos) y se ajustó a 50 ng/mL, posteriormente se realizaron corrimientos electroforéticos del ADN en geles de agarosa al 1.5% para evaluar su integridad. La oxidación del ADN se evaluó en las muestras de ADN por cuantificación de la molécula 8-OHdG mediante la técnica de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) con un kit comercial (DNA damage ELISA kit, Enzo® Life Sciences Inc., New York, Estados Unidos), siguiendo el protocolo y todas las recomendaciones del fabricante. El rango de detección fue de 0.94 a 60 ng/mL.

El análisis estadístico se realizó con el programa de IBM®-SPSS versión 23, se utilizó la prueba de McNemar para evaluar diferencia de frecuencias de MN y degradación de ADN antes y después de un año de tratamiento. Se realizó comparación de medias de los niveles de concentración de la molécula 8-OHdG, antes y después de un año del tratamiento con la prueba de t para muestras relacionadas para determinar la diferencia. Valores de $p < 0.05$ indicaron significancia estadística.

RESULTADOS

El estudio incluyó a 30 mujeres y 21 hombres con edad promedio de 15.8 ± 4.8 años, el 86% de los pacientes presentó Maloclusión Clase I y el 14% presentó Maloclusión Clase II. Se tomaron muestras de células epiteliales bucales y se evaluó la presencia de MN, representadas en la Figura 1. No se detectaron células con MN en las 2000 células bucales exploradas de ningún paciente antes de la terapia de ortodoncia. Se detectaron de 0 a 1 células con MN de las 2000 células bucales exploradas en 9 de los pacientes después del tratamiento. El porcentaje de pacientes que presentaron MN antes (0%, control) y después de un año del tratamiento (18%) mostraron una diferencia significativa ($p=0.004$) (Tabla 1).



Figura 1. Células epiteliales bucales teñidas con tinción de Feulgen. El núcleo se tiñe en color rosa-morado, el citoplasma se mantiene incoloro o con una ligera tonalidad rosácea. Se señala con flechas la célula con núcleo normal y la célula con micronúcleo (MN). Observado en microscopio óptico con objetivo 40x.

Tabla 1. Frecuencia de pacientes que presentaron MN en células epiteliales bucales antes y después de un año de tratamiento de ortodoncia fija

Variable	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Valor de p
Presencia de MN	0 / 51 (0%)	9/ 51 (18%)	0.004*
Ausencia de MN	51 / 51 (100%)	42/51 (82%)	

* Prueba estadística de McNemar, $p < 0.05$ muestra significancia estadística

Después de que se realizó la extracción de ADN, se ajustó la concentración y se corrió en electroforesis. En la Figura 2 se encuentran los corrimientos electroforéticos más representativos de algunas muestras estudiadas antes y después de un año de tratamiento de ortodoncia. Se detectó degradación del ADN en el 45% de las muestras antes de la colocación del tratamiento de ortodoncia. Esta degradación se visualizó sólo como un barrido ligero a lo largo de todo el carril, sin pérdida de ADN de elevado tamaño molecular. Sin embargo, después del tratamiento, la degradación fue más evidente y alrededor del 88% de las muestras presentaron fragmentos de tamaños menores. Además, se observó en algunas muestras la disminución de ADN de elevado tamaño molecular. El análisis estadístico demuestra diferencia significativa en la degradación de ADN antes y después del tratamiento de ortodoncia analizado por electroforesis (Tabla 2).

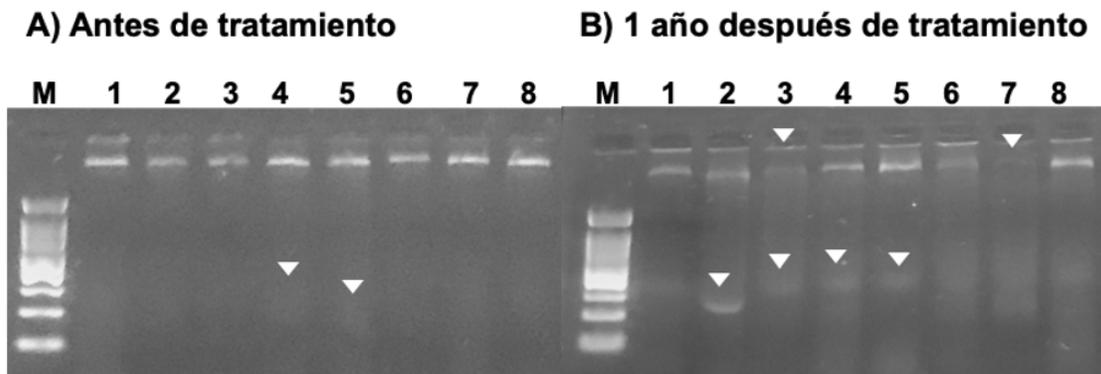


Figura 2. Muestras representativas de la degradación de ADN derivado de células epiteliales bucales analizadas en este estudio. Se observan del 1-8, las muestras representativas de ADN. Gel de agarosa al 1%, con marcador de tamaño molecular (M). A) antes y B) después de un año de la terapia de ortodoncia fija. Las flechas indican presencia de fragmentos de ADN, señaladas con la cabeza de flecha. Se observan en mayor número después de la terapia.

Tabla 2. Degradación del ADN evaluada por electroforesis en células bucales antes y después del tratamiento de ortodoncia fija

Variable	Antes del tratamiento n=51	Después del tratamiento n=51	Valor de p
Presencia de degradación	23/51 (45%)	45/51 (88%)	0.002*
Ausencia de degradación	28/51 (55%)	6/51 (12%)	

* Prueba estadística de McNemar $p < 0.05$ muestra significancia estadística

El análisis del daño oxidativo al ADN se evaluó por la cuantificación de la molécula de 8-OHdG en las muestras de ADN extraídas de células epiteliales bucales. Los datos, los cuales indican el promedio de los valores antes y después de un año de tratamiento, muestran un incremento

de la oxidación del ADN estadísticamente significativo después de un año de tratamiento al comparar los promedios (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles de 8-OHdG en ADN extraído de células epiteliales bucales antes y después de un año de tratamiento de la ortodoncia fija

Nivel de 8-OHdG ng/mL	Antes del tratamiento	Después del tratamiento	Valor de p
Media ± desviación estándar	5.8 ± 0.49	13.6 ± 1.2	0.04*

Prueba de T para muestras relacionadas p<0.05 muestra significancia estadística

DISCUSIÓN

En nuestro estudio evaluamos el daño oxidativo en el ADN antes y después de la aplicación del tratamiento de ortodoncia fija. Los pacientes presentaron en su mayoría Maloclusión Clase I, coincidiendo con los reportes de prevalencia en el mundo y en América que ubican este tipo de Maloclusión en primer lugar¹⁸. Respecto a la frecuencia de MN, los datos son similares al reporte de Flores-Bracho *et al.*¹⁹, en el que demuestran incrementos en la frecuencia de MN después de 4 años del tratamiento, mientras que difieren con el informe de Goncalves *et al.*²⁰ en el cual no se detectan daños después de 1 año de tratamiento. En ambos estudios utilizaron brackets de acero inoxidable de la marca Morelli Sorocaba Sp® Brasil, y exploraron largos tiempos posteriores a la colocación del tratamiento. Pero las diferencias observadas en los resultados entre ellos pueden deberse principalmente a la amplia diferencia en los tiempos en que se evaluó el daño. También, las diferencias podrían ser por requerimientos específicos de la fuerza mecánica que se ejerce durante el tratamiento en los pacientes, que participan tanto en la alteración del ambiente como en el daño al ADN²¹.

En relación con la degradación del ADN analizado por electroforesis, se detectó un incremento dos veces mayor después de un año de la colocación del tratamiento. El ensayo de electroforesis presenta baja sensibilidad, en comparación con estudios en la literatura que analizan la degradación principalmente mediante el análisis de electroforesis en gel en células individuales o ensayo de cometa, una técnica descrita como de las más sensibles²²⁻²⁶. Fernández-Miñano *et al.*²³ compararon el antes y después de un mes de aplicación de la terapia, y demostraron daño en el ADN con materiales de acero inoxidable, titanio y níquel. Faccioni *et al.*²⁴ reportan daño en células epiteliales bucales de pacientes con terapia de ortodoncia fija con diferentes metales por un período de 2-4 años al compararlos con población sin ortodoncia, pero no evalúan el antes y después en la misma población. En contraste, otros autores utilizando la misma técnica de ensayo de cometa para evaluar el daño, no describen cambios después de realizar evaluaciones luego de 10 y 30 días, y hasta 6 meses de aplicación del tratamiento de ortodoncia con el mismo tipo de metales^{25,26}. Aunque la discrepancia en los resultados se puede explicar por la variación del tiempo analizado, también podría ser por las ligeras diferencias en concentración de metales que derivan de la variación de las marcas de materiales. Lo anterior se respalda por reportes como el de Buljan *et al.*⁹ que han evidenciado diferente grado de daño en cultivos de fibroblastos gingivales de ratón cuando son expuestos a diferentes materiales ortodónticos como cerámica y metal. De igual forma, Loyola-Rodríguez *et al.*²⁷ evidenciaron daño diferente en fibroblastos gingivales humanos por exposición a diferentes marcas y materiales de brackets.

Nuestro estudio detectó un incremento del nivel de 8-OHdG de alrededor de 2 veces más después de un año de colocación del tratamiento. Los cambios en los valores detectados de 8-OHdG son similares a los descritos por otros autores que analizaron células de fibroblastos

de ratón después de 48 horas de exposición a diferentes materiales utilizados en ortodoncia incluyendo acero inoxidable, cerámica y poliuretano, al compararlos con fibroblastos no expuestos⁹. Asimismo, en estudios *in vivo* se detectaron incrementos de 8-OHdG alrededor de 1.5 veces más en la saliva de niños después de 1 y 3 meses del tratamiento de ortodoncia con metales¹⁰. Sin embargo, hay autores que empleando tratamiento con metales no detectaron cambios en los niveles de 8-OHdG en muestras de saliva y líquido crevicular gingival antes y después de 6 meses de tratamiento¹¹. De modo semejante, Esenlik *et al.*¹², empleando metales en el tratamiento no evidenciaron cambios en los niveles de 8-OHdG en tiempos cortos de 4-5 h y 7 días post-tratamiento. La variación de los resultados entre estudios se puede justificar tanto por los diferentes tipos de muestras analizadas, así como por los distintos tiempos de examinación posterior a la terapia de ortodoncia. Consideramos que la variación en la toma de muestra es fundamental ya que la saliva y el líquido crevicular gingival, pudieran tener menor concentración de metabolitos que el análisis directo de células epiteliales bucales, porque los fluidos reflejan productos derivados del epitelio celular.

Respecto al tiempo de exposición con metales, estudios recientes de un metaanálisis demuestran que la máxima liberación de metales ocurre después de un mes de iniciado el tratamiento y decrece después de dos y tres meses del tratamiento²⁸, y en concordancia los niveles de daño al ADN son mayores en los primeros meses de tratamiento²⁹. Nuestro grupo reportó un trabajo previo evaluando daño al ADN mediante análisis de electroforesis capilar de fragmentos obtenidos por reacción en cadena de polimerasa de secuencias cortas repetidas en tándem (STRs) en tiempos menores (3 meses después del tratamiento). Se detectó degradación del ADN y pérdida de la estabilidad, aunque los datos no fueron estadísticamente significativos³⁰. Por lo anterior, consideramos que el daño al ADN se debe a muchos factores que incluyen la liberación de metales, el daño derivado de inflamación y el estrés ocasionado por la fuerza mecánica que se ejercen en la ortodoncia²¹, o por el cambio del ambiente bucal ocasionado por la microbiota bacteriana que incrementa comúnmente durante el tratamiento de ortodoncia por la dificultad de la higiene y los efectos irritativos de los materiales³¹.

Los resultados presentados aquí se ponen en consideración para los ortodontistas, ya que la mejora continua de los materiales utilizados en el tratamiento y los tiempos de la duración del mismo pueden contribuir a disminuir el daño al ADN que se origina durante el tratamiento ortodóntico. El problema maloclusivo inicial y las condiciones particulares de cada paciente serán siempre prioridad para el especialista de ortodoncia que determinará las técnicas, tiempos, materiales entre otros factores que definirán el tratamiento de paciente.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados aquí demuestran daño en el ADN. Por ahora, hay estudios que están evaluando niveles de enzimas antioxidantes que pudieran indicarnos si el daño oxidativo se está contrarrestando y es detectado como un proceso de adaptación biológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Downarowicz P, Mikulewicz M. Trace metal ions release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells by *in vivo* studies: A literature review. *Adv Clin Exp Med*. 2017; 26(7): 1155-1162. DOI: 10.17219/acem/65726

2. Sreedhara A, Cowan JA. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *J Biol Inorg Chem.* 2001; 6(4): 337-347. DOI: 10.1007/s007750100209
3. Katada H, Komiyama M. Artificial restriction DNA cutters as new tools for gene manipulation. *Chembiochem.* 2009; 10(8): 1279-1288. DOI: 10.1002/cbic.200900040
4. Camargo MA, Neves A, Bortoluzzi AJ, Szpoganicz B, Martendal A, Murgu M, et al. New gadolinium complex with efficient hydrolase-like activity: a 100-million-fold rate enhancement in diester hydrolysis. *Inorg Chem.* 2008; 47(8): 2919-2921. DOI: 10.1021/ic702167p
5. Iarmarcovai G, Sari-Minodier I, Chaspoul F, Botta C, De Meo M, Orsiere T, et al. Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms. *Mutagenesis.* 2005; 20(6): 425-432. DOI: 10.1093/mutage/gei058
6. Jeżowska-Bojczuk M, Kaczmarek P, Bal W, Kasprzak KS. Coordination mode and oxidation susceptibility of nickel (II) complexes with 2'-deoxyguanosine 5'-monophosphate and l-histidine. *J Inorg Biochem.* 2004; 98(11): 1770-1777. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2004.08.002
7. Kaczmarek P, Jeżowska-Bojczuk M, Bal W, Kasprzak, KS. Determination of the stability constants and oxidation susceptibility of nickel (II) complexes with 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate and l-histidine. *J Inorg Biochem.* 2005; 99(3): 737-746. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2004.12.006
8. Chiorcea-Paquim AM. 8-oxoguanine and 8-oxodeoxyguanosine biomarkers of oxidative DNA damage: A review on HPLC-ECD determination. *Molecules.* 2022; 27(5): 1620. DOI: 10.3390/molecules27051620
9. Buljan ZI, Ribaric SP, Abram M, Ivankovic A, Spalj S. In vitro oxidative stress induced by conventional and self-ligating brackets. *Angle Orthod.* 2012; 82(2): 340-345. DOI: 10.2319/061811-395.1
10. Guler C, Toy E, Ozturk F, Gunes D, Karabulut AB, Otlu O. Evaluation of salivary total oxidant-antioxidant status and DNA damage of children undergoing fixed orthodontic therapy. *Angle Orthod.* 2015; 85(2): 239-244. DOI: 10.2319/110113-798.1
11. Atuğ Özcan SS, Ceylan I, Özcan E, Kurt N, Dağsuyu IM, Çanakçı CF. Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with fixed orthodontic appliances. *Dis Markers.* 2014; 2014: 59792. DOI: 10.1155/2014/597892
12. Esenlik E, Gümüş EB, Albayrak GE, Doğuç DK. Does puberty affect oxidative stress levels and antioxidant activity of saliva in patients with fixed orthodontic appliances? *J Orofac Orthop.* 2023; 84: 54-64. DOI: 10.1007/s00056-021-00346-7
13. Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonassi S, Holland N, Migliore L, et al. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2016; 770(Pt A): 12-25. DOI: 10.1016/j.mrrev.2016.04.008
14. Ángeles-Estrada L, Santos-Quintanilla AR, Sánchez-Monroy V. Evaluación de efectos citotóxicos y genotóxicos con ensayo de micronúcleos en la mucosa bucal de pacientes con aparatología ortodóncica. Revisión de la literatura. *Odontol Sanmarquina.* 2021; 24(2); 165-172. DOI: 10.15381/os.v24i2.19903
15. Francis PG, Thomas M, Antony V, Shalooob M, Hassan KJ, Roshan G. Cytomorphometric analysis on the effects of components of orthodontic appliances on the epithelial cells of the buccal mucosa. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2017; 7(3): 142-6. DOI: 10.4103/jispcd.JISPCD_58_17
16. Mariachelliah SJL, Sathiasekar AC, Mathew DG, Ramachandran KL, Kesavaram P, Kangasabapathy UG. Localized toxicity in patients with fixed orthodontic appliance: A case control study. *Indian J Public Health Res Dev.* 2019; 10(12): 989-994. DOI: 10.37506/v10%2Fi12%2F2019%2Fijphrd%2F192253
17. McLaughlin RP, Bennett JC. Bracket placement with the preadjusted appliance. *J Clin Orthod.* 1995; 29(5): 302-311. PMID: 8617853

18. Lombardo G, Vena F, Negri P, Pagano S, Barilotti, Paglia L, *et al.* Worldwide prevalence of malocclusion in the different stages of dentition: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Paediatr Dent.* 2020; 21(2): 115-122. DOI: 10.23804/ejpd.2020.21.02.05
19. Flores-Bracho MG, Takahashi CS, Castillo WO, Saraiva MCP, Küchler EC, Matsumoto MAN, *et al.* Genotoxic effects in oral mucosal cells caused by the use of orthodontic fixed appliances in patients after short and long periods of treatment. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(7): 2913-2919. DOI: 10.1007/s00784-018-02795-8
20. Goncalves TS, De Menezes LM, Trindade C, Thomas P, Fenech M, Henriques JAP. In vivo evaluation of the genotoxic effects of Hyrax auxiliary orthodontic appliances containing silver-soldered joints. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015; 791: 25-29. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.07.007
21. Morii A, Miyamura Y, Sago MI, Mizuhara M, Shikayama T, Naniwa M, *et al.* Orthodontic force-induced oxidative stress in the periodontal tissue and dental pulp elicits nociception via activation/sensitization of TRPA1 on nociceptive fibers. *Free Radic Biol Med.* 2020; 147: 175-186. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.016
22. Singh NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res - Fund Mol Mechan Mutagen.* 2000; 455(1-2): 111-127. DOI: 10.1016/s0027-5107(00)00075-0
23. Fernández-Miñano E, Ortiz C, Vicente A, Calvo JL, Ortiz AJ. Metallic ion content and damage to the DNA in oral mucosa cells of children with fixed orthodontic appliances. *Biometals.* 2011; 24(5): 935-941. DOI: 10.1007/s10534-011-9448-z
24. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003; 124(6): 687-693. DOI: 10.1016/j.ajodo.2003.09.010
25. Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JAP, *et al.* In vivo determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res.* 2008; 7(4): 1259-1266. DOI: 10.4238/vol7-4gmr508
26. Hafez HS, Selim EMN, Eid FHK, Tawfik WA, Al-Ashkar EA, Mostafa YA. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011; 140(3): 298-308. DOI: 10.1016/j.ajodo.2010.05.025
27. Loyola-Rodríguez JP, Lastra-Corso I, García-Cortés JO, Loyola-Leyva A, Domínguez-Pérez RA, Ávila-Arizmendi D, *et al.* In vitro determination of genotoxicity induced by brackets alloys in cultures of human gingival fibroblasts. *J Toxicol.* 2020; 1467456. DOI: 10.1155/2020/1467456
28. Imani MM, Mozaffari HR, Ramezani M, Sadeghi M. Effect of fixed orthodontic treatment on salivary nickel and chromium levels: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Dent J.* 2019; 7(1): 21. DOI: 10.3390/dj7010021
29. Pineda-Zayas A, Menéndez López-Mateos L, Palma-Fernández JC, Iglesias-Linares A. Assessment of metal ion accumulation in oral mucosa cells of patients with fixed orthodontic treatment and cellular DNA damage: a systematic review. *Crit Rev Toxicol.* 2021; 51(7): 622-633. DOI: 10.1080/10408444.2021.1960271
30. Díaz-Rojas AR, Ángeles-Estrada L, Pérez-Vielma NM, Sánchez-Monroy V. Short tandem repeat (STR) instability in the oral mucosa of patients submitted to fixed orthodontic therapy: a limitation of STR profile quality for human identification. *Forensic Sci Med Pathol.* 2022; 18(1): 57-63. DOI: 10.1007/s12024-021-00451-4
31. Reichardt E, Geraci J, Sachse S, Rödel J, Pfister W, Löffler B, *et al.* Qualitative and quantitative changes in the oral bacterial flora occur shortly after implementation of fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2019; 156(6): 735-744. DOI: 10.1016/j.ajodo.2018.12.018