

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO - ORTODONTIA E ORTOPEDIA FACIAL

LETÍCIA SPINELLI JACOBY

COMPARAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DOS ANÉIS ORTODÔNTICOS  
COM E SEM SOLDAGEM À PRATA EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Porto Alegre

2016

LETÍCIA SPINELLI JACOBY

COMPARAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DOS ANÉIS ORTODÔNTICOS  
COM E SEM SOLDAGEM À PRATA EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção de grau de Mestre em Odontologia, área de concentração Ortodontia e Ortopedia Facial pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes

Porto Alegre

2016

## DEDICATÓRIA

*Ao Paulo, cuja fé no conhecimento científico encorajou este percurso desde o princípio. A tua luta obstinada em doar o melhor de ti para os teus pacientes me inspira a buscar também o melhor de mim. Obrigada pelo imprescindível apoio emocional diário. Pelo sólido companheirismo. Por ser lar e aconchego. Pela cumplicidade no olhar. Pela certeza de uma vida inteira compartilhada.*

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, por terem incansavelmente incentivado a minha jornada profissional. Pela infância linda e lúdica. Pelo incentivo aos estudos desde os primeiros anos escolares. Por terem aceitado e proporcionado a minha mudança para Porto Alegre aos catorze anos em busca de uma formação de qualidade. Por vibrarem com as minhas vitórias sem as considerarem feitos impossíveis, mostrando a convicção na minha capacidade. Pelo exemplo de integridade e justiça que carrego todos os dias. Isso tudo foi fundamental para o crescimento pessoal e intelectual que me trouxe ao dia de hoje.*

*Às minhas irmãs, Marília e Isadora, pela presença constante. Pela amizade sem fim, pelo apoio incondicional e por fazerem parte das melhores memórias. Por todo o amor além do que se vê.*

*Aos meus sobrinhos, Vicente e Francisco, pela lembrança do real sentido da vida. Por mostrarem que a felicidade está sempre traduzida na simplicidade de um sorriso.*

*Ao governo federal, que, através da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), fundação do Ministério da Educação (MEC), forneceu o apoio financeiro indispensável para a realização do curso de Mestrado em Odontologia – área de concentração Ortodontia e Ortopedia Facial.*

*À profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes, pelos conhecimentos compartilhados, pela orientação desta dissertação de mestrado, por acreditar que eu seria capaz e por impulsionar-me a sair da minha zona de conforto.*

*À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por fornecer a estrutura necessária para a realização desta pesquisa científica.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia desta universidade, pela excelência de ensino proporcionada aos seus alunos.*

*À professora Susana Maria Deon Rizzato, pela humildade e competência em dividir conhecimentos durante as atividades clínicas. Pelo exemplo a ser seguido.*

*Ao professor Eduardo Martinelli Santayana de Lima, pelo auxílio na compreensão da ciência ortodôntica.*

*Aos demais professores de Ortodontia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Ernani Marchioro, Fernando Martinelli, Tatiana Gonçalves e Telmo Berthold, pela competência e experiência transmitida.*

*À colega Mariana Roennau Lemos Rinaldi, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela parceria durante o planejamento e execução dos experimentos.*

*Aos demais colegas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Amanda Ohashi, Bruno Barbo, Fabiane Azeredo, Fabiano Mattiello, Fernanda Henkin, Gabriela Schmitz, Leonardo Stangler, Paulo Ricardo Matje e Renata Petersen, pela amizade, pelos bons momentos vividos e pelo compartilhamento da paixão pela ortodontia.*

*À profa. Dra. Maria Martha Campos, por proporcionar o acesso ao Laboratório de Cultura de Células onde os experimentos dessa pesquisa foram realizados. Pelos conhecimentos em pesquisa transmitidos de forma simples, robusta e inspiradora nas disciplinas de Investigação Científica em Odontologia I e II.*

*Ao Dr. Valnês Rodrigues Junior, pelo essencial suporte durante os experimentos, pela tranquilidade transmitida, pela paciência e disponibilidade. Por responder aos constantes questionamentos e vibrar com os resultados.*

*Às colegas do curso de especialização em Ortodontia da Associação Brasileira de Odontologia – Seção Rio Grande do Sul, por terem tornado inesquecíveis aqueles primeiros anos de formação em ortodontia.*

*Aos professores do curso de especialização em Ortodontia da Associação Brasileira de Odontologia – Seção Rio Grande do Sul, pelos ensinamentos em ortodontia que alicerçam o planejamento e a condução dos tratamentos ortodônticos dos meus pacientes.*

*Ao meu avô, José Francisco, que receberia esse momento com um abraço do tamanho do mundo e ao som da música mais linda. À minha avó, Luiza Maria, por ser exemplo de mulher forte. Por ter, em um tempo onde a desigualdade de gêneros era ainda mais evidente, superado todas as dificuldades geográficas e financeiras para estudar. Por ter construído uma família cheia de união e de amor.*

*A todas as mulheres pesquisadoras. Porque, como disse Simone de Beauvoir, “o machismo faz com que o mais medíocre dos homens se sinta um semideus diante de uma mulher”.*

*“O despertar gera angústia, mas faz com que você fique mais vivo. Quando você aumenta a intensidade da luz, multiplica o tamanho da noite. Quanto mais cresce o conhecimento, mais pequenino você se sente. A beleza da vida também é isso: é a profundidade e muitas vezes ela é rude.”*

*Pepe Mujica*

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C: Celsius degrees / graus *Celsius*

µL: microliter / microlitro

AbsCN: Absorbance of negative control

AbsT: Absorbance of treated cells

Ag: silver / prata

ANOVA: Analysis of variance / análise de variância

Cd: Cadmium / cádmio

Co: Cobalt / cobalto

CO<sub>2</sub>: carbon dioxide / dióxido de carbono

Cr: *chromium* / *cromo*

Cu : copper / cobre

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DNA: *Deoxyribonucleic acid* / *ácido desoxirribonucleico*

EPI: Equipamento de Proteção Individual

Fe: iron / ferro

ISO: International Organization for Standardization

ml: *milliliter* / *mililitro*

Mn: Manganese / manganês

MN: micronucleus



MTT: 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaCl: *Sodium chloride* / cloreto de sódio

Ni: Nickel / níquel

Pd: *Palladium* / paládio

RNA: *ribonucleic acid* / ácido ribonucléico

SDH: succinic dehydrogenase

STR: *Short tandem repeat*

Ti: *Titanium* / titânio

TIG: Tungsten Inert Gas

Zn: Zinc / zinco

## SUMÁRIO

<b>1. RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>3. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>4. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>14</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	14
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	14
<b>5. ARTIGO 1 – REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>6. ARTIGO 2 – ESTUDO <i>IN VITRO</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>54</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>59</b>

## 1. RESUMO

**Introdução:** Os objetivos deste estudo foram avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade dos anéis ortodônticos com e sem soldagem à prata e comparar a viabilidade celular nas linhagens FGH, HaCaT, MRC-5 e Vero após a exposição aos extratos dos anéis ortodônticos. **Materiais e Métodos:** Foi realizado o ensaio de redução de MTT após a exposição das culturas celulares aos extratos dos materiais testados. Foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente, meio de cultura DMEM e extratos de tira de cobre. **Resultados:** A análise de variância de uma via (ANOVA) mostrou que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em todas as linhagens avaliadas. O teste de comparações múltiplas de Tukey detectou ausência de diferença significativa entre os grupos controle negativo e anéis ortodônticos de aço inoxidável. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle negativo e anéis ortodônticos de aço inoxidável com soldagem à prata nas linhagens celulares HaCaT e MRC-5. Observou-se grande variabilidade nas percentagens de viabilidade celular entre as linhagens. **Conclusões:** Ao avaliar a citotoxicidade de anéis ortodônticos com e sem soldagem à prata, existe variabilidade nos resultados quando linhagens diferentes são comparadas. Anéis ortodônticos de aço inoxidável não induziram efeitos citotóxicos em nenhuma das linhagens testadas. Quando associados à solda de prata, os extratos dos anéis ortodônticos reduziram a viabilidade celular nas linhagens FGH, HaCaT, MRC-5 e Vero, embora essa redução tenha ocorrido de forma estatisticamente significativa apenas nas linhagens HaCaT e MRC-5.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Técnicas In Vitro. Viabilidade Celular. Aparelhos Ortodônticos. Aço inoxidável. Prata.

## 2. ABSTRACT

**Introduction:** The aims of this study were to assess the *in vitro* cytotoxicity of orthodontic bands, with and without silver solder, and to compare the viability of the HaCaT, HGF, MRC-5, and Vero cell lines, when exposed to orthodontic band extracts. **Material and Methods:** An MTT assay was performed on the extracts of the tested materials. The culture medium alone was used as a negative control and copper strip extracts were used as a positive control. **Results:** A one-way Analysis of Variance (ANOVA) showed a difference between all of the groups in all of the cell lines and Tukey's post-hoc test revealed no significant differences between the stainless steel orthodontic bands and the negative control group. There was a significant difference between the negative control group and the stainless steel orthodontic bands with silver solder joints in the HaCaT and MRC-5 cell lines. A great variability in the percentages of cell viability was observed. According to these results, the stainless steel orthodontic bands did not induce cytotoxic effects on any of the cell lines. When associated with silver solder, the orthodontic bands decreased the cell viability in the HaCaT, HGF, MRC-5, and Vero cell lines, but there was only a statistical significance in the HaCaT and MRC-5 cell lines. **Conclusions:** More than one type of cell line must be tested in a cytotoxicity assay due to the outcome variability from one cell line to another.

Keywords: Cytotoxicity. In Vitro Techniques. Cell Viability. Orthodontic Appliances. Stainless Steel. Silver.

### 3. INTRODUÇÃO

Biocompatibilidade foi definida como a habilidade de um material em desempenhar sua função em determinada terapia médica sem que nenhum efeito indesejado, local ou sistêmico, seja provocado, gerando resposta celular e tecidual apropriada e otimizando a relevância clínica da terapia empregada (Williams, 2008). Biocompatibilidade, atualmente, é considerada uma característica complexa de um sistema e não apenas de um material específico, visto que materiais podem afetar sistemas biológicos de diferentes formas (Williams, 2014).

Existem diversas etapas na investigação da biocompatibilidade de um material e os testes de citotoxicidade *in vitro* frequentemente são a etapa inicial desse processo (Assad et al., 1994). Devido às questões éticas envolvidas nos modelos animais, existe uma tendência de que a avaliação da citotoxicidade envolva, primordialmente, experimentos *in vitro*. Citotoxicidade consiste em alteração na função celular devido a dano celular nas vias metabólicas, processos intracelulares ou estruturas (Freshney, 2010).

Existe grande preocupação em relação à biocompatibilidade dos aparelhos ortodônticos, já que há íntimo contato desses materiais com a mucosa dos pacientes por longos períodos. Os anéis ortodônticos são amplamente utilizados quando aparelhos auxiliares são necessários. A fim de conectar as bandas aos fios ortodônticos, faz-se, rotineiramente, uso de solda de prata. De acordo com o fabricante (Morelli, Sorocaba/SP, Brasil), os anéis ortodônticos são confeccionados em aço inoxidável contendo 8-12% Ni, 18-20% Cr e o restante de Fe. A solda de prata é composta por 55–57% Ag, 21–23% Cu, 15–19% Zn e 4–6% Sn. Sabe-se que a corrosão e a conseqüente liberação iônica estão relacionadas à resposta do hospedeiro frente ao contato com determinado agente (Williams, 2008). A saliva presente na cavidade oral pode atuar como agente corrosivo dos aparelhos ortodônticos (Mikulewicz et al., 2015).

Considerando que os testes de citotoxicidade *in vitro* são indispensáveis na avaliação da biocompatibilidade dos materiais utilizados na clínica ortodôntica, é imperioso que as variáveis envolvidas nesses ensaios sejam compreendidas. A

metodologia utilizada pode influenciar significativamente os dados obtidos nos experimentos e a ausência de padronização das metodologias empregadas dificulta a comparação entre dados de diferentes centros (Martin-Camean et al., 2015). Wataha et al. (1994) mostraram que, mesmo quando existe padronização das condições de cultura, linhagens celulares diferentes podem apresentar diferentes níveis de citotoxicidade quando expostas a um mesmo agente agressor.

Este estudo *in vitro* teve como objetivos a avaliação da citotoxicidade dos anéis ortodônticos de aço inoxidável com e sem solda de prata e a comparação da viabilidade celular das linhagens FGH, HaCaT, MRC-5 e Vero expostas aos extratos dos anéis ortodônticos através do ensaio de redução de MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). A hipótese nula era de que os materiais testados teriam o mesmo efeito sobre todas as linhagens celulares.

## 4. PROPOSIÇÃO

### 2.1 Objetivo Geral:

Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade dos anéis ortodônticos com e sem soldagem à prata através do ensaio de redução de MTT.

### 2.2 Objetivo Específico:

Comparar a viabilidade celular das linhagens FGH, HaCaT, MRC-5 e Vero após exposição aos extratos dos anéis com e sem soldagem à prata através do ensaio de redução de MTT.

## 7. CONCLUSÕES

- Os extratos dos anéis ortodônticos de aço inoxidável não foram citotóxicos para as linhagens celulares FGH, HaCaT, MRC-5 e Vero.
- Os extratos dos anéis ortodônticos de aço inoxidável com solda de prata diminuíram a viabilidade celular em todas as linhagens testadas, embora de forma estatisticamente significativa apenas nas linhagens HaCaT e MRC-5.
- FGH, por ser uma linhagem celular primária, parece ser menos sensível à exposição aos extratos das ligas metálicas utilizadas em ortodontia quando comparada a linhagens contínuas, como a HaCaT, MRC-5 e Vero.
- Fibroblastos parecem ser menos sensíveis à exposição aos extratos de aço inoxidável, solda de prata e cobre do que queratinócitos e células epiteliais.
- Para a avaliação da citotoxicidade de um material ortodôntico, mais de uma linhagem celular deve ser selecionada, visto que os resultados obtidos podem ser discrepantes entre linhagens diferentes. Sugere-se que sejam testadas linhagens primárias e contínuas, células da área de contato com os aparelhos ortodônticos e células previamente utilizadas na literatura.
- A fim de possibilitar comparação entre diferentes estudos, os experimentos para estimativa da citotoxicidade *in vitro* devem ser realizados de acordo com as normas preconizadas pela ISO (International Organization for Standardization) para avaliação biológica de dispositivos da área médica.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amini F, Jafari A, Amini P, Sepasi S. Metal ion release from fixed orthodontic appliances--an in vivo study. *Eur J Orthod*. 2012;34(1):126-30.
2. Angelieri F, Carlin V, Martins RA, Ribeiro DA. Biomonitoring of mutagenicity and cytotoxicity in patients undergoing fixed orthodontic therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;139(4 Suppl):e399-404.
3. Angelieri F, Marcondes JP, de Almeida DC, Salvadori DM, Ribeiro DA. Genotoxicity of corrosion eluates obtained from orthodontic brackets in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;139(4):504-9.
4. Assad M, Lombardi S, Berneche S, Desrosiers EA, Yahia LH, Rivard CH. [Assays of cytotoxicity of the Nickel-Titanium shape memory alloy]. *Ann Chir*. 1994;48(8):731-6.
5. ATCC: The Global Bioresource Center 2015 [Available from: <http://www.atcc.org/>].
6. BCRJ | Banco de Células do Rio de Janeiro 2015 [Available from: <http://bcrj.org.br/>].
7. Bhaskar V, Subba Reddy VV. Biodegradation of nickel and chromium from space maintainers: an in vitro study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2010;28(1):6-12.
8. Bishara SE. Oral lesions caused by an orthodontic retainer: a case report. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1995;108(2):115-7.
9. Bogdanski D, Koller M, Muller D, Muhr G, Bram M, Buchkremer HP, et al. Easy assessment of the biocompatibility of Ni-Ti alloys by in vitro cell culture experiments on a functionally graded Ni-NiTi-Ti material. *Biomaterials*. 2002;23(23):4549-55.
10. Cell Culture Basics Handbook. Available from: [www.invitrogen.com/cellculturebasics](http://www.invitrogen.com/cellculturebasics).
11. Cortizo MC, De Mele MF, Cortizo AM. Metallic dental material biocompatibility in osteoblastlike cells: correlation with metal ion release. *Biol Trace Elem Res*. 2004;100(2):151-68.
12. Eliades T, Pratsinis H, Kletsas D, Eliades G, Makou M. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloys. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004;125(1):24-9.
13. 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):687-93.
14. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Bree Cv. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*. 2006;1(5):2315-9.
15. Freitas MP, Oshima HM, Menezes LM, Machado DC, Viezzer C. Cytotoxicity of silver solder employed in orthodontics. *Angle Orthod*. 2009;79(5):939-44.
16. Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6 ed. United States of America: John Wiley & Sons, Inc; 2010.

17. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1021-46.
18. Gonçalves TS, de Menezes LM, Ribeiro LG, Lindholz CG, Medina-Silva R. Differences of cytotoxicity of orthodontic bands assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed Res Int*. 2014;2014:143283.
19. Gonçalves TS, Menezes LM, Trindade C, Machado Mda S, Thomas P, Fenech M, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without silver soldered joints. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2014;762:1-8.
20. Guimarães ACR, Souza DSd, Alves EA, Mota EM, Barbosa HS, Medrado L, et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2010. 290 p.
21. Hafez HS, Selim EM, Kamel Eid FH, Tawfik WA, Al-Ashkar EA, Mostafa YA. Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(3):298-308.
22. ISO 10993-12:2012, Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials.
23. ISO 10993-5:2009, Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
24. Issa Y, Brunton P, Waters CM, Watts DC. Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. *Dent Mater*. 2008;24(2):281-7.
25. Kasten FH, Felder SM, Gettleman L, Alchediak T. A model culture system with human gingival fibroblasts for evaluating the cytotoxicity of dental materials. *In Vitro*. 1982;18(7):650-60.
26. Limberger KM, Westphalen GH, Menezes LM, Medina-Silva R. Cytotoxicity of orthodontic materials assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dent Mater*. 2011;27(5):e81-6.
27. Locci P, Marinucci L, Lilli C, Belcastro S, Staffolani N, Bellocchio S, et al. Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. *J Biomed Mater Res*. 2000;51(4):561-8.
28. Martin-Camean A, Jos A, Mellado-Garcia P, Iglesias-Linares A, Solano E, Camean AM. *In vitro* and *in vivo* evidence of the cytotoxic and genotoxic effects of metal ions released by orthodontic appliances: A review. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2015;40(1):86-113.
29. Messer RL, Bishop S, Lucas LC. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials*. 1999;20(18):1647-57.
30. Messer RL, Lucas LC. Cytotoxicity of nickel-chromium alloys: bulk alloys compared to multiple ion salt solutions. *Dent Mater*. 2000;16(3):207-12.

31. Messer RL, Lucas LC. Evaluations of metabolic activities as biocompatibility tools: a study of individual ions' effects on fibroblasts. *Dent Mater.* 1999;15(1):1-6.
32. Mikulewicz M, Chojnacka K, Wozniak B, Downarowicz P. Release of metal ions from orthodontic appliances: an in vitro study. *Biol Trace Elem Res.* 2012;146(2):272-80.
33. Mikulewicz M, Chojnacka K. Release of metal ions from orthodontic appliances by in vitro studies: a systematic literature review. *Biol Trace Elem Res.* 2011;139(3):241-56.
34. Mikulewicz M, Chojnacka K. Trace metal release from orthodontic appliances by in vivo studies: a systematic literature review. *Biol Trace Elem Res.* 2010;137(2):127-38.
35. Mikulewicz M, Wolowiec P, Loster BW, Chojnacka K. Do soft drinks affect metal ions release from orthodontic appliances? *J Trace Elem Med Biol.* 2015;31:74-7.
36. Mikulewicz M, Wolowiec P, Michalak I, Chojnacka K, Czopor W, Berniczei-Royko A, et al. Mapping chemical elements on the surface of orthodontic appliance by SEM-EDX. *Med Sci Monit.* 2014;20:860-5.
37. Mockers O, Deroze D, Camps J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. *Dent Mater.* 2002;18(4):311-7.
38. Moraes A, Augusto E, Castilho L. *Tecnologia do Cultivo de Células Animais.* São Paulo: Roca LTDA; 2007. 503 p.
39. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
40. Natarajan M, Padmanabhan S, Chitharanjan A, Narasimhan M. Evaluation of the genotoxic effects of fixed appliances on oral mucosal cells and the relationship to nickel and chromium concentrations: an in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(3):383-8.
41. Ortiz AJ, Fernandez E, Vicente A, Calvo JL, Ortiz C. Metallic ions released from stainless steel, nickel-free, and titanium orthodontic alloys: toxicity and DNA damage. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(3):e115-22.
42. Pianigiani E, Andreassi A, Lorenzini G, Alessandrini C, Fimiani M, Atrei A, et al. Evaluation of biocompatibility of metallic dental materials in cell culture model. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 2004;46(2-3):63-71.
43. Renck D, Machado P, Souto AA, Rosado LA, Erig T, Campos MM, et al. Design of novel potent inhibitors of human uridine phosphorylase-1: synthesis, inhibition studies, thermodynamics, and in vitro influence on 5-fluorouracil cytotoxicity. *J Med Chem.* 2013;56(21):8892-902.
44. Sestini S, Notarantonio L, Cerboni B, Alessandrini C, Fimiani M, Nannelli P, et al. In vitro toxicity evaluation of silver soldering, electrical resistance, and laser welding of orthodontic wires. *Eur J Orthod.* 2006;28(6):567-72.
45. Shigeto N, Yanagihara T, Hamada T, Budtz-Jorgensen E. Corrosion properties of soldered joints. Part I: Electrochemical action of dental solder and dental nickel-chromium alloy. *J Prosthet Dent.* 1989;62(5):512-5.

46. Solmi R, Martini D, Zanarini M, Isaza Penco S, Rimondini L, Carinci P, et al. Interactions of fibroblasts with soldered and laser-welded joints. *Biomaterials*. 2004;25(4):735-40.
47. Spalj S, Mlacovic Zrinski M, Tudor Spalj V, Ivankovic Buljan Z. In-vitro assessment of oxidative stress generated by orthodontic archwires. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;141(5):583-9.
48. Vande Vannet B, Hanssens JL, Wehrbein H. The use of three-dimensional oral mucosa cell cultures to assess the toxicity of soldered and welded wires. *Eur J Orthod*. 2007;29(1):60-6.
49. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. *Dent Mater*. 1994;10(3):156-61.
50. Wataha JC, Malcolm CT, Hanks CT. Correlation between cytotoxicity and the elements released by dental casting alloys. *Int J Prosthodont*. 1995;8(1):9-14.
51. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-53.
52. Williams DF. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials*. 2014;35(38):10009-14.

## 9. ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Projeto de Pesquisa "Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das soldagens à prata, a TIG e a laser utilizadas em Ortodontia" pela Comissão Científica da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

	<b>SIPESQ</b> Sistema de Pesquisas da PUCRS	
Código SIPESQ: 5852	Porto Alegre, 6 de agosto de 2014.	
Prezado(a) Pesquisador(a),		
<p>A Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA da PUCRS apreciou e aprovou o Projeto de Pesquisa "Avaliação <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das soldagens à prata, a TIG e a laser utilizadas em Ortodontia" coordenado por LUCIANE MACEDO DE MENEZES. Caso este projeto necessite apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEP/CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.</p>		
Atenciosamente,		
Comissão Científica da FACULDADE DE ODONTOLOGIA		

ANEXO B – Certificado de revisão da língua inglesa do artigo intitulado “*In Vitro* Cytotoxicity Evaluation of Orthodontic Bands with and without Silver Solder and the Comparison of Outcomes in the HaCaT, HGF, MRC-5, and Vero Cell Lines”.

