

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

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA CITOTOXICIDADE E
DA GENOTOXICIDADE DAS SOLDAGENS A PRATA,
A *TUNGSTEN INERT GAS (TIG)* E A *LASER*
EM ORTODONTIA

Mariana Roennau Lemos Rinaldi

JANEIRO/2017

Mariana Roennau Lemos Rinaldi

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA CITOTOXICIDADE E
DA GENOTOXICIDADE DAS SOLDAGENS A PRATA,
A *TUNGSTEN INERT GAS (TIG)* E A *LASER*
EM ORTODONTIA

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção de grau de Doutora 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.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes

COORIENTADOR: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre

2017

Ficha Catalográfica

R578a Rinaldi, Mariana Roennau Lemos

Avaliação in vitro e in vivo da citotoxicidade e da genotoxicidade das soldagens a prata, a Tungsten inert gas (TIG) e a laser em Ortodontia / Mariana Roennau Lemos Rinaldi . – 2017.

56 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes.

Co-orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques.

1. Ortodontia. 2. Citotoxicidade. 3. Genotoxicidade. 4. ICP-MS. 5. Comet assay. I. Menezes, Luciane Macedo de. II. Henriques, João Antonio Pêgas. III. Título.

O que verdadeiramente somos é aquilo que o impossível cria em nós.
Clarice Lispector

Para Natalino, Vitória e Heitor
– que são o meu porquê.

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa de seu Reitor, Ir. Evilázio Teixeira.

À Diretoria da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Alexandre Bahlis.

Ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa da sua coordenadora, Profa. Dra. Ana Maria Spohr.

Ao Prof. Dr. Eduardo Martinelli Santayana de Lima, por todo o incentivo e amizade demonstrados ao longo do período; pelos conhecimentos transmitidos desde a especialização e que me orientam na prática clínica diariamente.

À Profa. Me. Susana Maria Deon Rizzato, por ser tão vibrante e apaixonada pela Ortodontia, por transmitir seu conhecimento de maneira tão natural, fazendo com que os temas mais complexos pareçam fáceis.

Ao Prof. Dr. Flavio Augusto Marsiaj, ao Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber Oliveira, à Profa. Angélica Fritscher e à Profa. Dra. Ingeburg Hellwig, por terem me ensinado tanto, desde a especialização em Odontopediatria, e por terem me permitido participar das clínicas de Odontopediatria, tratando meus pacientezinhos da amostra.

À Profa. Maria Martha Campos, pelas maravilhosas aulas na disciplina de Investigação Científica em Odontologia; por não só ser um exemplo de excelência na pesquisa e na atividade docente, mas uma verdadeira mestre – que dá asas a seus alunos.

Ao Dr. Carlos Eduardo Leite, por toda a metodologia em ICP-MS, que possibilitou a realização do trabalho; por ratificar a necessidade de seguir protocolos em todos os experimentos, e em tudo o mais dentro de um laboratório.

À Portodent Prótese Dentária, pela realização das soldagens a *laser*.

A Canova Atelier Dental, pela realização das soldagens a *TIG*.

À Profa. Dra. Tatiana Gonçalves, por ter trilhado o caminho antes que eu. Sempre é mais fácil ir a algum lugar, quando o caminho já existe.

Aos colegas de mestrado: Letícia Spinelli Jacoby, Renato Dalla Porta Garcia e Helena Reis de Souza, por dividirem a mesma linha de pesquisa comigo, pela troca de experiências e, principalmente, pela ajuda na execução do trabalho. À Renata Córdova Petersen, à Fernanda Henkin, à Marina Cavallet, à Vanessa Kern Soares e ao Bruno Nehme Barbo pela agradável convivência.

Aos colegas do Laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos: Tatiana Oliveira, Jose Torres e Gabriel Berbigier, por dividirem comigo as alegrias e tristezas da vida em laboratório.

Aos colegas do doutorado, Maurício Mezzomo e Paulo Baccarin Matje pelas discussões científicas.

À Daniela Benzano, pela análise estatística.

Aos funcionários da Pós-graduação Davenir Menger Bruschi, Gabriel Jaques da Silva, Kléber Melo da Silva e Vanessa Alves Xavier por todo o apoio e ajuda nos processos administrativos envolvidos no meu doutorado.

À CAPES e ao CNPQ, pelo apoio financeiro.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes, por ter me concedido o privilégio de ser sua orientada e a felicidade de desfrutar da sua companhia. Obrigada, Luciane, por ter me incentivado; por ter sido compreensiva com as minhas limitações – sem desistir de ter o melhor que eu pudesse oferecer. Obrigada pela amizade! Durante o doutorado, eu realizei um sonho – e isso só foi possível graças a ti!

Ao Prof. João Pegas Henriques, por ter me recebido amavelmente entre seus orientados; por ter me aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar meu trabalho. Obrigada, Prof. Henriques, por permitir que eu conhecesse esse outro mundo de conhecimentos: as ciências biológicas.

À Fabiane Azeredo, pela amizade, companheirismo, bom humor. Fabi, querida, obrigada por tornares meus dias alegres, mesmo longe da minha família. Obrigada por ser seres tão legal como és, com um coração tão bom!

À pesquisadora Victória Jaramillo Garcia, por ter me ensinado tanto; por ter sido minha companheira do início ao fim na realização deste trabalho. Sem a tua participação eu não teria conseguido! À pesquisadora Michelle de Souza Lima, por ter realizado as leituras das lâminas; por ter entrado no trabalho! Gurias, poder contar com a participação de vocês não foi só fundamental, mas sim, um privilégio! Não existem palavras para agradecer o que vocês fizeram por mim!

Ao pesquisador Iuri Marques de Oliveira, pela ajuda na redação do trabalho. Iuri, obrigada por aceitar a empreitada com tão pouco tempo para realização; obrigada pela disponibilidade, tarde da noite; por não rir. Iuri, a tua ajuda foi o que eu precisava!

À pesquisadora Larissa Milano, pela ajuda na definição da metodologia e nos protocolos no início da pesquisa. Obrigada, Larissa, por ter paciência comigo, que não conhecia nada.

À pesquisadora Miriana da Silva Machado, pela ajuda na idealização do trabalho. Miriana, obrigada pela disponibilidade.

À Lidiane Santos dos Santos, por ser a pessoa a quem confio a minha agenda, quem me ajuda a realizar o que preciso, sem me esquecer de nada. Lidi, obrigada por cuidar das minhas coisas tão bem!

Declaração de Amor

(Porque amor não se agradece...)

Marília, Helena, Natalino,
Vitória e Heitor, amo vocês!

RESUMO

Aparelhos soldados são utilizados amplamente em Ortodontia e Odontopediatria. A citotoxicidade e a genotoxicidade da solda a prata e da soldagem a laser já foram testadas em Odontologia. No entanto, pouco se sabe sobre a técnica de soldagem *Tungsten Inert Gas (TIG)*, que utiliza um arco elétrico entre um eletrodo e a peça a ser soldada. Os objetivos deste estudo foram avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de uniões soldadas a prata (*silver soldered band - SSB*), soldadas a laser (*laser welded band - LWB*), soldadas a TIG (*TIG welded band – TWB*) e de anéis não soldados (*no soldered or welded bands – NS / WB*) *in vitro* e *in vivo*. Para isso, o ensaio de redução de MTT foi realizado nas linhagens celulares HGF, HaCat, Vero e MRC-5. A genotoxicidade dos eluatos metálicos das áreas soldadas foi determinada através do ensaio de cometas em células HGF após tratamento de 3 horas. A quantificação de Ni, Fe, Cr, Cu, Ag, Zn, Cd e Sn nos eluídos metálicos foi realizada com espectrometria de massa por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Cu, Zn e Ag foram os íons mais detectados nas amostras de meio de bandas soldadas a prata, e Fe, Cr e Ni, nas amostras soldadas a laser e nas soldadas a TIG. O grupo SSB induziu forte citotoxicidade em todas as linhagens celulares. NS / WB, LWB e TWB apresentaram indução citotóxica fraca. No ensaio Cometa, o grupo SSB apresentou maior índice de danos e mais cometas com classes de dano 3 e 4, em relação aos outros grupos. As uniões soldadas a TIG, bem como uniões soldadas a laser mostraram melhor biocompatibilidade. No estudo *in vivo*, genotoxicidade sobre as células da mucosa bucal dessas crianças com arcos linguais contendo uniões soldadas a

prata, uniões soldadas a *laser*, e sem qualquer aparelho foram avaliadas pelo ensaio de cometa bucal (BCA) e pelo ensaio de citometria bucal do micronúcleo (BMCyt). Os níveis urinários de Ni, Cr, Fe, Zn, Cu, Ag, Cd e Sn foram investigados através de amostras de urina analisadas por ICP-MS. Os resultados do estudo indicam que a solda a prata e a soldagem a laser não causaram genotoxicidade na mucosa bucal durante o período avaliado. As alterações dos íons no conteúdo urinário não puderam ser unicamente atribuídas aos aparelhos. A soldagem *TIG* parece ser técnica promissora a ser aplicada em ortodontia e merece ser mais investigada, uma vez que apresentou nos testes *in vitro* e *in vivo* um baixo potencial citotóxico e genotóxico.

Palavras-chave: Ortodontia, Citotoxicidade, Genotoxicidade, ICP-MS, Ensaio Cometa, Soldagem em Odontologia, Corrosão, Ensaio de micronúcleos; Metais pesados.

ABSTRACT

Soldered appliances are widely used in orthodontics and pediatric dentistry. The cytotoxicity and genotoxicity of silver solder and laser welding has already been tested in dentistry. However, little is known about the Tungsten Inert Gas (TIG) welding technique, which uses an electric arc between an electrode and the part to be welded. The aims of this study were to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of silver soldered (silver soldered bands - SSB), laser welded (laser welded bands - LWB), TIG welded (TIG welded bands - TWB) joints and no soldered/welded bands (NS /WB) *in vitro* and *in vivo*. For that, MTT reduction assay was performed in HGF, HaCat, Vero and MRC-5 cell lines. The genotoxicity of the metallic eluates of the joints was determined by comet assay in HGF cells after 3-h treatment. The quantification of Ni, Fe, Cr, Cu, Ag, Zn Cd and Sn in the metallic eluates was performed with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Cu, Zn and Ag were the most detected ions in SSB medium samples, and Fe, Cr and Ni in the samples of LWB and TWB. The SSB group induced strong cytotoxicity in all cell lines. NS/WB, LWB and TWB presented a weak cytotoxic induction. In comet assay, SSB group showed a higher damage index and more comets with damage class 3 and 4, compared to the other groups. In the *in vivo* study, the genotoxic effects on the buccal mucosa cells of children with lingual arches containing silver soldered joints, laser welded joints and without any appliance were assessed by buccal comet assay (BCA) and the buccal micronucleus cytome (BMCyt) assay. The urinary levels of Ni, Cr, Fe, Zn, Cu, Ag, Cd and Sn were investigated through urine samples analyzed by ICP-MS. The results of the study indicate that silver solder and laser welding did not cause genotoxicity in

buccal mucosa cell during the period evaluated. The changes of the ions in the urinary contents cannot only be attributed to the appliances. TIG welding may be a promising technique to be applied in orthodontics and deserve be further investigated, as it presented in the in vitro and in vivo tests a low cytotoxic and genotoxic potential.

Keywords: Orthodontics; Cytotoxicity; Mutagenicity test; ICP-MS; Comet assay; Dental soldering; Micronucleus tests; Corrosion; Metals, Heavy.

SUMÁRIO

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	16
1.1 Soldagem em Ortodontia.....	19
1.2 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade	23
1.3 Quantificação de metais em ICP-MS	27
2. PROPOSIÇÃO	28
2.1 Objetivos Gerais	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. DISCUSSÃO GERAL	30
4. CONCLUSÃO	34
Referências Bibliográficas	35
ANEXOS	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	41
Termo de Assentimento do Menor	43
Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa	45
Gráficos - Níveis urinários de metais apresentados pelos pacientes ao longo das coletas.....	48

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

A Ortodontia está em constante busca de melhores meios de diagnóstico, diferentes técnicas, novos aparelhos e materiais para que os tratamentos sejam rápidos e eficientes. No entanto, a segurança dos tratamentos é primordial. Os benefícios oferecidos pela terapêutica devem ser sempre maiores que o possível custo biológico exigido. Nesse sentido, a introdução de elementos estranhos à cavidade bucal – no caso, os materiais dentários – deve ser amparada pela pesquisa de sua biocompatibilidade.

O uso de aparelhos mantedores de espaço é indicado em casos de perdas precoces de dentes decíduos para evitar a diminuição do perímetro do arco ou na supervisão do espaço na dentição mista. O arco lingual é um aparelho de uso consagrado tanto na Ortodontia quanto na Odontopediatria. É um aparelho de simples confecção que consiste de um arco, apoiado nos incisivos, soldado com prata, em dois anéis adaptados nos molares contralaterais (1-4). Por ser utilizado por indivíduos bastante jovens e por vários meses, ou até mesmo anos, a segurança biológica da sua utilização deve ser assegurada.

A maioria dos aparelhos ortodônticos é feita de aço inoxidável ou ligas metálicas compostas predominantemente por ferro (Fe), níquel (Ni) (15% a 54%), cromo (Cr) (20% a 30%) (5-7). O meio bucal é propício a causar biodegradação dessas ligas pela ação de correntes galvânicas, de variações de pH e de variações de temperatura, ou pela presença de biofilme e de diferentes enzimas (6, 8, 9). No entanto, algumas proteínas da saliva, como a amilase e a γ -globulina, parecem inibir a corrosão (8, 10).

A corrosão é um processo eletroquímico que altera as propriedades dos metais, ou pela perda direta dos íons metálicos em solução ou pela dissolução progressiva da camada superficial, geralmente óxidos ou sulfetos (8, 9).

A biocompatibilidade refere-se à capacidade de um material realizar sua função terapêutica, sem induzir quaisquer efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis no receptor/indivíduo, e ainda promover a resposta celular ou tecidual mais benéfica nessa situação específica, e otimizando o desempenho clinicamente relevante do tratamento (11, 12). No caso dos metais e das ligas, essa propriedade depende da sua resistência à corrosão (9).

A microestrutura do metal é o primeiro parâmetro a ser considerado na corrosão. Normalmente, os fabricantes combatem o processo acrescentando ou retirando certos metais da liga, aplicando coberturas, ou ainda modificando o processo de fabricação. O rompimento da película superficial de óxidos ou sulfetos e a exposição a meios que impedem o reparo desse filme irão causar corrosão. As dobras nos arcos, a exposição a agentes químicos (utilização de fluoreto de sódio acidificado (13)) e o superaquecimento provocado pelos processos de soldagem podem romper a película superficial. A menos que o metal forme novamente essa película superficial (passivação), a reação de oxi-redução irá se perpetuar até consumir todo o metal ou não haver mais oxigênio disponível (8, 9).

Os metais presentes nos aparelhos ortodônticos sofrem corrosão no meio bucal (14). A corrosão severa pode ser detectada através da alteração na cor do esmalte ao redor dos bráquetes e do aumento da rugosidade

nestes. Mesmo quando não perceptíveis a olho nu, os produtos da corrosão podem ser acumulados nos *slot*, aumentando a resistência friccional dos arcos nas mecânicas de deslizamento (8).

A corrosão pode ser mensurada pela quantidade de íons liberados. A maior parte dos produtos de corrosão dos aparelhos é composta por Fe, Cr, Ni e titânio (Ti) (7). A introdução dos íons metálicos no corpo humano é um risco adicional para a saúde, uma vez que esses íons podem ser lançados em diferentes lugares e em diferentes níveis, dependendo das características de solubilidade dos produtos que os contêm. Assim, funções biológicas são afetadas, o que pode levar a efeitos locais e sistêmicos (15).

A prevalência da alergia de contato ao Ni é alta. Estima-se que em mulheres atinja 10-17% e em homens, 1-3% da população europeia. A alergia ao cobalto afeta 1-3% da população (16-18). Bráquetes, bandas e fios ortodônticos são universalmente feitos de ligas, que contêm cerca de 6% a 12% de Ni e 15% a 22% de Cr. A liberação de Ni merece especial atenção. Além da hipersensibilidade, este metal parece estar relacionado a efeitos carcinogênicos, efeitos mutagênicos e citotóxicos (15).

A União Europeia decretou duas diretivas em relação ao Ni (19, 20):

1. A liberação de Ni de objetos em contato direto e prolongado com a pele tem de ser inferior a 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{semana}$.

2. Todos os objetos metálicos que são inseridos em orelhas perfuradas e outras partes do corpo humano devem ter uma taxa de liberação de Ni inferior a 0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{semana}$.

A alergia ao Ni deriva principalmente do contato da pele com o metal, como em joias, telefones celulares, prendedores de roupas, botões e fivelas

de cinto e, só em menor grau, de exposição ocupacional. A alergia ao Cr ocorre tanto pela exposição ocupacional (cimento e metais) como da exposição a bens de couro. A alergia ao cobalto, ao paládio ou ao ouro decorre principalmente por exposição a joias, ligas, metais, próteses, restaurações dentárias, terapia reumática, *stents* coronários, e tintas. Além disso, Ni e cobalto em pó penetram na pele danificada mais facilmente do que na pele intacta (18).

Souza e Menezes (15) testaram três marcas comerciais de bráquetes de aço inoxidável. Aparelhos removíveis, com os bráquetes fixados na região palatal foram utilizados durante sessenta dias por 45 pacientes. Coletas de saliva foram realizadas imediatamente antes da instalação do dispositivo, e após uma semana, um mês e dois meses de utilização. Os autores verificaram que as concentrações dos íons Ni e Cr aumentaram imediatamente após a instalação do aparelho na boca. Os três grupos de aparelhos comportaram-se de maneira semelhante em todos os períodos de estudo, e foram demonstradas diferenças significativas nos níveis de Ni, Cr e Fe liberados pelos mesmos.

1.1 Soldagem em Ortodontia

Em Ortodontia, a soldagem é um recurso frequente para unir dois metais nas mais diversas situações clínicas, como na fabricação de bráquetes, mantedores de espaço, aparelhos extra-bucais, expansores do tipo Haas e Hyrax (21) entre outros aparelhos auxiliares. A soldagem convencional utiliza uma liga de prata que une outros dois metais (22).

A qualidade de uma união de solda depende da sua estabilidade mecânica, do grau de contato, das propriedades dos materiais a serem ligados/soldados, da extensão das falhas na área de solda e da resistência à corrosão. As uniões de ligas de aço por solda de prata são suscetíveis à corrosão devido a reações galvânicas e ao sobreaquecimento (23). A corrosão nas áreas soldadas permite a liberação de íons para o meio bucal, que podem causar efeitos citotóxicos (24-26).

De acordo com o Registro Internacional de Químicos potencialmente tóxicos, do Programa do Meio Ambiente das Nações Unidas, os íons metálicos, tais como cádmio (Cd), cobre (Cu), prata (Ag) e zinco (Zn), presentes na solda prata, podem ser considerados produtos químicos potencialmente perigosos. Eles estão incluídos na lista de substâncias e processos que podem ser de grande risco para a vida humana (26).

Na fabricação dos bráquetes, o processo normal da indústria utiliza ligas de soldagem para juntar os componentes da base e as aletas. Essas ligas podem também conter vestígios de Cd, elemento citotóxico, que é adicionado para reduzir a temperatura de fusão e melhorar o escoamento. Além disso, as ligas à base de prata formam um par galvânico, principalmente Cu e Zn. O par galvânico ocorre quando dois metais diferentes estão em contato em presença de um eletrólito. A diferença de potencial entre ambos, em função de um meio corrosivo ou de uma solução condutora, produzirá um fluxo de elétrons entre eles. O material menos resistente corroerá com maior intensidade, tornando-se anódico. A força impulsora para a circulação da corrente e, conseqüentemente da corrosão, é a diferença de potencial entre os dois metais. A corrosão, que vem sendo

minimizada nos materiais atuais, é a principal razão para a dissolução progressiva de metal da solda, levando ao descolamento das aletas da base dos bráquetes durante o tratamento ortodôntico (27).

A composição das ligas de prata utilizadas em soldagem é baseada no ternário Ag-Zn-Cu com poucas adições de Ni e estanho (Sn) (28). A norma da *International Organization for Standardization (ISO) Dentistry: Brazing Materials* nº 9333:2006, que regulamenta os materiais de soldagem em Odontologia, preconiza que o volume máximo de Cd, berílio ou chumbo não ultrapasse 0,02% da fração de massa da liga. Além disso, o rótulo do produto deveria conter, dentre outras informações, um aviso se o material contém Ni e a porcentagem (em fração de massa) do mesmo (29). As ligas de prata comercializadas no Brasil possuem, em seus rótulos, somente informação sobre a porcentagem de prata presente na composição.

O Cd é um conhecido carcinógeno humano e animal. Esse metal está diretamente relacionado ao risco elevado de câncer de pulmão após exposição ocupacional; no entanto, as associações entre a exposição ao Cd e tumores em outros locais do organismo, incluindo rim, mama e próstata podem ser relevantes (30-32). O Cd era adicionado às ligas de prata nas décadas de 70 e 80 (33). A produção de metais ferrosos e de metais não ferrosos pode ser fonte de contaminação por Cd. Em jazidas de sulfeto que contêm Zn, chumbo e Cu, o Cd é encontrado como um subproduto (34, 35).

A soldagem a *laser* foi introduzida nos laboratórios de Ortodontia em 2002 (23). O laser mais utilizado para unir metais em Odontologia utiliza um meio sólido de Nd:YAG (granada de ítrio e alumínio dopada com neodímio) (21). A máquina de soldagem utiliza uma luz altamente concentrada para

fundir dois metais. A solda é controlada pela duração que a luz é aplicada (pulso), pela quantidade de energia (corrente) e pelo diâmetro do feixe de laser (22, 36).

A soldagem a *laser* apresenta uma série de vantagens em relação à soldagem com prata. O calor concentrado minimiza problemas de distorções e é possível soldar muito próximo de resinas acrílicas, sem o risco de dano (37). A união dos metais, que são fundidos, é melhor do que na soldagem convencional, na qual as partes são unidas pelo recobrimento de uma terceira. Além disso, por unir metais iguais, diminui a corrosão galvânica presente na soldagem convencional (22). Os estudos *in vitro* mostram uma maior biocompatibilidade das áreas soldadas a *laser* comparadas às uniões a prata (24, 38, 39).

A soldagem a *Tungsten Inert Gas (TIG)* é um tipo de soldagem a plasma, um processo que utiliza como fonte térmica um arco elétrico formado com um eletrodo de tungstênio e a peça a ser soldada, com proteção local de um gás inerte, geralmente um fluxo de argônio, para prevenir oxidações/inclusões (21, 36, 40, 41). Assim como a soldagem a *laser*, as uniões formadas pela soldagem a *TIG* apresentam menor corrosão galvânica (21, 36). No entanto, estudos testando a resistência à corrosão de aço inoxidável, utilizado em próteses ortopédicas, soldado pelo processo de *TIG*, mostraram que as uniões formadas se comportam como ânodos, quando presente uma corrente galvânica. Assim, essas regiões seriam mais suscetíveis à corrosão do que o metal base (42, 43).

Os produtos de corrosão dos metais em meio bucal podem causar desde alterações de coloração no esmalte a reações de hipersensibilidade

local (15, 44). No entanto, a corrosão dos aparelhos ortodônticos soldados a prata e o lançamento de seus solutos no meio ainda não estão documentados suficientemente, a ponto de se conhecer exatamente a extensão de dano que isso possa vir a causar na saúde humana (24-26, 38, 39, 44-47).

1.2 Testes de citotoxicidade e genotoxicidade in vitro e in vivo

Os testes de citotoxicidade em cultura celular são uma das primeiras etapas na avaliação da biocompatibilidade. A utilidade destes testes depende de identificar e compreender as muitas variáveis que podem afetar o seu resultado, controlando o ambiente em que a célula irá se relacionar com o material. Esses estudos também têm a habilidade de medir precisamente a resposta celular (11, 48).

Os estudos publicados que avaliaram a citotoxicidade da liga de prata utilizada em Ortodontia demonstram grande variabilidade na seleção do tipo celular utilizado (24, 26, 38, 39, 46, 47). Um dos fatores fundamentais é a escolha da linhagem celular apropriada para o teste, pois diferentes linhagens apresentam respostas diversas (48, 49).

Linhagens utilizadas

Os testes de citotoxicidade devem ser realizados preferencialmente com linhagens celulares estabelecidas. Linhagens primárias podem ser utilizadas para testar a sensibilidade específica de algum tecido, desde que a reprodutibilidade e a acurácia do teste possam ser verificadas (50). Algumas dessas linhagens são:

- HaCat: linhagem de queratinócitos humanos imortalizados de um doador adulto do sexo masculino. Por manter alto potencial de diferenciação, é utilizada em estudos como substituta de queratinócitos normais (51-53).
- Vero: linhagem de células epiteliais oriundas de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Estabelecida por Nakamura e colaboradores em 1962, é uma das poucas, na atualidade, aprovadas para uso em produção de vacinas pela Organização Mundial da Saúde (OMS)(54, 55).
- MRC-5: linhagem de fibroblastos de pulmão de um feto do sexo masculino de 14 semanas (56), utilizada na fabricação de várias vacinas e endossada pela ISO para testes de citotoxicidade (50, 57).
- HGF: linhagem primária de fibroblastos obtidos a partir de uma biópsia de gengiva de uma doadora do sexo feminino.

Quantificação da viabilidade celular por MTT

O ensaio de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) é um meio simples, preciso e reprodutível para medir a atividade das células vivas através de atividade de desidrogenase mitocondrial. Soluções de MTT, em solução salina equilibrada, são 'amareladas'. As desidrogenases mitocondriais de células viáveis clivam o anel de tetrazólico, produzindo cristais de MTT azul/roxo, que são insolúveis em soluções aquosas. A cor roxa intensa das culturas mostra viabilidade celular, considerando que a cor permanece branca quando ocorreu a necrose. Culturas de controle negativo são azul-escuras e a prova da viabilidade de

uma célula; culturas de controle positivo branco/amarelo são evidência de morte celular (39, 58).

Ensaio Cometa

A técnica do Cometa, ou eletroforese em célula única, é um método rápido, sensível e de baixo custo para a avaliação de quebras de cadeia de DNA e para investigação de dano genético associado a exposições a agentes potencialmente genotóxicos (59, 60). É um método utilizado para avaliar lesões genômicas, porém é incapaz de detectar mutações. As lesões detectadas pelo cometa são passíveis de correção (61).

As células embebidas em agarose têm suas membranas e proteínas nucleares lisadas por detergentes e extraídas por altas concentrações de sais. O DNA, por ser mais pesado e maior, ocupará o espaço que era preenchido por toda a célula e ficará retido no gel em uma estrutura chamada nucleóide. As proteínas da matriz nuclear são das poucas que resistem à extração; o nucleóide é, portanto, uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, aderidas à matriz celular do núcleo (61).

A quebra de fita simples, fita dupla ou sítios álcali-lábeis, onde se incluem os sítiosapurínicos e apiridimínicos, de DNA podem gerar fragmentos que migram com a eletroforese ou relaxar a estrutura supercondensada na região do DNA em que o dano ocorreu, permitindo a essa região, em forma de alça, se estender por um campo eletroforético. A incubação alcalina e a eletroforese fazem com que as alças de DNA que

contenham quebras movam-se em direção ao ânodo, formando a “cauda” do cometa, visível em microscopia óptica ou de fluorescência (59).

Cometa em mucosa oral

O ensaio do cometa é uma valiosa ferramenta experimental destinada a mapear os danos do DNA em células. Além disso, devido à sua grande versatilidade, permite explorar o uso de tipos de células alternativas para avaliar danos no DNA, tais como células epiteliais (62). A maioria dos tipos de epitélio só pode ser obtida por métodos invasivos, porém, as células de mucosa bucal podem ser coletadas com uma simples raspagem da bochecha, fazendo com que o teste seja um modelo atraente e potencialmente útil para investigar os efeitos *in vivo* de agentes dietéticos, químicos e outros agressores no DNA (63).

Citoma de Micronúcleos em células bucais

As células bucais têm limitada capacidade de reparo do DNA, em comparação aos linfócitos do sangue, células para as quais o teste CBMN-Cyt foi desenvolvido. No entanto, podem refletir com maior precisão eventos de instabilidade genômica relacionados ao envelhecimento em tecidos epiteliais. A regeneração é dependente da taxa de divisão e do número de células basais proliferando, da sua estabilidade genômica e de sua propensão para morte celular. Esses eventos podem ser estudados na mucosa bucal, que é um tecido facilmente acessível para amostragem de células de forma minimamente invasiva, não causando estresse aos sujeitos estudados. Este método é cada vez mais utilizado em estudos

epidemiológicos moleculares para investigar o impacto da nutrição, fatores de estilo de vida, exposição a genotoxinas, danos no genótipo e morte celular. O uso de células de mucosa bucal oferece uma oportunidade única de estudar a capacidade regenerativa do tecido epitelial (64).

1.3 Quantificação de metais presentes na amostra

A ICP-MS (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado) é uma espectrometria de massa capaz de detectar vários metais e não-metais, em concentrações tão baixas como uma parte em 10^{12} , através da ionização da amostra com plasma indutivamente acoplado e, em seguida, utilizando um espectrômetro de massa para separar e quantificar os íons.

Em comparação com as técnicas de absorção atômica, o ICP-MS tem maior velocidade, precisão e sensibilidade. No entanto, a análise por ICP-MS também é mais suscetível a traçar contaminantes do vidro e reagentes (6).

2. PROPOSIÇÃO

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo desta pesquisa é estudar, *in vitro* e *in vivo*, o potencial citotóxico e genotóxico das soldagens a prata, a *TIG* e a *laser* utilizadas em Ortodontia.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Avaliar, *in vitro*, o efeito citotóxico dos anéis ortodônticos com e sem soldagem a prata em diferentes linhagens celulares. A viabilidade celular das linhagens HGF, HaCat, MRC5 e Vero expostas aos eluídos dos anéis foi testada pelo ensaio de Redução de MTT.

2.2.2. Avaliar, *in vitro*, o potencial genotóxico das soldagens a prata, a *TIG* e a *laser* utilizadas em Ortodontia, empregando o ensaio Cometa Alcalino HGF, após exposição aos eluídos dos anéis soldados.

2.2.3. Avaliar e quantificar, através de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a presença de íons metálicos nos eluídos de anéis metálicos com e sem solda em meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM).

2.2.4. Avaliar, através da coleta de células da mucosa bucal de crianças utilizando, ou não, arco lingual, o potencial genotóxico e mutagênico da soldagem a prata e a *laser* utilizadas em Ortodontia, empregando os testes Cometa Bucal e Citoma Bucal de Micronúcleos.

2.2.5. Avaliar e quantificar, através de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a presença de íons metálicos na urina de crianças utilizando, ou não, arco lingual.

A Ortodontia, desde o seu surgimento, utilizou ligas metálicas na cavidade bucal (65). Muitos dos componentes das ligas utilizadas em Ortodontia, como Ni, Cr e Ag, são reconhecidamente tóxicos às células e conhecidos alérgenos (15, 66, 67). Além disso, não se pode desconsiderar a resposta biológica que os metais dissolvidos, e transportados pela corrente circulatória, possam causar em outras partes do organismo.

Os trabalhos *in vitro* investigam principalmente a liberação iônica, quantificando a presença de metais em variados meios (saliva artificial, soluções ácidas, soluções salinas), e a citotoxicidade (24-26, 38, 39, 45-47). A genotoxicidade da soldagem a prata foi somente testada no trabalho de Gonçalves et al.(46), que constataram importante genotoxicidade com os anéis soldados no teste Cometa alcalino e Cometa modificado.

A soldagem a *laser* demonstra um melhor desempenho do que a soldagem convencional nos testes de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*. No entanto, não são encontrados estudos com pacientes em Ortodontia avaliando o efeito dessa técnica na mucosa bucal. Em geral, os laboratórios de Ortodontia não dispõem dessa tecnologia, que embora apresente inúmeras vantagens técnicas, tem sido dispensada (22). Além disso, a técnica é considerada cara pelos dentistas (68).

A falta de consenso a respeito da segurança clínica da soldagem a prata e a escassez (praticamente, inexistência) de equipamentos a *laser* nos laboratórios de Ortodontia nos levaram a pesquisar uma terceira opção para

a soldagem: solda a *TIG*. A solda a *TIG* é hoje um dos métodos mais utilizado para soldagens industriais (69). Os estudos sobre soldagem a *TIG*, em Odontologia, são bastante escassos; a maioria deles avalia as propriedades mecânicas das uniões (21, 36, 40, 43, 68, 70-72). No entanto, julgamos que a avaliação da biocompatibilidade seja um aspecto importante a ser considerado na eleição de uma nova técnica ou material. Assim, resolvemos incluir a soldagem a *TIG* na nossa investigação.

No estudo *in vitro*, optamos por utilizar uma linhagem primária, ao invés de uma linhagem estabelecida, por ser a linhagem disponível relacionada com a cavidade bucal. Mesmo assim, achamos importante a comparação com as linhagens estabelecidas para sabermos se os fibroblastos gengivais humanos responderiam adequadamente aos tratamentos. Os fibroblastos gengivais humanos foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro, oriundos da biópsia de uma papila dental de um doador do sexo feminino.

O HGF não tem um tempo de duplicação definido. O que foi observado é que, logo após o estabelecimento da cultura, as células se duplicavam rapidamente, e que, após aproximadamente 12 passagens, a duplicação se tornava mais lenta. Consultamos a literatura, e dois trabalhos relacionavam a senescência desse tipo de célula com um maior tempo de duplicação e uma maior resistência frente a íons metálicos (73, 74). Dessa forma, todos os nossos experimentos foram realizados com intervalos de, no máximo, uma passagem entre as triplicatas, nunca excedendo a 12^a passagem.

Os estudos de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* utilizam diferentes linhagens celulares, que podem apresentar respostas diversas frente ao mesmo agente. O teste Cometa alcalino apresentou um maior índice de dano com a soldagem a prata do que com a soldagem a *laser* e a *TIG*. Atualmente, está sendo realizado o citoma de micronúcleos para as células HGF para podermos ampliar a avaliação do tipo de efeito que os metais liberados podem causar às células.

Em relação a quantidade de metais liberados, é preciso considerar que foi seguida a orientação para extração da ISO 10993-5 (50), que indica uma quantidade extrema para realização dos testes. A análise qualitativa dos íons liberados foi compatível com a literatura, indicando que o Cu é o metal mais liberado pela liga de prata. No entanto, os valores encontrados não podem ser considerados para extrapolação clínica.

A indução de lesões no DNA é um fator reconhecidamente associado à promoção e/ou desenvolvimento do câncer (75) Este estudo, por meio da investigação das atividades citotóxicas e genotóxicas dos anéis soldados, pretende contribuir para a elucidação de uma possível associação entre o uso dessas técnicas e a incidência de câncer bucal.

No Brasil, de acordo com dados do Conselho Federal de Odontologia (76), a Ortodontia e a Ortodontia e Ortopedia Facial somam mais de 19.000 profissionais especialistas. É a atividade da Odontologia que possui o maior número de profissionais especialistas registrados. Isso tem como reflexo um aumento no número de indivíduos que recebem tratamento ortodôntico. Considerando-se que o uso de aparelhos ortodônticos está mais

acessível à população, inclusive pela inclusão destes procedimentos na tabela do SUS pelo Governo Federal (77), é imperativo testar os materiais que, embora sejam de uso consagrado, nunca foram amplamente investigados.

A incidência de carcinoma escamocelular de língua sempre foi relacionada a indivíduos acima de 40 anos, do sexo masculino, que faziam uso de tabaco e/ou álcool. A comunidade científica, no entanto, tem dado atenção ao aumento da incidência de câncer bucal em crianças e adultos jovens (78-83), cuja etiologia ainda não está completamente elucidada. O ortodontista tem, portanto, um importante papel na detecção dessa patologia (79), e necessita ter certeza de que os materiais que utiliza não representam risco adicional a seus pacientes.

No estudo clínico, as soldagens não causaram importantes efeitos genotóxicos no período avaliado, tampouco aumentaram a concentração de íons na urina. Avaliando os gráficos disponíveis em material anexo, é possível visualizar a distribuição dos íons nos três grupos nas quatro coletas celulares. Nos gráficos são vistos os casos que estão fora dos valores gerais e que podem ter influenciado nas médias. Mesmo assim, resolvemos mantê-los no estudo. Menezes et al (66) também identificaram variações individuais na quantificação de Ni na urina de pacientes antes e após dois meses de instalação dos aparelhos.

4 CONCLUSÃO

1. A soldagem a prata apresentou elevado potencial citotóxico para as linhagens HGF, HaCat, MRC-5 e Vero. Os eluídos metálicos dos anéis soldados a *laser* e a TIG, assim como os eluídos dos anéis sem solda, não reduziram a viabilidade celular nas linhagens testadas.
2. A soldagem a prata aumentou o índice de danos e a frequência de danos nas células HGF testadas pelo teste Cometa Alcalino. As soldagens a laser, a TIG e os anéis sem solda não induziram genotoxicidade.
3. Os íons encontrados nos meios de cultura com eluídos metálicos dos anéis soldados foram, em ordem decrescente: Cu, Ag, Zn, Fe, Sn, Cr, Ni e Cd (solda prata); Fe, Ni, Zn, Cr, Sn e Ag (solda *laser*); Fe, Cr, Ni, Zn, Cu, Sn e Cd (solda TIG); Fe, Zn, Cu, Ni, Cr e Sn (anéis sem solda).
4. A soldagem a prata e a laser não induziram genotoxicidade na mucosa bucal durante o período estudado.
5. Os íons metálicos quantificados na urina por ICP-MS não podem ser atribuídos apenas à corrosão do aparelho ortodôntico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Letti HCB, Rizzato SMD, Menezes LMD, Reale CS, Lima EMD, Martinelli FL. Sagittal changes in lower incisors by the use of lingual arch. *Dental Press Journal of Orthodontics*. 2013;18:29-34.
2. Laing E, Ashley P, Naini FB, Gill DS. Space maintenance. *International Journal of Paediatric Dentistry*. 2009;19(3):155-62.
3. Gianelly AA. Leeway space and the resolution of crowding in the mixed dentition. *Seminars in Orthodontics*. 1995;1(3):188-94.
4. Viglianisi A. Effects of lingual arch used as space maintainer on mandibular arch dimension: A systematic review. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2010;138(4):382.e1-e4.
5. Heidemann J, Witt E, Feeg M, Werz R, Pieger K. Orthodontic soldering techniques: aspects of quality assurance in the dental laboratory. *J Orofac Orthop*. 2002;63(4):325-38.
6. Grimsdottir MR, Gjerdet NR, Hensten-Pettersen A. Composition and in vitro corrosion of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1992;101(6):525-32.
7. 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; discussion 93-4.
8. von Fraunhofer JA. Corrosion of orthodontic devices. *Semin Orthod*. 1997;3(3):198-205.
9. Macedo de Menezes L, Cardoso Abdo Quintão C. The Release of Ions from Metallic Orthodontic Appliances. *Seminars in Orthodontics*. 2010;16(4):282-92.
10. Kuhta M, Pavlin D, Slaj M, Varga S, Lapter-Varga M. Type of archwire and level of acidity: effects on the release of metal ions from orthodontic appliances. *Angle Orthod*. 2009;79(1):102-10.
11. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental Materials*. 2012;28(1):23-40.
12. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941-53.
13. Mirjalili M, Momeni M, Ebrahimi N, Moayed MH. Comparative study on corrosion behaviour of Nitinol and stainless steel orthodontic wires in simulated saliva solution in presence of fluoride ions. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(4):2084-93.
14. Mikulewicz M, Wołowicz P, Loster BW, Chojnacka K. Do soft drinks affect metal ions release from orthodontic appliances? *J Trace Elem Med Biol*. 2015;31:74-7.
15. Amini F, Borzabadi Farahani A, Jafari A, Rabbani M. In vivo study of metal content of oral mucosa cells in patients with and without fixed orthodontic appliances. *Orthod Craniofac Res*. 2008;11(1):51-6.

16. Souza RM, Menezes LM. Nickel, Chromium and Iron Levels in the Saliva of Patients with Simulated Fixed Orthodontic Appliances. *The Angle Orthodontist*. 2008;78(2):345-50.
17. Reclaru L, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Susz C, Eschler PY, Zuercher MH, et al. Ni–Cr based dental alloys; Ni release, corrosion and biological evaluation. *Materials Science and Engineering: C*. 2012;32(6):1452-60.
18. Arciniegas M, Manero JM, Espinar E, Llamas JM, Barrera JM, Gil FJ. New Ni-free superelastic alloy for orthodontic applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(6):3325-8.
19. Thyssen JP, Menné T. Metal allergy--a review on exposures, penetration, genetics, prevalence, and clinical implications. *Chem Res Toxicol*. 2010;23(2):309-18.
20. 32004L0096, L301 (27/09/2004).
21. 31994L0027, L188 (22/07/1994).
22. Bock JJ, Bailly J, Fuhrmann RA. Effects of different brazing and welding methods on the fracture load of various orthodontic joining configurations. *J Orthod*. 2009;36(2):78-84.
23. Hurt AJ. Digital technology in the orthodontic laboratory. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;141(2):245-7.
24. 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.
25. Freitas MP, Oshima HM, Menezes LM. Release of toxic ions from silver solder used in orthodontics: an in-situ evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(2):177-81.
26. Freitas MP, Oshima HM, Menezes LM, Machado DC, Viezzer C. Cytotoxicity of silver solder employed in orthodontics. *Angle Orthod*. 2009;79(5):939-44.
27. Eliades T. Orthodontic materials research and applications: part 2. Current status and projected future developments in materials and biocompatibility. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2007;131(2):253-62.
28. Ntasi A, Jabbari YA, Mueller WD, Eliades G, Zinelis S. Metallurgical and electrochemical characterization of contemporary silver-based soldering alloys. *Angle Orthod*. 2013.
29. Dentistry - Brazing Materials [ISO 9333:2006], (2006).
30. Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *Int J Occup Environ Health*. 2007;13(2):202-12.
31. Novelli EL, Vieira EP, Rodrigues NL, Ribas BO. Risk assessment of cadmium toxicity on hepatic and renal tissues of rats. *Environ Res*. 1998;79(2):102-5.
32. Hartwig A. Cadmium and cancer. *Metal ions in life sciences*. 2013;11:491-507.

33. Berge M, Gjerdet NR, Erichsen ES. Corrosion of silver soldered orthodontic wires. *Acta Odontol Scand.* 1982;40(2):75-9.
34. Kozłowski H, Kolkowska P, Watly J, Krzywoszynska K, Potocki S. General aspects of metal toxicity. *Curr Med Chem.* 2014;21(33):3721-40.
35. Fleischer M, Sarofim AF, Fassett DW, Hammond P, Shacklette HT, Nisbet IC, et al. Environmental impact of cadmium: a review by the Panel on Hazardous Trace Substances. *Environ Health Perspect.* 1974;7:253-323.
36. Bock JJ, Bailly J, Gernhardt CR, Fuhrmann RA. Fracture strength of different soldered and welded orthodontic joining configurations with and without filling material. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(5):328-35.
37. Fornaini C, Bertrand C, Bonanini M, Rocca JP, Nammour S. Welding in the dental office by fiber-delivered laser: a new technique. *Photomed Laser Surg.* 2009;27(3):417-23.
38. 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.
39. 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.
40. Rocha R, Pinheiro AL, Villaverde AB. Flexural strength of pure Ti, Ni-Cr and Co-Cr alloys submitted to Nd:YAG laser or TIG welding. *Braz Dent J.* 2006;17(1):20-3.
41. Wang RR, Welsch GE. Joining titanium materials with tungsten inert gas welding, laser welding, and infrared brazing. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 1995;74(5):521-30.
42. Reclaru L, Lerf R, Eschler PY, Meyer JM. Corrosion behavior of a welded stainless-steel orthopedic implant. *Biomaterials.* 2001;22(3):269-79.
43. Dadfar M, Fathi MH, Karimzadeh F, Dadfar MR, Saatchi A. Effect of TIG welding on corrosion behavior of 316L stainless steel. *Materials Letters.* 2007;61(11–12):2343-6.
44. Gonçalves TS, Menezes LM, Trindade C, Thomas P, Fenech M, Henriques JA. In vivo evaluation of the genotoxic effects of Hyrax auxiliary orthodontic appliances containing silver-soldered joints. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2015;791:25-9.
45. 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.
46. Gonçalves TS, Menezes LM, Trindade C, Machado MaS, 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.

47. 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.
48. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. *Dent Mater*. 1994;10(3):156-61.
49. Wataha JC, Hanks CT, Craig RG. In vitro effects of metal ions on cellular metabolism and the correlation between these effects and the uptake of the ions. *J Biomed Mater Res*. 1994;28(4):427-33.
50. Standardization IOF. ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices -- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.
51. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*. 1988;106(3):761.
52. Seo M-D, Kang TJ, Lee CH, Lee A-Y, Noh M. HaCaT Keratinocytes and Primary Epidermal Keratinocytes Have Different Transcriptional Profiles of Cornified Envelope-Associated Genes to T Helper Cell Cytokines. *Biomolecules & Therapeutics*. 2012;20(2):171-6.
53. Schoop VM, Mirancea N, Fusenig NE. Epidermal organization and differentiation of HaCaT keratinocytes in organotypic coculture with human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*. 1999;112(3):343-53.
54. Alves EA, Guimarães ACR. Cultivo celular. In: Molinaro EM, Caputo LFG, Amendoeira MRR, editors. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde v 2. 2*. Rio de Janeiro: EPSJV; 2010. p. 254.
55. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Current protocols in microbiology*. 2008;APPENDIX:Appendix-4E.
56. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. *Nature*. 1970;227(5254):168-70.
57. Vlecken DHW, Pelgrim RPM, Ruminski S, Bakker WAM, van der Pol LA. Comparison of initial feasibility of host cell lines for viral vaccine production. *Journal of Virological Methods*. 2013;193(1):28-41.
58. 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.
59. Bagatini PB, Maluf SW. Ensaio Cometa. In: Maluf SW, Riegel M, al. e, editors. *Citogenética Humana*. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2011. p. 194-202.
60. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988;175(1):184-91.

61. Gontijo AMMCT. Teste Cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: Ribeiro LR, Savadori DMF, Marques EK, editors. Mutagênese Ambiental. Canoas: Ed. ULBRA; 2003. p. 247-79.
62. Rojas E, Lorenzo Y, Haug K, Nicolaissen B, Valverde M. Epithelial cells as alternative human biomatrices for comet assay. *Front Genet.* 2014;5:386.
63. Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM, et al. A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res.* 2005;578(1-2):371-81.
64. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2009;4(6):825-37.
65. Quintão CCA, Brunharo IHVP. Fios ortodônticos: conhecer para otimizar a aplicação clínica. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial.* 2009;14:144-57.
66. Menezes LM, Quintão CA, Bolognese AM. Urinary excretion levels of nickel in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(5):635-8.
67. Menezes LM, Campos LC, Quintão CC, Bolognese AM. Hypersensitivity to metals in orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;126(1):58-64.
68. Simamoto Júnior PC, Resende Novais V, Rodrigues Machado A, Soares CJ, Araújo Raposo LH. Effect of joint design and welding type on the flexural strength and weld penetration of Ti-6Al-4V alloy bars. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 2015;113(5):467-74.
69. Graczyk H, Lewinski N, Zhao J, Concha-Lozano N, Riediker M. Characterization of Tungsten Inert Gas (TIG) Welding Fume Generated by Apprentice Welders. *The Annals of occupational hygiene.* 2016;60(2):205-19.
70. Bock JJ, Fraenzel W, Bailly J, Gernhardt CR, Fuhrmann RA. Influence of different brazing and welding methods on tensile strength and microhardness of orthodontic stainless steel wire. *Eur J Orthod.* 2008;30(4):396-400.
71. Matos IC, Bastos IN, Diniz MG, de Miranda MS. Corrosion in artificial saliva of a Ni-Cr-based dental alloy joined by TIG welding and conventional brazing. *J Prosthet Dent.* 2015;114(2):278-85.
72. Castro MG, Araújo CA, Menegaz GL, Silva JPL, Nóbilo MAA, Simamoto Júnior PC. Laser and plasma dental soldering techniques applied to Ti-6Al-4V alloy: Ultimate tensile strength and finite element analysis. *The Journal of Prosthetic Dentistry.* 2015;113(5):460-6.
73. Satoh R, Kishino K, Morshed SR, Takayama F, Otsuki S, Suzuki F, et al. Changes in fluoride sensitivity during in vitro senescence of normal human oral cells. *Anticancer Res.* 2005;25(3B):2085-90.
74. Contreras RG, Sakagami H, Nakajima H, Shimada J. Type of cell death induced by various metal cations in cultured human gingival fibroblasts. *In Vivo.* 2010;24(4):513-7.

75. Wei Q, Matanoski GM, Farmer ER, Hedayati MA, Grossman L. DNA repair and aging in basal cell carcinoma: a molecular epidemiology study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(4):1614-8.
76. <http://cfo.org.br/servicos-e-consultas/dados-estatisticos/> Brasília, DF, Brazil: Conselho Federal de Odontologia; 2014 [
77. http://dab.saude.gov.br/cnsb/bs_oferece.php Brasilia, DF, Brazil: Ministério da Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Geral de Saúde Bucal; 2014
78. Bodner L, Manor E, Friger MD, van der Waal I. Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger – Review and analysis of 186 reported cases. *Oral Oncology*. 2014;50(2):84-9.
79. Santos-Silva AR, Carvalho Andrade MA, Jorge J, Almeida OP, Vargas PA, Lopes MA. Tongue squamous cell carcinoma in young nonsmoking and nondrinking patients: 3 clinical cases of orthodontic interest. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2014;145(1):103-7.
80. Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol*. 2000;36(4):387-9.
81. Chow CW, Tabrizi SN, Tiedemann K, Waters KD. Squamous cell carcinomas in children and young adults: a new wave of a very rare tumor? *J Pediatr Surg*. 2007;42(12):2035-9.
82. Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Corrêa L, de Sousa SO. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci*. 2010;52(2):267-73.
83. Morris LG, Patel SG, Shah JP, Ganly I. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in the pediatric age group: a matched-pair analysis of survival. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;136(7):697-701.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DESTINADO A PESQUISA DAS SOLDAGENS UTILIZADAS EM ORTODONTIA

Pesquisa: Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das soldagens a prata, a *TIG* e a *laser* utilizadas em Ortodontia.

I. Objetivos e justificativa da pesquisa: Essa pesquisa pretende avaliar os efeitos, no organismo humano, dos aparelhos ortodônticos que apresentam solda de prata, soldagem a *TIG* (*Tunstein Inert Gas*) ou a *laser*, mais precisamente no material genético das células da mucosa bucal.

II. Procedimentos a serem utilizados: Coleta de células da mucosa bucal com auxílio de escova citológica (semelhante a uma pequena escova de dentes), que será friccionada na bochecha. Serão realizadas seis coletas de células: 1. Duas antes de instalar o aparelho, 2. Após 15 dias de instalação do aparelho, 3. Após 28 dias da instalação do aparelho, 3. Após 6 meses da colocação do aparelho, 4. Após 1 ano da instalação do aparelho. Coleta de urina nos dias das coletas de células.

III. Os desconfortos ou riscos esperados: O único desconforto esperado é uma mínima pressão da escova na bochecha durante a coleta das células. As escovas utilizadas serão de uso exclusivo e serão descartadas imediatamente após o uso.

IV. Garantia de resposta a qualquer pergunta: Qualquer dúvida ou questionamento sobre a pesquisa poderá ser esclarecido a qualquer momento.

V. Liberdade de abandonar a pesquisa sem prejuízo para si: Caso o responsável pelo menor desejar que este abandone a pesquisa, não haverá qualquer prejuízo e não ocorrerão modificações no tratamento proposto. Ressaltamos que a concordância em participar desse estudo não implica em qualquer modificação no tratamento que já está sendo feito. Da mesma forma, a não concordância em participar desse estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido.

VI. Garantia de privacidade: os dados serão mantidos em sigilo.

VII. Compromisso com informação atualizada do estudo: Os resultados da pesquisa serão transmitidos de forma atualizada aos participantes e meios científicos, através de artigos.

Eu, _____, responsável pelo menor _____ fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do tratamento a ser realizado e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim o desejar. Fui certificado de que todos os dados referentes aos exames realizados serão confidenciais, bem como o respectivo tratamento não será modificado em razão desse estudo, e terei liberdade de não mais consentir em participar da pesquisa, face a essas informações.

Fui informado que não existirão danos à saúde causados diretamente pela pesquisa. Também sei que, caso existam gastos adicionais em relação à pesquisa, estes serão absorvidos pelo orçamento da mesma. Caso surjam novas perguntas sobre este estudo ou para qualquer pergunta sobre os direitos como participante deste estudo, posso entrar em contato com as pesquisadoras responsáveis, Dra. Luciane Macedo de Menezes e Dra. Mariana Roennau Lemos Rinaldi, pelos telefones 3320 3538 e 3024 6543, ou Comitê de Ética em Pesquisa da PUC (CEP): Av. Ipiranga 6681, Prédio 40 - Sala 505, Porto Alegre, telefone 3320 3345, de segunda a sexta-feira, horário manhã das 8h30min às 12h e à tarde das 13h30min às 17h.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Porto Alegre, _____ de 201__.

Assinatura do Participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador Associado

Mariana R. Lemos Rinaldi

CRO-RS 10930.

Nome do Participante da pesquisa

Este formulário foi lido para _____ (nome do participante da pesquisa) em ___/___/___ (data) por Mariana R. Lemos Rinaldi enquanto eu estava presente.

Assinatura de Testemunha

Nome da Testemunha

Termo de assentimento do menor

Você está sendo convidado para participar da pesquisa *Avaliação in vitro e in vivo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das soldagens a prata, a TIG e a laser utilizadas em Ortodontia*. Seus pais permitiram que você participe.

Queremos saber os efeitos, no corpo humano, dos aparelhos ortodônticos que têm solda. A solda permite a união de dois metais, como se ficassem colados. Existem vários tipos de solda para aparelhos. Vamos estudar a solda de prata, soldagem a TIG e a laser.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de 6 a 13 anos de idade. Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu; não terá nenhum problema se desistir.

A pesquisa será feita na Faculdade de Odontologia da PUCRS, onde as crianças colocarão um aparelho chamado Arco Lingual. Esse aparelho é utilizado para ajudar na prevenção de dentes tortos. O aparelho não causa dor. Na pesquisa, será realizada a escovação da bochecha para remoção de células – o que também não dói. E será feito o estudo na sua urina também. Em seis consultas serão realizadas essas escovações, e você irá urinar em um potinho fornecido (no banheiro, é claro!). O aparelho é seguro, mas é possível ocorrer quebras e descolagem do aparelho. Caso aconteça algo errado, você pode nos procurar pelos telefones 3024 6543 (pesquisadora Mariana R. L. Rinaldi), telefone 3320 3538 (Dra. Luciane Macedo de Menezes), ou Comitê de Ética em Pesquisa da PUC (CEP): Av. Ipiranga 6681, Prédio 40 - Sala 505, Porto Alegre, telefone 3320.3345, de segunda a sexta-feira, horário manhã das 8h30min às 12h e à tarde das 13h30min às 17h.

E há coisas boas que podem acontecer, como evitar que os dentes fiquem mais tortos, pois os dentes permanentes terão suficiente espaço para nascerem.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa.

Quando terminarmos a pesquisa iremos publicar os resultados em revistas científicas para que mais pessoas conheçam os efeitos das soldas no corpo humano.

Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou à pesquisadora Dra. Luciane Macedo de Menezes. Eu escrevi os telefones na parte de cima desse texto.

Eu _____ aceito participar da 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*, que tem o objetivo de estudar os efeitos, no corpo humano, dos aparelhos ortodônticos que têm solda de prata, soldagem a TIG (*Tunstein Inert Gas*) ou a laser. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Porto Alegre, ____ de _____ de _____.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da 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

Pesquisador: Luciane Macedo de Menezes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38391314.0.0000.5336

Instituição Proponente: UNIAO BRASILEIRA DE EDUCACAO E ASSISTENCIA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 984.020

Data da Relatoria: 23/02/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa em nível de doutorado, no pós-graduação em odontologia, cujo objetivo geral "é estudar, in vitro e in vivo, o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico das soldagens à prata, a TIG e a laser utilizadas em Ortodontia." Será desenvolvido em duas etapas, a primeira etapa será in vitro e a segunda etapa será clínica.

Objetivo da Pesquisa:

- 1) avaliar in vitro o efeito dos íons liberados por anéis ortodônticos com e sem soldagem à prata nas linhagens Balb/3T3, MRC5, FGH e HaCat, testadas através dos ensaios de MTT e clonogênico, para determinar a mais sensível aos íons liberados;
- 2) avaliar o potencial genotóxico e mutagênico das soldagens à prata, a TIG e a laser empregando os ensaios cometa alcalino, cometa modificado e citoma de micronúcleos em linhagens HaCat e MRC5;
- 3) quantificar, em ICP-MS, a liberação de íons decorrentes da corrosão dos anéis metálicos com e sem solda, e
- 4) avaliar o potencial genotóxico e mutagênico da soldagem a prata, a TIG a laser utilizadas em Ortodontia nas células da mucosa bucal de crianças e adultos em tratamento ortodôntico, empregando os testes cometa bucal e citoma bucal de micronúcleos.

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505

Bairro: Partenon

CEP: 90.619-900

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3320-3345

Fax: (51)3320-3345

E-mail: cep@puhrs.br

Continuação do Parecer: 984.020

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A soldagem à prata é a técnica consagrada em Ortodontia e as soldagens a TIG e laser são utilizadas em outras especialidades da Odontologia, como a Prótese Dentária. Riscos relativos ao tratamento relacionam-se com quebras e falhas nos aparelhos, para isso, os sujeitos da amostra receberão assistência constante e receberão telefone de contato dos pesquisadores para comunicar qualquer intercorrência.

Benefícios:

As crianças do estudo receberão manutenção e supervisão de espaço, diminuindo demandas futuras de tratamentos corretivos mais complexos. Os adultos envolvidos no estudo, terão indicação de expansão maxilar, dentro de um planejamento de Ortodontia Corretiva, e terão a oportunidade de realizar todo o seu tratamento. Muitos dos componentes das ligas utilizadas em Ortodontia, níquel, cobalto, cromo e prata, são reconhecidamente tóxicos às células e conhecidos alérgenos. Além disso, não se pode desconsiderar a resposta biológica que os metais dissolvidos, e transportados pela corrente circulatória, possam causar em outras partes do organismo. O meio bucal é propício a causar biodegradação das ligas metálicas através da ação de correntes galvânicas, de variações de temperatura, da presença de biofilme e de diferentes enzimas. Os estudos de citotoxicidade in vitro utilizam diferentes linhagens celulares, que podem apresentar respostas diversas frente ao mesmo agente. Dessa forma, cabe quantificar a resposta das linhagens durante o teste de citotoxicidade e, assim, poder classificá-las quanto a sua sensibilidade. Essa informação poderá auxiliar na seleção do tipo celular para futuros estudos de citotoxicidade de metais utilizados em Ortodontia. A investigação das atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas dos anéis soldados, contribuirá cientificamente para a elucidação de uma possível associação entre o uso dessas técnicas e a incidência de câncer bucal. Considerando-se que o uso de aparelhos ortodônticos está mais acessível à população, inclusive pela inclusão destes procedimentos na tabela do SUS pelo Governo Federal, é imperativo testar os materiais que, embora sejam de uso consagrado, nunca foram corretamente documentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores justificaram, alteraram ou acrescentaram todos os itens apontados pelo CEP. O TCLE foi reformulado e corrigido, os autores acrescentaram um termo de assentimento, as cartas de autorização do chefe do serviço/responsável pelo laboratório foram apresentadas.

Endereço: Av. Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

Continuação do Parecer: 984.020

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos/documentos foram apresentados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as pendências foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

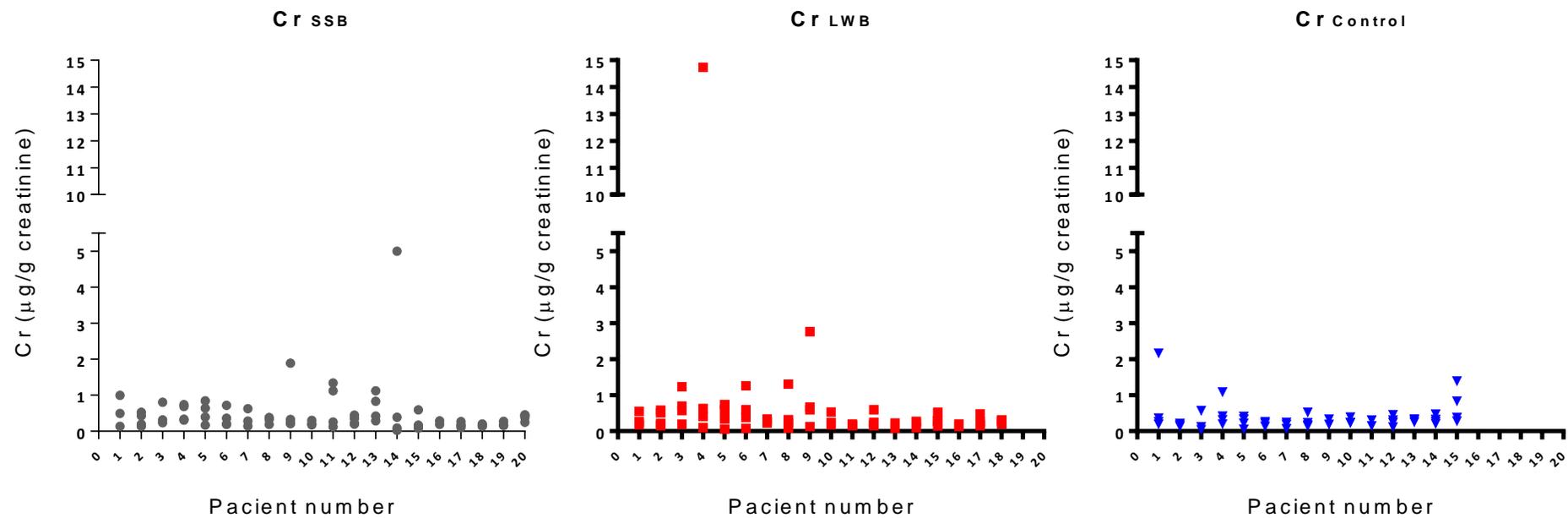
Considerações Finais a critério do CEP:

PORTO ALEGRE, 12 de Março de 2015

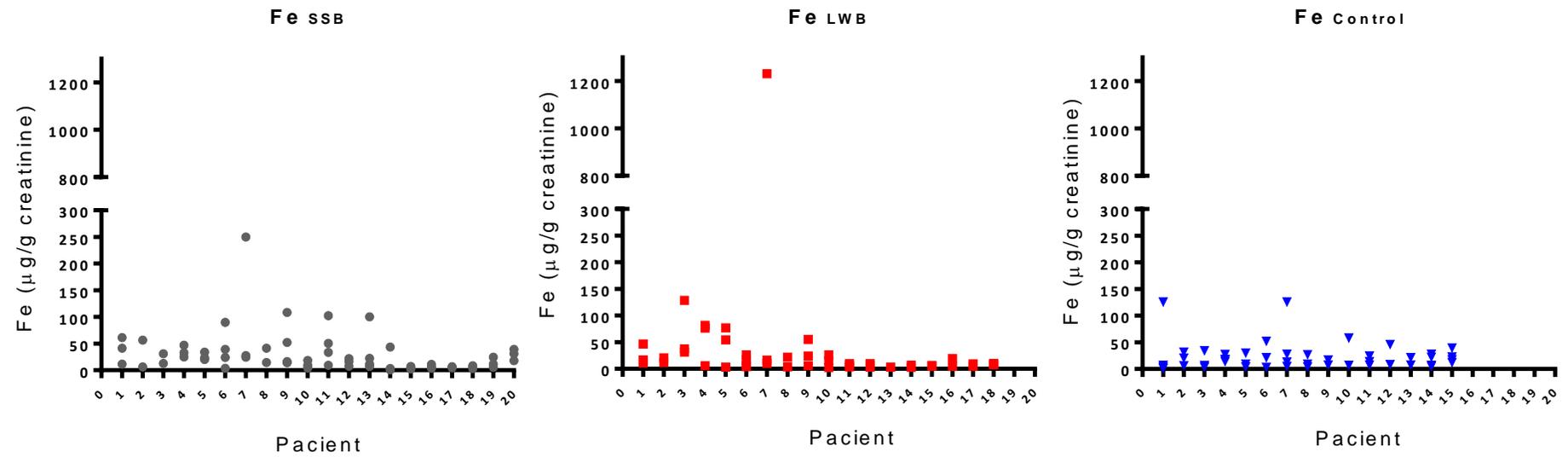
Assinado por:
Rodolfo Herberto Schneider
(Coordenador)

Endereço: Av.Ipiranga, 6681, prédio 40, sala 505
Bairro: Partenon **CEP:** 90.619-900
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3320-3345 **Fax:** (51)3320-3345 **E-mail:** cep@pucrs.br

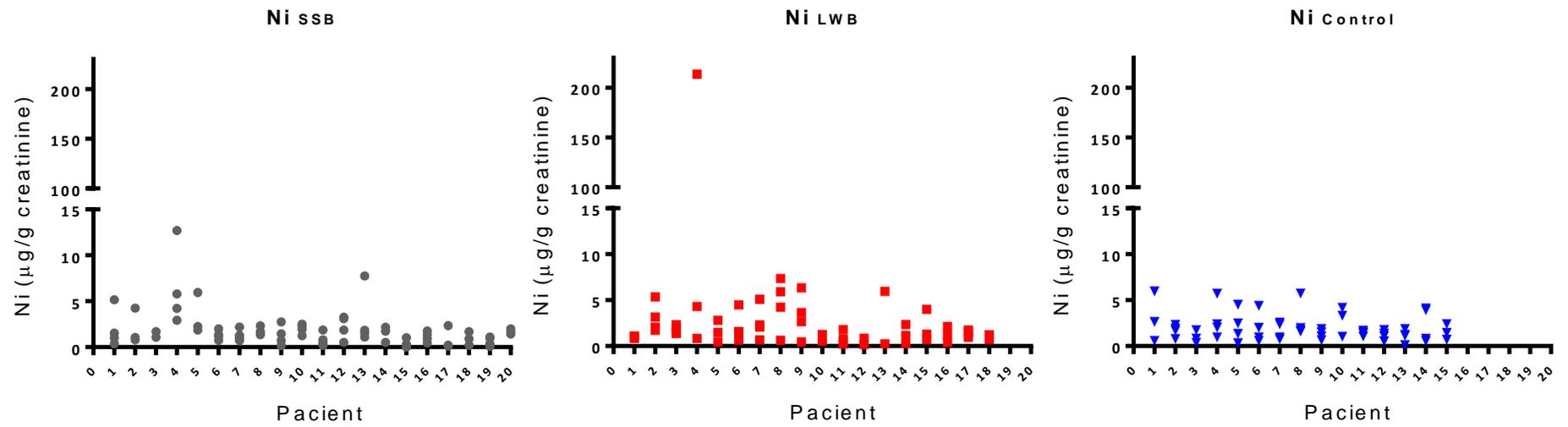
Níveis urinários de cromo apresentados pelos pacientes ao longo das coletas nos diferentes grupos.



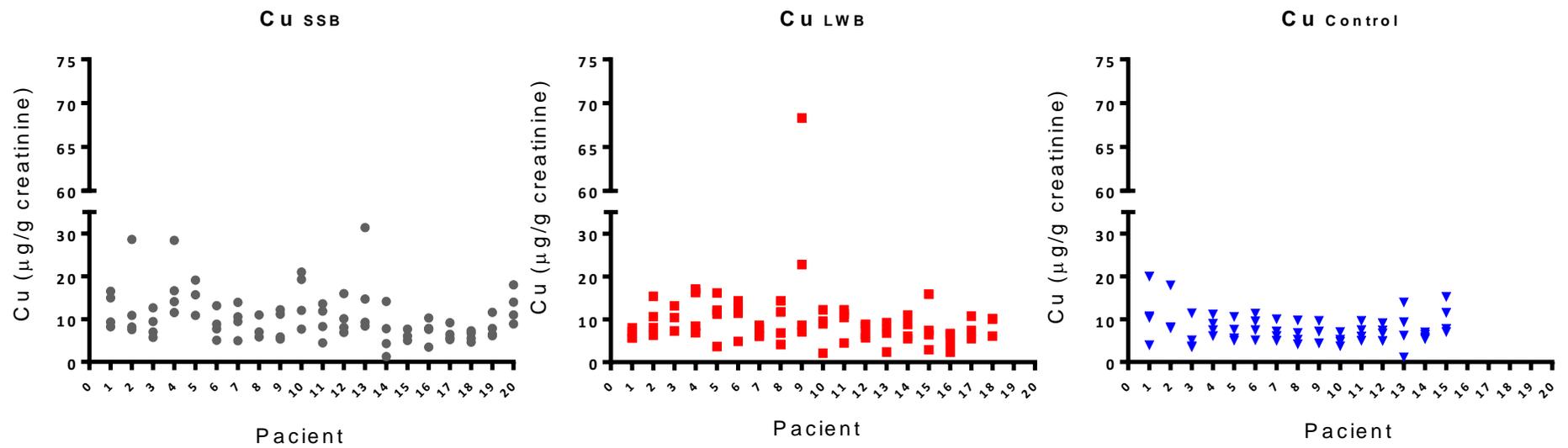
Níveis urinários de ferro apresentados pelos pacientes ao longo das coletas nos diferentes grupos.



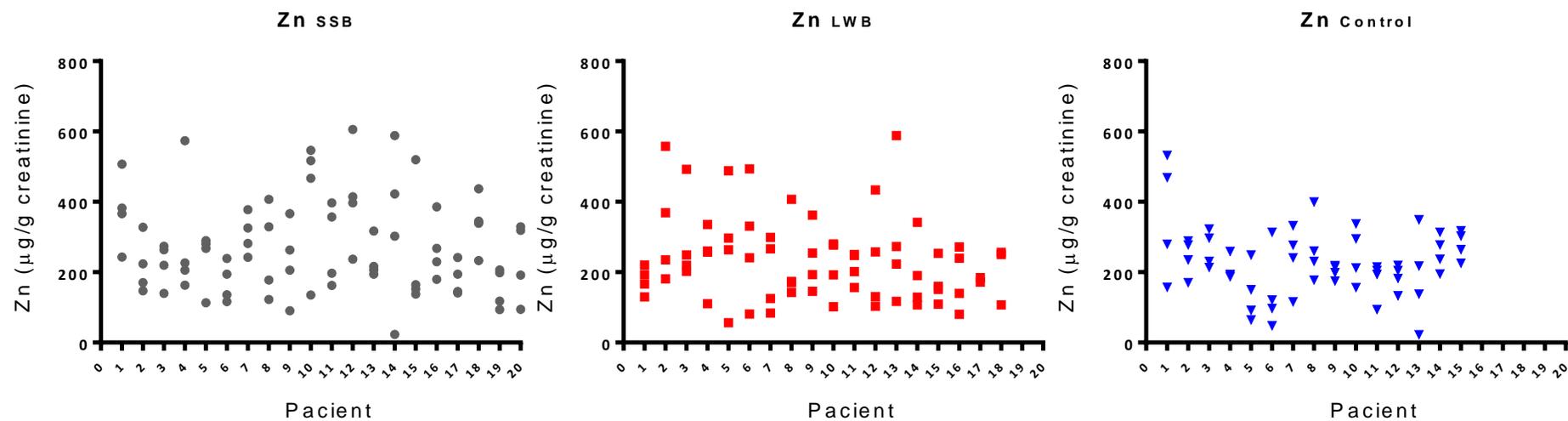
Níveis urinários de níquel apresentados pelos pacientes ao longo das coletas nos diferentes grupos.



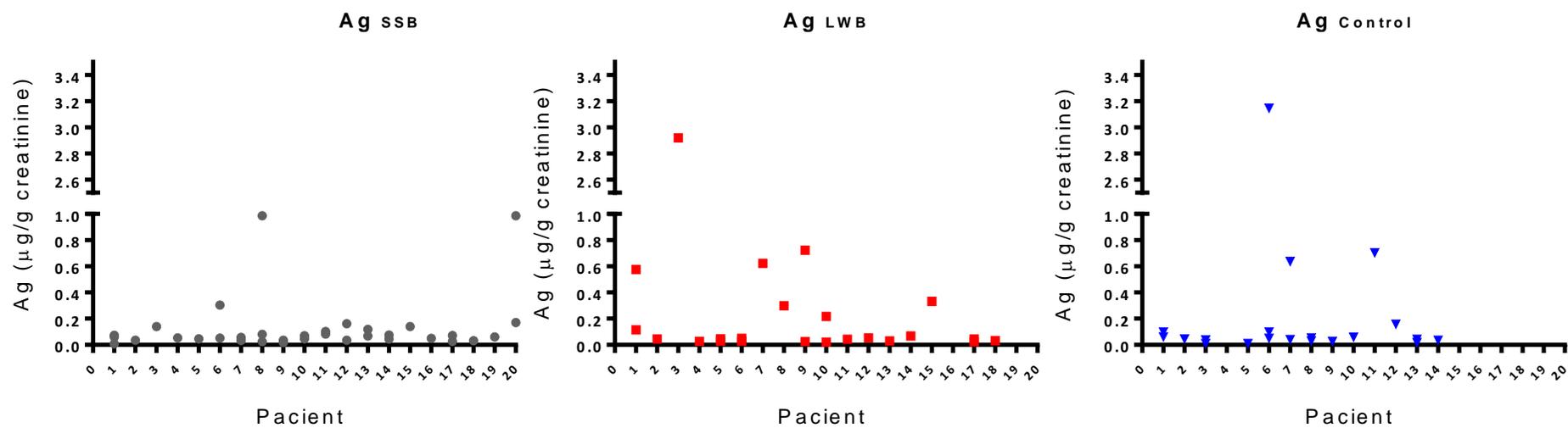
Níveis urinários de cobre apresentados pelos pacientes ao longo das coletas nos diferentes grupos.



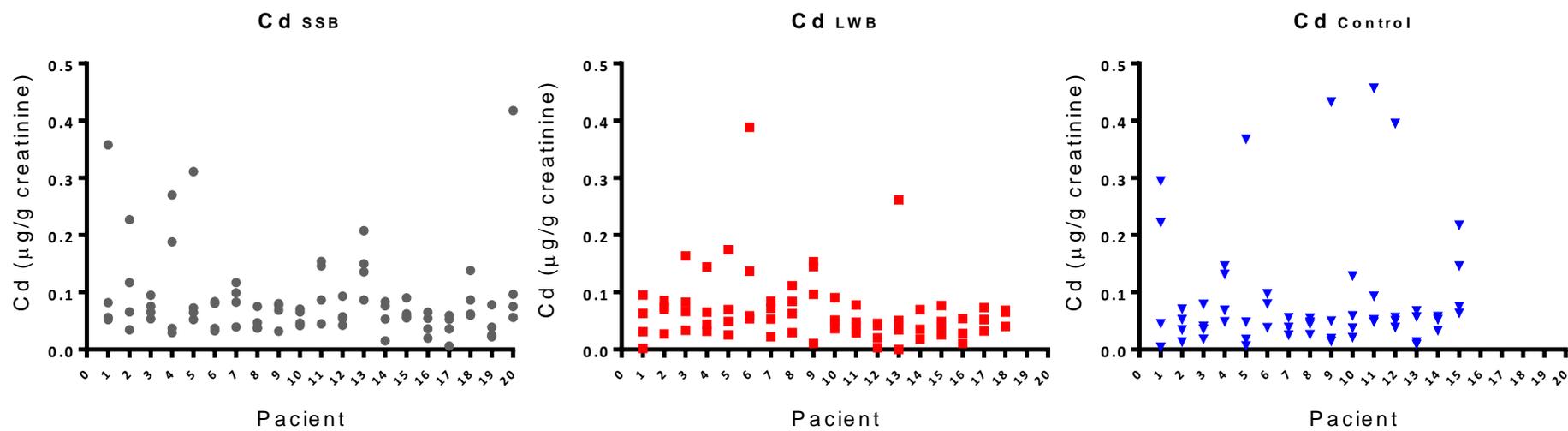
Níveis urinários de zinco apresentados pelos pacientes ao longo das coletas nos diferentes grupos.



Níveis urinários de prata apresentados pelos pacientes ao longo das coletas nos diferentes grupos.



Níveis urinários de cádmio apresentados pelos pacientes ao longo das coletas nos diferentes grupos.



Níveis urinários de estanho apresentados pelos pacientes ao longo das coletas nos diferentes grupos.

