

**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 DA SOLDA DE PRATA E DA SOLDAGEM A *LASER*
UTILIZADAS EM ORTODONTIA**

TATIANA SIQUEIRA GONÇALVES

Porto Alegre

2013

Tatiana Siqueira Gonçalves

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA CITOTOXICIDADE E DA
GENOTOXICIDADE DA SOLDA DE PRATA E DA SOLDAGEM A *LASER*
UTILIZADAS EM ORTODONTIA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes

Coorientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre
2013

CIP – Catalogação na Publicação

G635a Gonçalves, Tatiana Siqueira

Avaliação in vitro e in vivo da citotoxicidade e da genotoxicidade da solda de prata e da soldagem a laser utilizadas em ortodontia / Tatiana Siqueira Gonçalves . – 2013.

111 f. : il.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Ortodontia e Ortopedia Facial, Porto Alegre, 2013.

Orientador: Luciane Macedo de Menezes

Coorientador: João Antonio Pêgas Henriques

1. Ortodontia. 2. Liberação iônica de metais. 3. Toxicidade dos metais 4. Citotoxicidade. 5. Viabilidade celular. 6. Genotoxicidade. 7. Testes de mutagenicidade. I. Menezes, Luciane Macedo de. II. Henriques, João Antonio Pêgas. III. Título.

CDU 616.314-089.23

Dedico este trabalho a minha
mãe, Jussara, e a meu **pai,**
Jaune (*in memoriam*), por
terem me dado a base para
ser quem sou.

Agradecimentos

- À minha mãe, **Jussara**, a melhor amiga de todas as horas, por tudo.
- Ao **Adriano**, por ter me compreendido e ajudado sempre.
- À **Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes**, exemplo de pesquisadora em Ortodontia, orientadora e amiga, pelo estímulo constante.
- Ao **Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques**, por ter aceitado ser meu coorientador e por ter me acolhido em seu grupo. Sou extremamente grata por ter tido a oportunidade de trabalharmos juntos e por todos os seus ensinamentos.
- Ao pesquisador **Cristiano Trindade**, por todo o auxílio na parte laboratorial deste trabalho e por ter sido incansável em repartir comigo seus conhecimentos.
- À equipe da Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation – **CSIRO** - Animal, Food and Health Sciences – Adelaide (Austrália), em especial aos meus orientadores **Philip Thomas** e **Michael Fenech**, por terem me recebido e proporcionado todas as condições para a execução de nossos experimentos.
- A **Profa. Dra. Renata Medina**, por ter aceitado trabalhar em colaboração conosco, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos compartilhados.
- Ao **Prof. Dr. Eduardo Martinelli de Lima**, pelos ensinamentos clínicos e científicos, pela amizade e pela confiança que sempre depositou em mim.
- Aos **professores e alunos do Curso de Especialização em Ortodontia da PUCRS**, pela troca, pelo estímulo, pelos ensinamentos e pelas oportunidades de crescimento pessoal e profissional.

- Aos **colegas** do Mestrado e Doutorado em Ortodontia, em especial aos responsáveis pelo atendimento dos participantes da amostra deste trabalho, pelo auxílio no controle dos pacientes.
- Aos **pacientes** da Faculdade de Odontologia da PUCRS, que se prontificaram a participar desta pesquisa.
- Aos meus **pacientes** que compreenderam minha ausência durante o período de estudos na Austrália.
- Aos **amigos** do Laboratório 210 da Biofísica da UFRGS e do Genotox Royal do Centro de Biotecnologia da UFRGS, por todo o auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa. Meu agradecimento especial à pesquisadora **Dra. Miriana da Silva Machado**, pelas valiosas contribuições.
- À colega **Graziela Westphalen**, por ter me oportunizado o contato com o Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques e com o Dr. Philip Thomas.
- À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Alexandre Bahlis**, pela excelente estrutura e organização.
- À **Profa. Dra. Ana Maria Spohr**, pela competência à frente da coordenação do Programa de Pós-Graduação em Odontologia de nossa faculdade.
- Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia da PUCRS, por estarem sempre prontos a ajudar. Em especial aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, **Ana, Paulo e Davenir**, pela disponibilidade.
- À **Clarissa Belarmino**, vinculada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, pelo imprescindível auxílio em relação ao processo de estágio no exterior.

- À **CAPES**, pelo suporte financeiro, através das bolsas de estudo, fundamentais para a realização deste trabalho.
- Ao **Prof. Dr. José Cícero Dinato**, por ter disponibilizado no laboratório de sua clínica o equipamento de soldagem a *laser*.
- Ao **Prof. Dr. Mário Wagner**, pelo auxílio nas análises estatísticas.
- À **Profa. Judith Scliar**, por sua competência e pela amizade que desenvolvemos durante as aulas preparatórias para o TOEFL.
- À **Profa. Maria do Horto Motta**, pela revisão de linguagem e padronização técnica do texto.
- A **todos** os que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.
- A **Deus**, por estar sempre comigo, iluminando meus caminhos.

RESUMO

GONÇALVES, T.S. **Avaliação *in vitro* e *in vivo* da citotoxicidade e da genotoxicidade da solda de prata e da soldagem a *laser* utilizadas em Ortodontia.** Orientadora: Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes. Coorientador: Prof. Dr. João Antônio Pêgas Henriques. Porto Alegre, PUCRS, Faculdade de Odontologia – Tese (Doutorado em Ortodontia e Ortopedia Facial), 2013.

Foram investigados os efeitos citotóxicos e genotóxicos da solda de prata e da soldagem a *laser* utilizadas em Ortodontia. Para tanto, avaliaram-se, nas linhagens celulares HepG2 e HOK, a citotoxicidade (redução MTT) e a genotoxicidade (cometa alcalino ou associado a enzimas de reparo e citoma de micronúcleos) de anéis contendo ou não uniões com solda de prata. Quantificaram-se, empregando espectrofotometria de absorção atômica, os íons metálicos liberados no meio de cultura. Também foram investigados os efeitos sobre o DNA em células da mucosa bucal de pacientes em tratamento com aparelhos auxiliares do tipo Hyrax contendo oito uniões soldadas com prata, empregando o ensaio cometa em células bucais e o citoma bucal de micronúcleos. Por fim, a citotoxicidade *in vitro* de anéis contendo ou não uniões soldadas a prata ou a *laser* foi investigada e comparada mediante o emprego de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Os dados obtidos permitiram concluir que anéis ortodônticos sofreram corrosão e liberaram íons metálicos em condições laboratoriais, sendo inclusive detectada a presença de cádmio nas amostras. Os anéis contendo solda de prata foram capazes de causar importantes e significativos efeitos citotóxicos e genotóxicos em células de mamíferos em condições *in vitro*. Os efeitos genotóxicos observados estão, em parte, relacionados a efeitos diretos, assim como a efeitos indiretos, tais como

danos oxidativos. Apesar do efeito tóxico observado *in vitro*, em humanos a resposta de toxicidade a aparelhos contendo uniões soldadas com liga de prata apresentou menor intensidade, sendo identificada genotoxicidade também *in vivo*. A soldagem a *laser* se mostrou menos citotóxica que a soldagem com liga de prata em condições *in vitro*, devendo ser melhor investigada por se tratar de uma alternativa promissora para a união de metais em Ortodontia.

Unitermos: Ortodontia, liberação iônica de metais, toxicidade dos metais, citotoxicidade, viabilidade celular, genotoxicidade, testes de mutagenicidade.

ABSTRACT

GONÇALVES, T.S. ***In vitro and in vivo evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of silver solder and laser soldering used in Orthodontics.*** Advisors: Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes and Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques. Porto Alegre, PUCRS, Faculdade de Odontologia – Thesis (PhD in Orthodontics and Dentofacial Orthopedics), 2013.

In the present study, the cytotoxic and genotoxic effects of the silver solder and laser soldering used in Orthodontics were evaluated. For this, HepG2 e HOK cell lines were employed to evaluate the cytotoxicity (MTT reduction) and the genotoxicity (comet assay and cytokinesis block micronucleus cytome assay) of orthodontic bands containing or not silver soldered joints. Ionic metal release in the culture medium was verified by means of atomic absorption espectrophotometry. DNA effects on buccal mucosal cells of patients treated with Hyrax type expander appliances containing eight silver soldered joints were also evaluated through the buccal comet assay and the buccal micronucleus cytome assay. The *in vitro* cytotoxicity of orthodontic bands containing or not silver soldered or laser soldered joints was investigated and compared using the *Saccharomyces cerevisiae* model. Data obtained indicated that orthodontic bands suffer corrosion and are able to release ions to culture medium, being cadmium also detected in the samples evaluated. Silver soldered bands cause significant cytotoxic and genotoxic effects in mammal cells under *in vitro* conditions. The genotoxic effects are in part related to direct toxic effects and in part related to oxidative DNA damage. In humans, less intense genotoxic effects were observed. Laser soldering was less cytotoxic

than silver soldering in *in vitro* conditions and should be more investigated since it seems to be a promising alternative to connect wires in Orthodontics.

Unitermos: Orthodontics, metal ion release, metal ion toxicity, cytotoxicity, cell viability, genotoxicity, mutagenicity testing.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 CAPÍTULO I.....	15
3 CAPÍTULO II.....	18
4 CAPÍTULO III.....	21
5 DISCUSSÃO.....	24
6 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS.....	35

1 INTRODUÇÃO

A Ortodontia vem evoluindo constantemente. Nas últimas décadas, os avanços dos estudos sobre os materiais odontológicos viabilizou a introdução de diversos novos elementos para uso na clínica ortodôntica. Apesar de todos os avanços observados, alguns materiais clássicos são utilizados desde o início da especialidade. Este é o caso das ligas de solda de prata, as quais podem ser empregadas tanto para a soldagem de acessórios aos aparelhos fixos quanto para a união de elementos metálicos em aparelhos auxiliares. Estas ligas apresentam vantagens importantes, como sua consagrada efetividade, facilidade de manipulação e custo, o que justifica, ainda nos dias atuais, seu emprego em larga escala.

Simultaneamente, o interesse pela biocompatibilidade dos materiais ortodônticos também cresceu, de maneira que este tema ocupa papel de destaque na literatura atual. Biocompatibilidade se refere à habilidade de um biomaterial de realizar sua função desejada sem causar efeitos locais ou sistêmicos indesejados no beneficiário da terapia com o mesmo, gerando a mais apropriada resposta celular ou tecidual em uma situação específica, otimizando a performance clinicamente relevante daquela terapia (1). A biocompatibilidade das ligas metálicas utilizadas em Ortodontia está principalmente relacionada ao fenômeno da corrosão (2, 3), devido às variações químicas, físicas e biológicas que acontecem na cavidade bucal (4, 5). Diversos aparelhos ortodônticos auxiliares contêm uniões de solda de prata, tais como mantenedores de espaço e expansores maxilares, e podem permanecer na cavidade bucal por meses ou anos, sujeitos à corrosão. Este fato é capaz de favorecer a liberação de íons metálicos para o ambiente bucal (3), podendo resultar

em reações de hipersensibilidade e alergias (2), tanto com repercussão local quanto sistêmica.

Raros estudos se dedicaram à investigação da biocompatibilidade do uso da solda de prata em aparelhos auxiliares (6-10). Anéis ortodônticos são geralmente de aço inoxidável, compostos por níquel, ferro e cromo, que podem estar relacionados a eventos de hipersensibilidade. Já a liga de solda de prata é composta principalmente pelos íons prata, cobre e zinco, os quais são facilmente liberados para o ambiente bucal em presença de corrosão (8) e que podem levar a eventos tóxicos (6, 8, 11-15). Além disso, o íon cádmio, que pode estar associado a câncer (16) e ser responsável por danos hepáticos, renais e cardíacos (17), costumava ser adicionado à composição da liga de solda de prata como um elemento redutor da temperatura de fusão (18).

Os estudos sobre a solda de prata deixam evidente a citotoxicidade desta liga em condições laboratoriais (6-10). Entretanto, possíveis efeitos genotóxicos ocasionados pelo material ainda não foram demonstrados na literatura até o presente momento. O dano ao DNA é geralmente utilizado para auxiliar na investigação de potenciais efeitos de diferentes agentes ambientais (19-24). Diversos tipos de testes podem ser empregados para a avaliação dos efeitos genéticos de determinado material. Entre eles, podem-se citar o ensaio cometa, que detecta a indução de danos ao DNA e seu eventual reparo (19-21), assim como o citoma associado ao teste de micronúcleos (23, 24), que permite a avaliação de danos como a perda e a quebra do material cromossômico. O ensaio cometa pode ainda ser associado ao tratamento enzimático para detecção de lesões específicas (25), como, por exemplo, o emprego de endonuclease III ou formamidopirimidina DNA-glicosilase para detectar lesões oxidativas (26). Estes dois testes trazem

resultados complementares e podem ser realizados em condições *in vitro* e *in vivo* (23-25, 27).

Por outro lado, com o aperfeiçoamento das técnicas de aplicação de *laser* na Odontologia, obteve-se uma nova alternativa para a união de metais, a qual pode, também, ser empregada para a confecção de aparelhos auxiliares, em substituição à solda de prata (7, 8). Na soldagem a *laser*, devido à alta energia gerada, ocorre uma fusão verdadeira dos metais unidos, eliminando a presença de um terceiro elemento metálico, como a solda de prata. Com isso, é possível que se obtenham soldagens menos suscetíveis a corrosão e, como consequência, mais biocompatíveis.

Tendo em vista o uso frequente de aparelhos ortodônticos auxiliares construídos com o uso da liga de solda de prata, é importante que se investiguem os efeitos destas uniões soldadas em relação a sua citotoxicidade e genotoxicidade. Sendo assim, os objetivos do presente estudo foram:

- avaliar *in vitro*, empregando células de mamíferos, a citotoxicidade e a genotoxicidade de anéis contendo ou não uniões com solda de prata e quantificar os íons metálicos liberados em meio de cultura;
- avaliar possíveis efeitos sobre o DNA em células da mucosa bucal de pacientes em tratamento com aparelhos auxiliares do tipo Hyrax, contendo oito uniões com solda de prata;
- comparar, *in vitro*, empregando leveduras, a citotoxicidade de anéis contendo ou não uniões soldadas com liga de solda de prata ou soldagem a *laser*.

2 CAPÍTULO I

Artigo 1

Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without Silver soldered joints

Submetido ao periódico Mutation Research – Qualis A2 – Fator de Impacto 3.035 (Anexo A).

Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without Silver soldered joints

Tatiana Siqueira Gonçalves^{a*}, Luciane Macedo de Menezes^a, Cristiano Trindade^b, Miriana da Silva Machado^b, Philip Thomas^c, Michael Fenech^c, João Antonio Pêgas Henriques^{b,d}

^a – Department of Orthodontics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Postal Address: Faculdade de Odontologia - Secretaria de Pós-Graduação - Prédio 6, Av. Ipiranga 6681, Sala 209, Porto Alegre – RS – Brazil, Zip Code: 90619-900

^b – Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica – ROYAL Unidade GENOTOX – ROYAL / Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

Postal Address: Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43421, CEP: 91501-970. Porto Alegre - RS, Brasil.

^c – Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Animal, Food and Health Sciences, Adelaide, SA, Australia

Postal Address: Gate 13 Kintore Avenue, Adelaide SA 5000

Postal: PO Box 10041, Adelaide BC, SA 5000

^d – Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul; Laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos, Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

Short title: Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands

***Corresponding author:**

Tatiana Siqueira Gonçalves

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia - Secretaria de Pós-Graduação - Prédio 6

Av. Ipiranga 6681, Sala 209, Porto Alegre – RS – Brazil, Zip Code: 90619-900

Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without Silver soldered joints

ABSTRACT

Silver solder is routinely used in Orthodontics. However, little is known about its biological toxic effects. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity, cytostasis, genotoxicity and DNA damage effects of silver soldered bands (SSB) and bands without any solder (WSB) on HepG2 and HOK cell lines, as well as quantify the amount of ions released by the bands. The 24 hour metallic elutes were quantified by atomic absorption spectrophotometry. MTT reduction test was performed to evaluate cytotoxicity; Alkaline and Modified Comet assays were employed to verify genotoxicity and oxidative DNA damage effects and the Cytokinesis Block Micronucleus Cytome (CBMN-Cyt) assay was used to verify DNA damage, cytostasis and cytotoxicity. Ag, Cd, Cr, Cu and Zn were detected in SSB medium samples and Fe and Ni in both SSB and WSB medium samples. SSB group induced high cytotoxic effects on both cell lines evaluated. WSB and SSB induced genotoxicity as evaluated by Comet Assay, with stronger effects within the SSB group. Both groups induced similar increases in oxidative DNA lesions, detected by FPG and Endo III enzymes. Nucleoplasmic bridges a biomarker of DNA misrepair and/or telomere end fusions were significantly elevated in the SSB group. SSB elutes showed higher amounts of Ni and Fe than WSB and all the quantified ions were detected in SSB, including Cd. SSB was more cytotoxic and genotoxic than the WSB samples. Other materials and techniques should be further investigated in order to replace silver solder joints in the manufacture of orthodontic appliances.

3 CAPÍTULO II

Artigo 2

***In vivo* evaluation of the genotoxic effects of auxiliary orthodontic appliances containing silver soldered joints**

Submetido ao periódico The Angle Orthodontist – Qualis A2 – Fator de Impacto 1.21 (Anexo B).

***In vivo* evaluation of the genotoxic effects of auxiliary orthodontic appliances containing silver soldered joints**

Tatiana Siqueira Gonçalves ^{a*}, Luciane Macedo de Menezes ^b, Cristiano Trindade ^c, Philip Thomas ^d, Michael Fenech ^d, João Antonio Pêgas Henriques ^{e,f}

^a – Visiting Professor, Department of Orthodontics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b – Professor, Department of Orthodontics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c – Researcher, Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica ROYAL Unidade GENOTOX – ROYAL / Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d – Researcher, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Animal, Food and Health Sciences, Adelaide, SA, Australia

^e – Scientific Director, Instituto de Educação para Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação Tecnológica - ROYAL Unidade GENOTOX – ROYAL / Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

^f – Professor, Instituto de Biotecnologia – Universidade de Caxias do Sul; Laboratório de Reparação de DNA em Eucariotos, Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

***Corresponding author:**

Tatiana Siqueira Gonçalves

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia - Secretaria de Pós-Graduação - Prédio 6

Av. Ipiranga 6681, Sala 209, Porto Alegre – RS – Brazil, Zip Code: 90619-900

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is based on a thesis submitted to the Dentistry Faculty, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil, in partial fulfillment of the requirements for an Orthodontics PhD degree. T.S.G. was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil, PDEE 2459/11-6.

***In vivo* evaluation of the genotoxic effects of auxiliary orthodontic appliances containing silver soldered joints**

ABSTRACT

Objective: Auxiliary appliances consisting of silver soldered joints may inhabit the patient's oral cavity for an extensive period of time. The aim of this study was to investigate, *in vivo*, the potential genotoxic effects of Hyrax type expanders containing silver soldered joints.

Materials and Methods: Buccal cells were collected from 20 patients and processed for the Buccal Comet Assay (BCA) and Buccal Micronucleus Cytome Assay (BCMA) to investigate DNA damage, cell proliferation and cell death parameters at different time points up to 12 months.

Results: The BCA showed an increase in DNA damage, as the Damage Frequency and Damage Index were significantly increased after the insertion of the appliance. In the BCMA there was an increase in the micronuclei and nuclear buds frequency in one month, but no statistical differences over the 12 month study period were observed.

Conclusion: The use of orthodontic appliances containing silver solder joints significantly increased DNA damage as measured by the BCA, but with no significant differences with time for the endpoints evaluated by the BCMA.

4 CAPÍTULO III

Artigo 3

Differences of cytotoxicity of silver and laser soldered orthodontic bands assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*

Submetido ao periódico Clinical Oral Investigations, Qualis A2, Fator de Impacto 2.364 (Anexo C).

Differences of cytotoxicity of silver and laser soldered orthodontic bands assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*

Tatiana Siqueira Gonçalves ^a, Luciane Macedo de Menezes ^b, Luciele Gonzaga Ribeiro ^c, Catieli Gobetti Lindholz ^d, Renata Medina-Silva ^e

a – Visiting Professor, Department of Orthodontics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil

b – Professor, Department of Orthodontics, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Brazil

c – Biologist, Biosciences Faculty - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

d – Biologist, Biosciences Faculty - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul

e - Biologist, MSc. in Genetics and Molecular Biology, PhD in Microbiology, Microbiology teacher and researcher – Biosciences Faculty - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul,

Short title: Cytotoxicity of orthodontic bands

Corresponding author:

Tatiana Siqueira Gonçalves

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia - Secretaria de Pós-Graduação - Prédio 6

Av. Ipiranga 6681, Sala 209

Porto Alegre – RS – Brazil

Differences of cytotoxicity of silver and laser soldered orthodontic bands assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity induced by soldered bands through survival tests on *Saccharomyces cerevisiae*, a microorganism which presents several characteristics similar to human cells.

Materials and Methods: Three groups of bands were evaluated: silver soldered (SSB), laser soldered (LSB) and bands without any solder (WSB). Yeast cells were directly exposed to the bands and indirectly, when a previous elution of the metals in artificial saliva was performed. The negative control was composed by yeast cells or artificial saliva not exposed to any kind of metal. **Results:** In the direct exposure experiments, all tested groups of bands induced a slight reduction in yeast viability compared to the control. This effect was more intense for the silver soldered bands, although not statistically significant. For the indirect exposure experiments, the silver soldered bands induced a statistically significant decrease in cell viability compared to the laser soldered bands. There were no significant differences between the survival rates of the negative control and the laser solder group in both direct and saliva tests. **Conclusion:** Silver soldered bands induced cytotoxic effects with lower cell viability when compared to laser soldered bands. **Clinical Relevance:** The use of the laser soldering may be suggested as an interesting and more biocompatible alternative for use in orthodontic appliances.

5 DISCUSSÃO

A biocompatibilidade é tema de interesse na Ortodontia e, recentemente, diversas pesquisas vêm sendo realizadas para investigar a liberação e a citotoxicidade de materiais ortodônticos como resinas acrílicas, compostas e metais (3, 6, 11, 28-31), em função dos possíveis efeitos biológicos dos materiais empregados na especialidade. Além dos materiais compostos por aço inoxidável, a liga de solda de prata está também presente em diversos aparelhos ortodônticos, em especial nos aparelhos auxiliares. Existe uma carência de informações em relação à biocompatibilidade da solda de prata, e o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade e a genotoxicidade de anéis contendo ou não uniões com solda de prata ou com soldagem a *laser*.

Inicialmente, foi realizada uma etapa *in vitro*, avaliando a liberação iônica de anéis contendo ou não soldagens com liga de prata e sua consequente citotoxicidade e genotoxicidade sobre linhagens celulares (Artigo 1). O emprego de células de mamíferos para a avaliação da biocompatibilidade de materiais é um método consagrado(32). Foi verificado um importante e significativo efeito tóxico dos anéis contendo solda de prata, os quais estiveram também associados a uma liberação iônica elevada. Quanto à liberação de íons metálicos para o meio de cultura, não só os que estão presentes na composição da liga (prata, zinco e cobre)(33), mas também aqueles que são componentes do aço inoxidável (níquel e cromo) (34) foram detectados em níveis significativos. Isto indica que, de fato, o

aquecimento gerado durante o processo de soldagem desestabiliza a estrutura metálica levando a um processo de corrosão mais acentuado(35). Com os dados de quantificação dos eluídos metálicos, foi possível traçar um paralelo em relação à toxicidade celular e genética observada (Artigo 1). Foi detectada a presença de cádmio no meio de cultura, o que também pode ter contribuído de maneira significativa para a toxicidade observada em condições laboratoriais(16, 36-38). Diferentes mecanismos parecem explicar os efeitos genotóxicos e mutagênicos dos metais, entre eles a geração de espécies reativas de oxigênio, inibição de enzimas de reparo do DNA, desregulação da proliferação celular(16, 36-38), problemas na replicação e transcrição do DNA, processos inflamatórios e alterações nos genes responsáveis pelo equilíbrio entre sobrevivência e morte celular(39).

Estudos *in vitro* apresentam vantagens importantes, principalmente em relação à padronização dos ensaios e à quantidade de dados que podem ser obtidos, e devem fazer parte da avaliação de toxicidade de determinado material (40). Entretanto, carecem de respostas que contemplem um contexto mais amplo como a cavidade bucal, a qual apresenta um ambiente característico com condições químicas, físicas e biológicas que favorecem o processo de corrosão(4). Nisso, os estudos *in vivo* demonstram o que de fato ocorre quando os materiais estão em contato com a saliva (4, 41). Por outro lado, uma das dificuldades quando se trabalha com pacientes está relacionada a dificuldades de padronização da amostra e limitações de tempo e custo, resultando, muitas vezes, em número amostral reduzido(4).

Pacientes em uso de aparelho expensor tipo Hyrax foram avaliados longitudinalmente (Artigo 2). Dessa maneira, foi possível averiguar se a mesma intensidade de danos verificados no estudo *in vitro* ocorre em humanos. Entretanto,

quando um material está na cavidade bucal, os subprodutos de corrosão sofrem uma lavagem constante pela saliva o que pode reduzir seus efeitos locais(4). Apesar de observada importante genotoxicidade *in vitro*, tal intensidade de efeito não se confirmou quando os pacientes foram acompanhados longitudinalmente. Constatou-se certo efeito genotóxico, identificado pelo ensaio cometa, e pequeno incremento nos parâmetros de dano ao DNA no citoma bucal, porém sem diferenças estatísticas ao longo do tempo de observação.

A mucosa bucal é um local de fácil acesso e permite a obtenção de material para análise de maneira minimamente invasiva (24). Tanto o ensaio cometa(19, 20, 25) quanto o citoma de micronúcleos(23) são métodos consagrados para a investigação de dano ao DNA em estudos *in vitro* e apresentam adaptações para a execução dos testes em células bucais(24, 27). Tais ensaios vêm sendo, pouco a pouco, empregados para a avaliação de materiais ortodônticos. Ao início do desenvolvimento da presente pesquisa, idealizou-se a aplicação do teste cometa em células bucais tanto em sua versão alcalina quanto associado ao uso de enzimas de reparo para a investigação de danos oxidativos(26), assim como realizado no estudo *in vitro*. Entretanto, uma das dificuldades ao se trabalhar com células bucais no teste cometa é a obtenção de número adequado de nucleoides para a contagem. Apesar de a quantidade de células obtidas por coleta ser significativa, após o processamento celular obteve-se material suficiente somente para a realização do cometa alcalino. Assim, sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos procurando investigar, também, danos oxidativos decorrente dos metais em células da mucosa bucal, o que possivelmente irá requerer novas adaptações do ensaio. O citoma bucal é um método bastante robusto para a investigação de dano ao DNA que vem sendo empregado para avaliação de efeitos decorrentes do estilo de vida,

do contato com agentes genotóxicos e de condições nutricionais (24). O presente estudo é um dos primeiros a empregar o citoma bucal para a avaliação de materiais ortodônticos, tendo ainda a vantagem de tê-lo associado ao ensaio cometa.

Uma vez que a citotoxicidade *in vitro* da solda de prata foi demonstrada(6-10), pensou-se em investigar métodos ou materiais alternativos ao procedimento de soldagem com a liga de prata. Nas últimas décadas, o processo de soldagem a *laser* vem sendo adotado em Odontologia, principalmente para a união de peças de titânio em próteses sobre implantes. Entretanto, o método em Ortodontia ainda é bastante restrito, devido, principalmente, à necessidade de equipamento específico, o que eleva os custos para a confecção de aparelhos com uniões a *laser*. Um dos objetivos, ao início do desenvolvimento da presente pesquisa, era comparar não só a citotoxicidade mas também os efeitos genotóxicos do processo de soldagem a *laser*. Anéis soldados a *laser* não puderam ser incluídos no primeiro estudo *in vitro* (Artigo 1), devido a problemas de manutenção no equipamento de soldagem, o qual permaneceu indisponível durante um longo período. Além disso, o alto número de anéis soldados necessários à realização dos ensaios inviabilizou a confecção de anéis em laboratórios terceirizados devido aos elevados custos. Para contornar esta intercorrência, o ensaio de citotoxicidade em leveduras (Artigo 3) se mostrou bastante adequado, uma vez que possibilitou a realização do teste mesmo com um número restrito de anéis contendo soldagem a *laser*. Este método já foi empregado anteriormente com diversos materiais ortodônticos, no qual foi também demonstrada a citotoxicidade da solda de prata (10). Foi possível verificar que para este modelo experimental a soldagem a *laser* apresenta melhor comportamento biológico quando comparada aos anéis com solda de prata, indicando que ela deve ser melhor investigada, pois se trata de uma alternativa promissora em termos de método de

união e também de biocompatibilidade. Além disso, esforços devem ser empreendidos no sentido de simplificar os equipamentos de soldagem a *laser*, para permitir no futuro uma redução no custo de tal procedimento.

Como perspectivas para futuros estudos, sugere-se a realização de ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade da soldagem a *laser* em células de mamíferos. Além disso, deve-se tentar adaptar o ensaio cometa em células bucais para que possa também ser realizado com o emprego de enzimas de reparo para a investigação de danos oxidativos. Por fim, quanto aos efeitos da solda de prata em humanos, sugere-se que novos estudos longitudinais, se possível com amostras maiores, sejam desenvolvidos avaliando os pacientes também após a finalização de seus tratamentos, no sentido de verificar se após a remoção do estímulo ocorre reparo dos danos que foram identificados no presente estudo.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, foi possível estabelecer as conclusões a seguir.

- Anéis ortodônticos sofreram corrosão e liberaram íons metálicos em condições laboratoriais, sendo que os íons cromo, níquel, ferro, cobre, zinco, prata e cádmio foram detectados em meio de cultura quando em contato com anéis contendo solda de prata, apesar de o íon cádmio não estar especificado como componente das ligas metálicas estudadas.
- Anéis contendo solda de prata foram capazes de causar efeitos citotóxicos e genotóxicos em células de mamíferos em condições *in vitro*. Os efeitos genotóxicos observados estão relacionados tanto a efeitos diretos quanto a efeitos indiretos, tais como danos oxidativos.
- Apesar do efeito tóxico observado *in vitro*, em humanos a resposta de toxicidade a aparelhos contendo uniões soldadas com liga de prata apresentou menor intensidade, embora tenha sido identificada genotoxicidade também *in vivo*.
- A soldagem a *laser* se mostrou menos citotóxica que a com liga de prata em condições *in vitro*, devendo ser melhor investigada por se tratar de uma alternativa promissora para a união de metais em Ortodontia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008 Jul;29(20):2941-53.
2. Menezes LM, Campos LC, Quintao CC, Bolognese AM. Hypersensitivity to metals in orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2004 Jul;126(1):58-64.
3. Menezes LM, Quintão CCA. The Release of Ions from Metallic Orthodontic Appliances. *Semin Orthod*. 2010;16(4):282-92.
4. 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 Sep;140(3):298-308.
5. Eliades T, Bourauel C. Intraoral aging of orthodontic materials: the picture we miss and its clinical relevance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005 Apr;127(4):403-12.
6. Freitas MP, Oshima HM, Menezes LM, Machado DC, Viezzer C. Cytotoxicity of silver solder employed in orthodontics. *Angle Orthod*. 2009 Sep;79(5):939-44.
7. 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 Dec;28(6):567-72.
8. 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 Feb;25(4):735-40.

9. 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 Feb;29(1):60-6.
10. Limberger KM, Westphalen GH, Menezes LM, Medina-Silva R. Cytotoxicity of orthodontic materials assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*. *Dent Mater*. 2011 May;27(5):e81-6.
11. Mockers O, Deroze D, Camps J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. *Dent Mater*. 2002 Jun;18(4):311-7.
12. Schmalz G, Garhammer P. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Dent Mater*. 2002 Jul;18(5):396-406.
13. Syverud M, Dahl JE, Hero H, Morisbak E. Corrosion and biocompatibility testing of palladium alloy castings. *Dent Mater*. 2001 Jan;17(1):7-13.
14. 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 Apr;28(4):427-33.
15. Wataha JC, Malcolm CT, Hanks CT. Correlation between cytotoxicity and the elements released by dental casting alloys. *Int J Prosthodont*. 1995 Jan-Feb;8(1):9-14.
16. Huff J, Lunn RM, Waalkes MP, Tomatis L, Infante PF. Cadmium-induced cancers in animals and in humans. *Int J Occup Environ Health*. 2007 Apr-Jun;13(2):202-12.
17. Novelli ELB, Hernandez RT, Novelli Filho JLBV, Barbosa LL. Differential/combined effect of water contamination with cadmium and nickel on tissue of rats. *Environmental Pollution*. 1998;103(2-3):295-300.

18. Berge M, Gjerdet NR, Erichsen ES. Corrosion of silver soldered orthodontic wires. *Acta Odontol Scand.* 1982;40(2):75-9.
19. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004 Mar;26(3):249-61.
20. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res.* 1997 Apr 29;375(2):183-93.
21. Hartmann A, Speit G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett.* 1997 Feb 7;90(2-3):183-8.
22. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000 Nov 20;455(1-2):81-95.
23. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1084-104.
24. 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.
25. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* 2008 May;23(3):143-51.
26. Miorelli ST, Rosa RM, Moura DJ, Rocha JC, Lobo LA, Henriques JA, et al. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis.* 2008 Mar;23(2):93-9.
27. 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 Oct 15;578(1-2):371-81.
28. Kao CT, Ding SJ, Min Y, Hsu TC, Chou MY, Huang TH. The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. *Eur J Orthod.* 2007 Apr;29(2):198-203.

29. Gonçalves TS, de Menezes LM, Silva LE. Residual monomer of autopolymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. An in situ evaluation. *Angle Orthod.* 2008 Jul;78(4):722-7.
30. Gonçalves TS, Schmitt VM, Thomas M, Lopes de Souza MA, Menezes LM. Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthod.* 2008 Sep;78(5):926-30.
31. 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 Jan;125(1):24-9.
32. Schmalz G, Browne RM. The biological evaluation of medical devices used in dentistry. The influence of the European Union on the preclinical screening of dental materials. *Int Dent J.* 1995 Aug;45(4):275-8.
33. 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 Aug;140(2):177-81.
34. Menezes LM, Freitas MPM, Gonçalves TS. Biocompatibility of orthodontic materials: myth or reality? *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial.* 2009;14:144-57.
35. Wataha JC, Lockwood PE, Schedle A. Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures. *J Biomed Mater Res.* 2000 Nov;52(2):360-4.
36. Xie J, Shaikh ZA. Cadmium induces cell cycle arrest in rat kidney epithelial cells in G2/M phase. *Toxicology.* 2006 Jul 5;224(1-2):56-65.
37. Jin YH, Clark AB, Slebos RJ, Al-Refai H, Taylor JA, Kunkel TA, et al. Cadmium is a mutagen that acts by inhibiting mismatch repair.

38. Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol.* 2008 Aug;82(8):493-512.
39. Nickens KP, Patierno SR, Ceryak S. Chromium genotoxicity: A double-edged sword. *Chem Biol Interact.* 2010 Nov 5;188(2):276-88.
40. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials--advantages and limitations. *J Dent.* 1994;22 Suppl 2:S6-11.
41. 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 Sep;140(3):383-8.

—————ANEXOS—————

ANEXO A
SUBMISSÃO DO ARTIGO 1

A manuscript number has been assigned: MUTGEN-D-13-00133

Ms. Ref. No.: MUTGEN-D-13-00133 Title: Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without Silver soldered joints Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Dear Dr. Gonçalves,

Your submission entitled "Cytotoxicity and genotoxicity of orthodontic bands with or without Silver soldered joints" has been assigned the following manuscript number: MUTGEN-D-13-00133.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

ANEXO B
SUBMISSÃO DO ARTIGO 2

041813-299 Receipt of New Paper by The Angle Orthodontist

rjisaacson@aol.com <rjisaacson@aol.com>

Para: tatianasiqueiragoncalves@gmail.com

Dear Dr. Goncalves,

On April 20, 2013, we received your manuscript submitted to us for publication in The Angle Orthodontist. As is our usual practice, I will send your manuscript out to two reviewers. It generally takes a minimum of eight weeks for the review process to be completed.

Please note that I have assigned a number to your manuscript #041813-299.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

Thank you for the opportunity to review your work and thank you for considering The Angle Orthodontist for your publication needs.

Sincerely,

Robert J. Isaacson, DDS, MSD, PhD
Editor-in-Chief Emeritus, The Angle Orthodontist
Professor Emeritus
University of Minnesota
Virginia Commonwealth University

ANEXO C
SUBMISSÃO DO ARTIGO 3

CLOI: Submission Confirmation for Differences of cytotoxicity of silver and laser soldered orthodontic bands assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*

Dear Dr. Gonçalves,

Your submission entitled "Differences of cytotoxicity of silver and laser soldered orthodontic bands assessed by survival tests in *Saccharomyces cerevisiae*" has been received by Clinical Oral Investigations

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned. Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office

Clinical Oral Investigations

ANEXO D

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da solda de prata e da soldagem a *laser* utilizadas em ortodontia

I. Objetivos e justificativa da pesquisa: Esta pesquisa pretende avaliar os efeitos dos aparelhos ortodônticos que apresentam solda de prata no organismo humano, 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 de seu/sua filho (a).

III. Os desconfortos ou riscos esperados: O único desconforto esperado é uma mínima pressão da escova na bochecha de seu/sua filho(a) durante a coleta das células. As escovas utilizadas serão de uso exclusivo de seu/sua filho (a) 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 desejar que seu/sua filho(a) abandone a pesquisa, não haverá qualquer prejuízo e não ocorrerão modificações no tratamento proposto. Ressaltamos que a concordância em participar do estudo não implica em qualquer modificação no tratamento que já está sendo feito. Da mesma forma, a não concordância em participar do estudo não irá alterar de nenhuma maneira o tratamento já estabelecido.

VI. Garantia de privacidade: os dados de seu/sua filho(a) serão mantidos em sigilo.

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

Eu, _____, responsável por _____, 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(a) de que todos os dados referentes aos exames realizados serão confidenciais, bem como o tratamento não será modificado em razão do estudo, e terei liberdade de não mais consentir em participar da pesquisa, face a essas informações.

Fui informado(a) de 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 o estudo, posso entrar em contato com as pesquisadoras responsáveis, Dra. Luciane Macedo de Menezes e Dra. Tatiana Siqueira Gonçalves, pelos telefones 33203538, 3320 4009 e 33203345 (Comitê de Ética em Pesquisa), para qualquer pergunta sobre os direitos como participante deste estudo.

Declaro que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Assinatura do Responsável

Nome do Responsável

Nome do Participante da Pesquisa

___/___/___

Assinatura do Pesquisador Associado

Nome do Pesquisador Associado

___/___/___

Este formulário foi lido para _____ (nome do responsável) em ___/___/___ (data) pelo _____ (nome do pesquisador associado) enquanto eu estava presente.

Assinatura da Testemunha

Nome da Testemunha

___/___/___

ANEXO E

ATA DE APROVAÇÃO NO EXAME DE QUALIFICAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ORTODONTIA
NÍVEL: DOUTORADO
EXAME DE QUALIFICAÇÃO – ATA 02/10

Data: 05 /janeiro/2010 – 10h30min

Candidata: TATIANA SIQUEIRA GONÇALVES

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes

Título da pesquisa: "Avaliação da citotoxicidade e da genotoxicidade da solda de prata e da solda laser utilizadas em ortodontia"

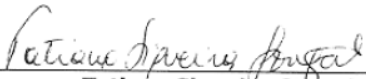
Comissão Examinadora: Profa. Dra. Ana Maria Spohr
Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

Parecer:

Aprovado

Aprovado com projeto pendente

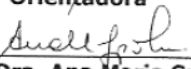
Reprovado

Ass.: 
Tatiana Siqueira Gonçalves

Aluna

Ass.: 

Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes
Orientadora

Ass.: 

Profa. Dra. Ana Maria Spohr
Professora Avaliadora

Ass.: 

Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber
Professor Avaliador

Ass.: 

Prof. Dr. José Antonio Poli de Figueiredo
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

ANEXO F

CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE
ÉTICA EM PESQUISAS DA PUCRS

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-663/10

Porto Alegre, 09 de julho de 2010.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/05024 intitulado **"Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade da solda de prata e da soldagem a laser utilizadas em Ortodontia"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e finais deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Virginia Minghelli Schmitt
Coordenadora Substituta do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Prof. Luciane Macedo de Menezes
FO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 91501-000
Sala 314 - Fone/Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO G

CARTA DE CONCESSÃO DA BOLSA DE DOUTORADO SANDUÍCHE

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
SEN, Quadra 02, lote 06, Bloco L
70.040-020 - Brasília, DF
Brasil



Prof. JORGE LUIS NICOLAS AUDY
PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
AV. IPIRANGA, 6681 - REITORIA - 3º ANDAR
PARTENON
PORTO ALEGRE - RS
90001970

Brasília, 20 de Julho de 2011
Processo: BEX 2459/11-6

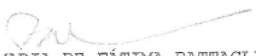
Prezado(a) Senhor(a),

Informamos que a Capes atendeu sua solicitação de concessão de bolsas de estudos, no âmbito do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior, a (o) pós-graduando (a) **TATIANA SIQUEIRA GONÇALVES**.

Encaminhamos, em anexo, os documentos abaixo relacionados:

- carta de concessão individual;
- duas vias do Termo de Compromisso, devendo uma delas ser assinada e devolvida à Capes;
- Orientações ao bolsista, disponível no link <http://www.capes.gov.br/bolsas/bolsas-no-externo/bolsistas-ativos/estagio-de-doutorando>, que deverão ser lidas atentamente.

Atenciosamente


MARIA DE FÁTIMA BATTAGLIN
Coordenação Geral de Bolsas no Exterior

ANEXO H

**CARTA COM PARECER SOBRE A PESQUISA REALIZADA NA
COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL ORGANISATION**

Human Nutrition
Gate 13, Kintore Avenue, Adelaide SA
PO Box 10041, Adelaide BC SA 5000, Australia



Telephone: +61 8 8303 8800 • Facsimile: +61 8 8303 8899 • ABN 41 687 119 230

1st. March 2012

To whom it may concern,

As a result of obtaining a Brazilian scholarship to study overseas, Tatiana Goncalves spent four months full time at the CSIRO, Nutrigenomics and Genome health laboratory in Adelaide, under the supervision of Professor Michael Fenech and Dr Phil Thomas.

Tatiana was part of a collaborative study investigating changes in *buccal micronucleus cytome biomarkers in relation to orthodontic appliances and to alcoholic and non alcoholic mouthwash exposure*. Tatiana has now been trained in all aspects of the buccal micronucleus cytome assay which is a minimally invasive assay used to determine rates of DNA damage, cell proliferation and cell death parameters in epithelial tissues.

Tatiana has worked very efficiently and conscientiously and met all of the objectives and goals of the study within the specified time frame. Whilst here Tatiana presented her results in two seminars and is currently preparing the study into a manuscript to submit for publication.

It has been a pleasure to supervise Tatiana and we wish her all the best for the completion of her PhD and all her future research endeavours.

Yours Sincerely,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Philip Thomas'.

Dr Philip Thomas PhD
Research Scientist and Research Team Leader
Nutritional Genomics Laboratory
CSIRO Food & Nutritional Sciences
Gate 13 Kintore Avenue, Adelaide South Australia, 5000
(Postal: PO Box 10041, Adelaide BC, South Australia, 5000)
Ph: +61 8 8303 8897 Fax: +61 8 8303 8899
Email: philip.thomas@csiro.au