

*PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM MATERIAIS DENTÁRIOS*

MARIA PERPÉTUA MOTA FREITAS

*TOXICIDADE DA SOLDA DE PRATA UTILIZADA EM ORTODONTIA:
ESTUDO “IN VITRO” E “IN SITU”*

Porto Alegre

2008

MARIA PERPÉTUA MOTA FREITAS

***TOXICIDADE DA SOLDA DE PRATA UTILIZADA EM ORTODONTIA:
ESTUDO “IN VITRO” E “IN SITU”***

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do grau de Doutor na área de Materiais Dentários pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Hugo Mitsuo Silva Oshima

Co-Orientadora: Luciane Macedo de Menezes

Porto Alegre

2008

MARIA PERPÉTUA MOTA FREITAS

***TOXICIDADE DA SOLDA DE PRATA UTILIZADA EM ORTODONTIA:
ESTUDO “IN VITRO” E “IN SITU”***

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do grau de Doutor na área de Materiais Dentários pelo Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima

Prof. Dra. Ana Maria Spohr

Prof. Dr. Eduardo Martinelli S. de Lima

Prof. Dr. José Renato Prietsch

Prof. Dra. Cátia Cardoso Abdo Quintão

Dedico este trabalho:

A Deus:

Pela inspiração divina inesgotável !!!

Aos meus queridos pais, Nilson e Neuza:

Fontes da minha vida, legado para vida inteira...

Vocês são meu exemplo de vida!!!

Às minhas manas, Simone e Marcela, e cunhados:

Como sempre, presentes pelo amor, carinho e apoio, ainda que a quilômetros de distância...

Ao meu noivo, Mauro:

Amor da minha vida, a sua presença ao meu lado representa, simplesmente, um conjunto de tudo que preciso para ser feliz como mulher: amor, carinho, paixão, atenção, dedicação...

Se receber Amor representa uma fonte de inspiração, eis aqui um fruto dele...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS...

Ao Professor Hugo Oshima... De coração, te sou grata pela disponibilidade, dedicação e atenção prestadas em momentos cruciais desse trabalho. Tenho certeza de que somei à minha lista de amigos mais um nome de peso.

À Profa. Luciane Menezes... Ter-te como co-orientadora foi um privilégio, levando em consideração o teu conhecimento e dedicação à Ortodontia e à pesquisa... Tudo isso significou nada mais que um motivo para o aprofundamento da nossa amizade, carinho e respeito, certamente mútuo, e cada vez mais intenso... Muito obrigada, Lu!!!

À Profa. Denise Cantarelli e Christian Viezzer... No início, a cultura de células me parecia um “bicho de sete cabeças”, um desafio dificilmente alcançável... Hoje, a minha visão é de uma área fascinante, promissora e de sucesso... Isso tudo graças ao entusiasmo e oportunidade de aprendizado, por vocês disponibilizados... Saliento aqui o quanto vocês foram imprescindíveis para a realização desse trabalho!!! De coração, obrigada!!!

À Profa. Susana Rizzatto... Desde muito já te considero exemplo profissional e pessoal, hoje tenho mais certeza ainda do quanto foi, és e será especial para mim... Quando precisei de algo, alguém, em qualquer lugar ou hora, contigo pude contar... Isso está gravado na minha memória para sempre!!! És, nela, imortal e por merecimento!!! Valeu Sú!!!

Ao Prof. Eduardo Martinelli... Nossa amizade começou há muito e vem crescendo sedimentada no respeito, admiração, carinho e, especialmente, no profissionalismo. Muito obrigada pela confiança depositada, tenhas certeza de que tudo tenho feito para estar à altura dela!!!

Aos colegas de turma, em especial, Ana Paula, Helen e Clarissa... A rotina científica nos aproximou por acaso tornando-nos verdadeiras irmãs... União essa sedimentada não somente nos trabalhos de rotina do curso, como também na troca de confidências e, certamente, nos descontraídos momentos “happy hour”... Estejam certos de que sentirei muita saudade!!!

Aos “de Azevedo”, minha família gaúcha... Entrei nesse meio por acaso do destino e tenho sido muito bem acolhida... Tenham certeza de que o amor, carinho, proteção e presença de vocês têm me feito muito mais feliz e completa nessa nova morada: Porto Alegre!!! Vocês, há muito, ocupam lugar especial no meu coração...

AGRADECIMENTOS...

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, na pessoa do Diretor Marcos Túlio Mazzini Carvalho, por nos proporcionar a oportunidade de aprendizado, disponibilizando excelente estrutura física e qualidade de ensino.

À Profa. Nilza Pereira da Costa pelo profissionalismo, determinação e esforço à frente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia... És um exemplo a ser seguido de dedicação e amor ao trabalho...

Ao Prof. José Antonio Poli de Figueredo... Pela chegada marcante ao assumir o nosso programa... Tenho certeza que a sua história justifica a obtenção da posição profissional alcançada... Boa sorte!!!

À FAPESB, pelo apoio financeiro imprescindível para a concretização de mais esse sonho...

Aos demais professores das áreas de domínio conexo do curso de Doutorado em Materiais Dentários, pelo esforço em nos mostrar coisas novas e/ou diferentes sem nos deixar sair da linha materióloga...

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação... Muito obrigada por toda atenção ao nortear-me em tudo que fosse necessário... O clima de paz e harmonia reinante neste ambiente de trabalho é contaminante, passando alegria, entusiasmo, positividade, carisma... enfim, tudo que há de bom!!! Obrigada por todo carinho...

Aos demais funcionários da PUCRS, que de forma atenciosa participaram da nossa rotina de formação, em especial, à Zoilita, Clésia, Carlinha e Rejane... Vocês são uns anjinhos que Deus colocou na minha vida, com o objetivo de ajudar da maneira mais carinhosa possível... De todo coração, agradeço!!!

“Tenho em mim todos os sonhos do mundo...”

(Fernando Pessoa)

RESUMO

FREITAS, M. P. M. Toxicidade da solda de prata utilizada em Ortodontia: Estudo “in vitro” e “in situ”. Orientador: Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima. Co-Orientadora: Profa. Dra. Luciane Macedo de Menezes. Porto Alegre, PUC-RS, Faculdade de Odontologia – Tese (Doutorado em Materiais Dentários), 2008.

Propôs-se neste trabalho avaliar a toxicidade da solda de prata utilizada em Ortodontia por meio do teste de citotoxicidade “in vitro”, bem como pela determinação “in situ” da concentração dos íons componentes da solda de prata, liberados na saliva humana. O ensaio de citotoxicidade foi por meio de cultura de fibroblastos, linhagem NIH/3T3, sendo montados 4 grupos (n=10, cada): controle, controle negativo (fio de aço inoxidável), controle positivo (discos de amálgama) e (solda de prata). Após o cultivo das células em meio D-MEM completo e obtida confluência de 80%, a suspensão foi adicionada sobre as placas de 24 poços, contendo os corpos de prova, sendo incubados em estufa a 37°C, por 24 horas. Após esse período, as placas foram avaliadas em microscópio óptico invertido, fotomicrografadas e os resultados registrados em índices de resposta, a partir de modificações nos parâmetros de Stanford (1980), baseados no tamanho do halo de difusão da substância tóxica e quantidade de lise das células. Os resultados mostraram índice de resposta máximo para o grupo da solda de prata, bem como severa inibição da proliferação e crescimento celular, células mais circulares e, em grande parte, com aspecto escurecido e granular, sugerindo lise com morte celular, resultados comparáveis ao controle positivo. No estudo “in situ”, a amostra foi composta por 60 indivíduos entre 8 e 14 anos, divididos em 2 grupos (n=30, cada): controle e teste (necessidade de uso do aparelho de Hyrax). Para análise da liberação dos íons metálicos, foram coletadas amostras da saliva de cada paciente, em 6 tempos, para ambos os grupos: inicial, 10 minutos, 24 horas, 7, 30 e 60 dias pós-instalação do aparelho. A avaliação da saliva foi realizada por meio de Espectrofotometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite, determinando-se a concentração dos íons cádmio, cobre, zinco e prata. Para análise estatística, foram utilizados os testes não-paramétricos de Friedman e Mann-Whitney, com $p < 0,05$. As concentrações iônicas, no grupo controle, mostraram valores baixos para o cádmio, cobre, zinco ($p > 0,05$) e, principalmente para a prata, onde não atingiram limite de detecção. No grupo teste, todos os íons mostraram concentrações expressivas aos 10 minutos pós- instalação do aparelho ($p < 0,01$), maiores médias para o

cobre, com tendência à redução após 24 horas. A comparação entre os grupos mostrou diferenças significativas para o cobre (todos os tempos), zinco (10 minutos, 24 horas, 7 e 30 dias) e, para o cádmio, apenas aos 10 minutos. Concluiu-se que a solda de prata representa um material de alta toxicidade para as células estudadas; as diferenças nas concentrações iônicas intragrupos e intergrupos mostraram, nitidamente, a influência das características fisiológicas e metabólicas individuais da cavidade oral humana sobre as ligas utilizadas nos aparelhos ortodônticos e processo corrosivo desencadeado, assim como foi perceptível a grande liberação dos íons, com concentrações elevadas imediatamente após a instalação do aparelho, representando risco de absorção e retenção desses íons pelo organismo humano, apesar da regressão nas concentrações, ainda no período estudado.

Palavras-chave: Citotoxicidade. Liberação iônica. Solda de prata. Ortodontia.

ABSTRACT

FREITAS, M. P. M. Toxicity of silver solder used in Orthodontics: “in vitro” and “in situ” study. Advisor: PhD Hugo Mitsuo Silva Oshima. Co-Advisor: PhD Luciane Macedo de Menezes. Porto Alegre, PUC-RS, School of Dentistry – Thesis (PhD in Dental Materials), 2008.

This study aimed to evaluate the toxicity of silver solder used in Orthodontics through an “in vitro” cytotoxicity test as well as to determine the “in situ” concentration of component ions of the silver solder released in human saliva. The cytotoxicity assay was performed by fibroblast culture, line NIH/3T3, being divided in 4 groups (n=10, each): control, negative control (stainless steel wire), positive control (amalgam discs) and silver solder. After the cell culture in complete D-MEM and obtained a confluence of 80% the suspension was added on the plaques of 24 wells with the samples and incubated at 37° C for 24 hours. The plaques were then evaluated in an inverted optical microscope and micrographs were taken. Results were recorded in answer indexes according to modifications in the Stanford parameters (1980), based on the size of the diffusion halo of the toxic substance and amount of cell lysis. The results showed a maximum rate response to the silver solder group, as well as severe inhibition of the proliferation and cell growth, more circular cells and, most of them having with a darkened and granular aspect, suggesting lysis with cell death, results comparable to the positive control. In the “in situ” study the sample consisted of 60 subjects, aged from 8 to 14 years, divided in 2 groups (n=30, each): control and test (patients requiring the use of Hyrax appliances). To analyze the release of metallic ions, saliva samples were collected from each patient at 6 different moments for both groups: initial, 10 minutes, 24 hours, 7, 30 and 60 days after the insertion of the Hyrax appliance. Saliva was examined through Atomic Absorption Spectrophotometry with Graphite Furnace as to the presence of ions cadmium, copper, zinc and silver. The non-parametric Friedman and Mann-Whitney tests were used for the statistical analysis (p<0.05). In the control group the ionic concentrations showed low values for cadmium, copper and zinc (p>0.05), while the silver ion wasn't detected. As for the test group, all subjects showed significant concentrations at 10 minutes post- insertion of the appliance (p<0.01), higher averages for copper were detected, tending to reduce after 24 hours. The comparison between the groups showed significant differences for copper (all moments), zinc (10 minutes, 24 hours, 7days and 30 days) and for cadmium, only for 10

minutes. It was concluded that the silver solder was a material of high cytotoxicity to the studied cells. The differences in ionic concentrations in the groups and between them showed clearly the influence of individual physiological and metabolic characteristics of the human oral cavity on the alloys used in orthodontic appliances and corrosive process; as well as there was great release of ions with high concentrations immediately after the appliance insertion, representing risk of absorption and retention of these ions by the human body despite the decline in concentrations during the period studied.

Key words: Cytotoxicity. Ion release. Silver solder. Orthodontics.

SUMÁRIO

<i>1. INTRODUÇÃO</i>	<i>17</i>
<i>2. OBJETIVOS</i>	<i>19</i>
<i>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</i>	<i>20</i>
<i>4. ARTIGO 1</i>	<i>31</i>
<i>5. ARTIGO 2</i>	<i>45</i>
<i>6. CONCLUSÕES</i>	<i>61</i>
<i>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	<i>62</i>
<i>8. REFERÊNCIAS</i>	<i>63</i>
<i>9. ANEXOS</i>	<i>68</i>
<i>10. APÊNDICES</i>	<i>71</i>

INTRODUÇÃO

É vasta a diversidade de materiais e acessórios utilizados na Odontologia, bem como expressivo o número de estudos científicos envolvendo os mesmos. Apesar de todo avanço técnico-científico dispensado, ainda existem materiais de uso rotineiro cuja biocompatibilidade é questionável, podendo causar efeitos adversos em situações clínicas. Dentre estes, os mais comumente associados são à base de resinas e metais, bastante utilizados na Dentística, Prótese e Ortodontia.

A escolha dos materiais odontológicos está na dependência não somente de suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, bem como do conhecimento das respostas biológicas desencadeadas nos tecidos vivos, pois muitos desses materiais têm a capacidade de alterar o equilíbrio biológico quando em contato com os mesmos. Dessa forma, é crescente, nos últimos anos, o número de pesquisas envolvendo a biocompatibilidade dos materiais odontológicos. No entanto, questiona-se se este fato estaria associado a um aumento real na frequência de reações alérgicas aos materiais ou ao maior cuidado com os possíveis efeitos colaterais determinados por eles (O'Brien, 1986).

A maioria das ligas metálicas utilizados em Ortodontia apresenta composição similar ao aço inoxidável (18/8 - 18% de cromo e 8% de níquel), sendo que muitos dispositivos como máscaras faciais, anéis ortodônticos e bráquetes utilizam algum tipo de solda no processo de confecção. Pesquisas têm mostrado que alguns íons podem ser liberados pela solda, cuja exposição pode determinar uma variedade de efeitos adversos com alterações tóxicas diretas de forma aguda, ou de forma crônica (Azevedo, 2003). A "World Health Organization International Agency for Research on Câncer" e "United States National Toxicology Program" tem considerado o cádmio, cobre, prata e zinco, componentes da solda de prata, como metais com potencial carcinogênico em humanos. Muitos estudos têm associado tal exposição com câncer no pulmão, na próstata, nos rins, além de alterações no sistema hematopoiético, sistema urinário e digestivo (Azevedo, 2003).

Em 1992, Grimsdottir, Gjerdet e Hensten-Pettersen testaram, in vitro, a citotoxicidade de alguns metais utilizados em Ortodontia e demonstraram a biocompatibilidade dos fios de aço inoxidável. Entretanto, os anéis ortodônticos determinaram efeitos citotóxicos que poderiam estar associados à utilização de soldas-prata e soldas-cobre na sua fabricação.

Apesar do conhecimento sobre os efeitos dos íons metálicos existentes no meio ambiente ou em alguns produtos industrializados, a presença desses íons nas soldas de prata utilizadas em Ortodontia e, conseqüentemente, na cavidade oral tem uma abordagem restrita

na literatura, não sendo considerada ainda, uma fonte de contaminação. Acrescenta-se que os trabalhos sobre o assunto mostram apenas resultados de pesquisas “in vitro”, deixando questões, acerca da toxicidade em humanos, ainda sem resposta.

Diante dos riscos em relação à biocompatibilidade dos íons metálicos e da sua presença nas soldas de prata utilizadas em Ortodontia, propõe-se neste trabalho avaliar a citotoxicidade desse material, bem como investigar a liberação de íons na saliva humana.

OBJETIVOS

1.1. GERAL

Propôs-se neste trabalho avaliar a toxicidade da solda de prata utilizada em Ortodontia.

1.2. ESPECÍFICO

1.2.1. Avaliação “in vitro”:

1.2.1.1. Determinação da citotoxicidade da solda de prata.

1.2.2. Avaliação “in situ”:

1.2.2.1. Determinação da concentração de íons, componentes da solda de prata, liberados na saliva humana.

CONCLUSÕES

A partir desse estudo, pôde-se concluir que:

- *A solda de prata utilizada em Ortodontia representa um material com severa toxicidade celular, sendo responsável pela inibição da proliferação, crescimento e desenvolvimento das células estudadas;*
- *As diferenças das concentrações iônicas encontradas entre os grupos teste e controle para liberação dos íons cobre, prata, zinco e cádmio mostraram, nitidamente, a influência das características fisiológicas e metabólicas individuais da cavidade oral sobre as ligas utilizadas nos aparelhos ortodônticos e processo corrosivo desencadeado;*
- *Existiu grande liberação dos íons avaliados na cavidade bucal, com concentrações elevadas imediatamente após a instalação do aparelho, representando risco de absorção e retenção desses íons pelo organismo humano, apesar da regressão nas concentrações ainda no período estudado.*

8. REFERÊNCIAS

1. O'Brien W J. *Dental Materials: properties and selection*. London: Quintessence Co.; 1989.
2. Azevedo CRF. *Characterization of metallic piercings*. *Engineering Failure Analysis*. 2003;10:255-263.
3. Grimsdottir MR, Gjerdet NR, Hensten-Pettersen A. *Composition and in vitro corrosion of orthodontic appliances*. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1992;101:525-532.
4. Wataha JC, Messer RL. *Casting alloys*. *Dent Clin N Am*. 2004;48:499-512.
5. Nikellis I, Levi A, Zinelis S. *Effect of soldering on the metal-ceramic bond strength of an Ni-Cr base alloy*. *J Prosthet Dent*. 2005;94(5):435-439.
6. Wataha JC. *Biocompatibility of dental casting alloys: A review*. *J Prosthet Dent*. 2000;83(2):223-234.
7. Burger J, Diaz-Barriga F, Marafante E, Pounds J, Robson M. *Methodologies to examine the importance of host factors in bioavailability of metals*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2003;56:20-31.
8. Craig R G, Hanks C T. *Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests*. *J Dent Res*. 1990;69:1539-1542.
9. Wataha JC, Lockwood PE, Noda M, Nelson SK, Mettenburg DJ. *Effect of toothbrushing on the toxicity of casting alloys*. *J Prosthet Dent*. 2002;87:94-98.
10. Barret RD, Bishara S, Quinn JK. *Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro*. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1993;103(1):8-14.
11. Wataha, JC, Lockwood, PE, Khajotia SS, Turner R. *Effect of pH on element release from dental casting alloys*. *J Prosthet Dent*. 1998;80:691-698.
12. IARC, *Meeting of IARC working group on beryllium, cadmium, mercury and exposure in the glass manufacturing industry*. 1993;19(5),360-363.
13. Hunder G, Javdani J, Elsenhans B, Schumann K. ¹⁰⁹Cd accumulation in the calcified parts of rat bones. *Toxicology*, 2001;159:1-10.
14. Zeng X. et al. *Impact of cadmium exposure on male sex hormones: a population-based study in China*. *Environ Res*. 2004;96:338-344.
15. EPA, Agency EP. *Ebdocrine Disruptor Screening Program*. Available online: [Http://www.epa.gov/scipoli/oscp/edspoverview/index.htm](http://www.epa.gov/scipoli/oscp/edspoverview/index.htm), 2008.
16. Piasek M et al. *Placental cadmium and progesterone concentrations in cigarette smokers*. *J Reprod Toxicol*. 2001; 15: 673-681.

17. Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 2003;189:147-163.
18. Fitzgerald, DJ. Safety guidelines for copper in water. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67:1098S-1102S.
19. Winge DR., Mehra R K. Host defenses against copper toxicity. *Int Rev Exp Pathol.* 1990; 31: 47-83.
20. Barceloux DG. Copper. *Clin Toxicol.*1999;37(2):217-237.
21. Manzl C, Enrich J, Ebner H, Dallinger R, Krumschnabel G. Copper-induced formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. *Copper-induction formation of reactive oxygen species causes cell death and disruption of calcium homeostasis in trout hepatocytes. Toxicology.* 2004;196:57-64.
22. McClung, JP et al. Effects of phytase on body weight gain, body composition and bone strength in growing rats fed a low-zinc diet. *J Nutr Biochem.* 2006;17:190-196.
23. Pelkonen KHO, Heinonen-Tanski H, Hanninen OOP. Accumulation of silver from drinking water into cerebellum and musculus soleus in mice. *Toxicology.* 2003;186:151-157.
24. Bosetti M, Masse A, Tobin E, Cannas M. Silver coated materials for external fixation devices: in vitro biocompatibility and genotoxicity. *Biomaterials* 2002;23:887-892.
25. Fraunhofer J A V. Corrosion of Orthodontics Devices. *Semin Orthod.* 1997;3(3):198-205.
26. Jacobsen, N., Hensten-Pettersen, A. Occupational health problem and adverse patient reactions in orthodontics from 1987 to 2000. *Eur J Orthod* 1989;11(3):254-264
27. Menezes LM, Campos LC, Quintao CC, Bolognese AM. Hypersensitivity to metals in orthodontics, *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;126:58-64.
28. Eliades T, Zinellis S, Eliades G, Athanasiou G E. Nickel content of as received, retrieved end recycled stainless steel brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;122:217-220.
29. Staffolani N. et al. Ion release from orthodontic appliances. *J Dent.* 1999;27:449-454.
30. Huang T, Yen C, Kao C. Comparison of ion release from new and recycled orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120:68-75.
31. Wataha, JC, Nelson, SK, Lockwood, PE. Elemental release from dental casting alloys into biological media with and without protein. *Dent Mater.* 2001;17:409-414.
32. Sarkar NK, Fuys JR, Stanford W. The chloride corrosion behavior of silver-base casting alloys. *J Dent Res.*1979;58(6):1572-1577.

33. Niemi L, Minni E, Ivaska A. An electrochemical and Multispectroscopic Study of Corrosion of Ag-Pd-Cu-Au Alloys. *J Dent Res.* 1986;65(6):Jun,888-891.
34. Gjerdet NR, Hero H. Metal release from heat-treated orthodontic archwires. *Acta Odontol Scand.* 1987;45:409-414.
35. Hwang C, Shin J, Cha J. Metal release from simulated fixed orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120(4):383-391.
36. Kohl WK. Metallurgy in Orthodontics. *Metallurgy.* 1964;34(1):37-53.
37. Matasa CG. Attachment corrosion and its testing. *J Clin Orthod.* 1995;XXIX(1):16-25.
38. Maijer R, Smith DC, Biodegradation of the orthodontic bracket system. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1986;90(3):195-198.
39. Wataha JC, Lockwood PE, Noda M, Nelson SK, Mettenburg DJ. Effect of toothbrushing on the toxicity of casting alloys. *J Prosthet Dent.* 2002;87:94-98.
40. Tai Y, De Long R, Goodkind RJ, Douglas WH. Leaching of nickel, chromium and beryllium ions from base metal alloy in an artificial oral environment. *J Prosthet Dent.* 1992;68(4),692-697.
41. Berge M, Gjerdet N R, Erichsen E S. Corrosion of silver soldered orthodontics wires. *Acta Odontol Scan.* 1982;40:75-79.
42. Syverud M, Dahl JE, Morisbak E. Corrosion and biocompatibility testing of palladium alloy castings. *Dent Mater.* 2000;17:7-13.
43. Grill V et al. The influence of dental metal alloys on cell proliferation and fibronectin arrangement in human fibroblast cultures. *Archs oral Biol.* 1997;42(9):641-647.
44. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. In vitro reaction of macrophages to metal ions from dental biomaterials. *Dent Mater.* 1995;11:239-245.
45. Brune, D. Metal release from dental biomaterials. *Biomaterials.*1986;7:163-175.
46. Syrjanen S, Hensten-Pettersen A, Kangasniemi, K, Yuli-Urpo A. In vitro and in vivo biological responses to some dental alloys tested separately and in combinations. *Biomaterials,* 1985;7:169-176.
47. Wataha JC, Craig RG, Hanks C T. The release of elements of dental casting alloys into cell-culture medium. *J Dent Res.* 1991;70(6):1014-1018.
48. Grimsdottir MR, Hensten-Pettersen H, Kullmann A. Citotoxic effect of orthodontic appliances. *Eur J Orthod.* 1992;14:47-53.
49. Mockers O, Deroze D, Camps J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. *Dent Mater.* 2002;18:311-317.

50. Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso EF. *In vivo study on metal release form fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;124:687-694.
51. Stanford JW. *Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. Int Dent J.* 1980;30(2):140-180.
52. Oh K, Kim K. *Íon release and cytotoxicity of stainless steel wires. Eur J Orthod.;* 2005 Dec;27(6):533-540.
53. Wigg MD, Menezes LM, Quintão CCA, Moreira TC, Chevitaress O. *Elásticos extra-orais: Avaliação da citotoxicidade. Ortodontia Gaúcha.* 1997;1(2), 151-157.
54. Serrano M C et al. *In vitro biocompatibility assessment of poly (ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. Biomaterials.* 200;25:5603-5611.
55. Solmi R et al. *Interactions of fibroblasts with soldered and laser-welded joints. Biomaterials.* 2004;25:735-740.
56. Shimizu S, Narita MT, Sujimoto Y. *Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. Nature,* 1999;399: 483-487.
57. Li M, Xia T, Chun-Sun J, Li L, Fu J, Zou Z. *Cadmium directly induced the opening of membrane permeability pore of mitochondria which possibly involved in cadmium-triggered apoptosis. Toxicology.* 2003;194:19-33.
58. Çelik A, Çomelekoglu U, Yalin S. *A study on the investigation of cadmium chloride genotoxicity in rat bone marrow using micronucleus test and chromosome aberration analysis. Toxicol Ind Health.* 2005;21:243-248.
59. Soria M, Menezes, LM, Dedavid B, Pires M, Rizzato S, Costa Filho LC. *Avaliação in vitro da liberação de níquel por bráquetes metálicos. R Dental Press Ortodon Ortop Facial.* 2005;10(3):87-96.
60. Navazesh M, Christensen CM. *A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. J Dent Res.* 1982 Oct;61(10):1158-1162.
61. Kerusuo H, Moe G, Hensten-Pettersen A. *Salivary nickel and chromium in subjects with different types of fixed orthodontic appliances. Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997;111(6):595-598.
62. Gjerdet NR, Erichsen ES, Remlo HE, Evjen G. *Nickel and iron in saliva of patients with fixed orthodontic appliances. Acta Odontol Scand.* 1991;49:73-78.
63. Eliades T, Trapalis C, Eliades G, Katsavrias E. *Salivary metal levels of orthodontic patients: a novel methodological and analytical approach. Eur J Orthod.* 2003;25:103-106.

64. Jia, W, Beaty, MW, Reinhardt RA, Petro TM, Cohen DM, Maze CR. Nickel release from orthodontic arch wires and cellular immune response to various nickel concentrations. *J Biomed Mater Res.* 1999; 48: 488-494.
65. Mueller W et al. Electrochemical characterization of dental alloys: its possibilities and limitations. *Anal Bioanal Chem.* 2005;381:1520-1525.
66. Souza RM, Menezes LM. Nickel, Chromium and Iron Levels in the Saliva of Patients with Simulated Fixed Orthodontic. *Angle Orthod.* 2008;78(2):345–350.
67. Toms AP. The corrosion of orthodontics wire. *Eur J Orthod.* 1988;10:87-97.
68. Eliades T, Boureauel C. Intraoral aging of orthodontics materials: The picture we miss and clinical relevance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;127:403-412.