

Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de elásticos ortodônticos intermaxilares

In vitro cytotoxicity evaluation of intermaxillary orthodontic elastics

Resumo

Objetivo: Avaliar a citotoxicidade de quatro diferentes marcas comerciais de elásticos intermaxilares intra-orais utilizando ensaio de citotoxicidade em culturas de células.

Metodologia: Quatro marcas comerciais de elásticos foram avaliadas: American Orthodontics (Grupo 1), TP Orthodontics (Grupo 2), Morelli (Grupo 3) e Uniden (Grupo 4). Os elásticos foram previamente esterilizados em luz ultravioleta e colocados em placas de Petri, as quais continham cultura de células HEP-2 em concentração de 10^5 . Foram utilizadas cinco placas para cada grupo, num total de 15 elásticos testados por grupo (n=15). Após 24h, as monocamadas de células foram coradas para avaliação dos halos de difusão e de lise celular de acordo com o Índice de Resposta de Stanford.

Resultados: Houve ausência de citotoxicidade para os elásticos das marcas American Orthodontic e TP Orthodontic e alta citotoxicidade nos elásticos das marcas Morelli e Uniden.

Conclusão: Com base na metodologia utilizada e nos resultados encontrados, conclui-se que os elásticos da marca Morelli e Uniden apresentaram alta citotoxicidade.

Palavras-chave: Citotoxicidade; elásticos ortodônticos; cultura de células

Abstract

Purpose: To evaluate the cytotoxicity of four different commercially marketed intermaxillary orthodontic elastics using cell culture.

Methods: Four brands of orthodontic elastics were evaluated: American Orthodontics (Group 1), TP Orthodontics (Group 2), Morelli (Group 3) and Uniden (Group 4). The elastics were previously sterilized using ultraviolet light and then placed on Petri dishes containing tissue cultures of HEP-2 cells at concentration of 10^5 for 24h. Five Petri dishes were used for each group, and a total of 15 elastics were tested per group (n=15). The cell monolayers were stained for evaluation of the diffusion halo and cell lysis according to the Response Index by Stanford.

Results: There was absence of cytotoxicity for American Orthodontic and TP Orthodontic elastics, but high cytotoxicity produced by Morelli and Uniden elastics.

Conclusion: Based on the methods used, the results suggest that Morelli and Uniden orthodontic elastics have high cytotoxicity.

Key words: Cytotoxicity; orthodontic elastics; cell culture

Matheus Melo Pithon^a
Rogério Lacerda dos Santos^a
Antônio Carlos de Oliveira Ruellas^a
Eduardo Franzotti Sant'Anna^a
Maria Teresa Villela Romanos^b
Gabriella da Silva- Mendes^b

^aDepartamento de Ortodontia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^bDepartamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Correspondência:
Matheus Melo Pithon
Rua México 78 Recreio
Vitória da Conquista, BA – Brasil
45020-390
E-mail: matheuspithon@ufrj.br

Recebido: 22 de abril, 2008
Aceito: 19 de junho, 2008

Introdução

Elásticos em látex são freqüentemente utilizados nas diversas fases do tratamento ortodôntico (1) para transmissão de força para correção de malposicionamento dentário ou na fixação maxilo-mandibular após cirurgia ortognática (2). Apesar da ampla aceitação e utilização desses elásticos ortodônticos, ainda há dúvidas sobre seu potencial tóxico ao organismo, pois a toxicidade de elásticos ortodônticos intermaxilares ainda não foi testada extensivamente como a de outros materiais odontológicos. A investigação da citotoxicidade de novos produtos é particularmente importante para obter informações sobre suas potencialidades tóxicas ou irritantes aos tecidos da cavidade bucal (3,4).

A toxicidade de um material pode ser avaliada através de testes *in vitro*, experimentos em animais e estudos clínicos em humanos (5). Estudos *in vitro* são aplicados principalmente para avaliar a citotoxicidade (lesão em células) de um material dentário (6). Comparando-se com experimentos em animais e estudos clínicos em humanos, as vantagens do estudo *in vitro* de toxicidade incluem: controle das condições de experimento, baixo custo, rapidez e ausência de problemas éticos (6,7). Nos testes *in vitro* de toxicidade de materiais três metodologias podem ser utilizadas: avaliação da liberação de cromo, filtração em membrana Millipore e teste de difusão em ágar (8).

Este estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade de elásticos ortodônticos intermaxilares de quatro diferentes marcas comerciais, utilizando ensaio de citotoxicidade em cultura de células.

Metodologia

Foram utilizadas culturas de células da linhagem HEP-2, do tipo epitelioide, originada de carcinoma de laringe humana, da coleção do Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas (LEDAC), do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Utilizaram-se amostras de elástico ortodôntico intermaxilar, de diâmetro 5/16 das marcas American Orthodontics (American Orthodontics, Sheboygon, WN, EUA. Lote 31480), Tp Orthodontics (Tp Orthodontics, La Porte, IN, EUA. Lote 5534), Morelli (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil. Lote 100.000) e Uniden (Uniden Sorocaba, SP, Brasil. Lote 00). Como controles positivo e negativo, utilizaram-se amálgama de cobre (Dentsply, Petrópolis, RJ, Brasil) e fio de aço inoxidável (American Orthodontics, Sheboygon, WN, EUA), respectivamente.

Para o ensaio de citotoxicidade em cultura de células, as células foram cultivadas em monocamadas e utilizadas no teste por difusão em ágar (*agar overlay test*), de acordo com Matta (9). Os testes foram realizados em placas de Petri (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) de 10cm de diâmetro, às quais foram adicionadas uma suspensão de 10mL de cultura de células HEP-2 em concentração de 10^5 células/mL, preparada em meio nutritivo de Eagle (meio

mínimo essencial de Eagle = MEM-Eagle, Sigma, New York, NY, EUA), suplementado com 2% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), com adição de glutamina (Sigma, New York, NY, EUA), gamicina (Schering Plough, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e fungizona (Bristol-Myers-Squibb, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, as células foram incubadas a 37°C durante 48h em ambiente com 5% de CO₂. Após a constatação em microscópio óptico invertido que as células estavam confluentes e formando uma monocamada em toda a extensão da placa, desprezou-se o meio nutritivo, lavando-se as células com solução salina. Em seguida, adicionou-se 10mL da mistura constituída de 5mL de ágar a 3% em água bi-destilada, 5mL de MEM-Eagle 2x e 0,5mL de vermelho neutro a 1% em salina, a cada placa contendo as monocamadas de células, aguardando-se solidificar por 10-15 minutos.

Os elásticos a serem testados e os controles positivo (amálgama) e negativo (fio ortodôntico) foram previamente esterilizados por radiação ultravioleta durante 10min. Em cada placa foram colocados três elásticos sobre a camada de ágar, de forma cuidadosa para evitar ruptura, mantendo equidistância entre os mesmos. Foram utilizadas cinco placas para cada grupo, num total de 15 elásticos testados por grupo (n=15). Após esterilização, as placas de Petri foram identificadas e incubadas em estufa a 37°C por 24h em ambiente com atmosfera de 5% de CO₂ (9). Após este período, as monocamadas de células foram fixadas com formaldeído a 8% e coradas com cristal violeta. O tamanho dos halos de difusão foi medido com régua milimetrada e a percentagem de lise celular foi obtida através da observação em microscópio óptico invertido.

Os resultados foram computados em índices de resposta (*Response Index: RI*), de acordo com os parâmetros de Stanford (8). O índice RI apresenta dois números separados por uma barra, no qual o primeiro representa o tamanho do halo de difusão de substância, indicando, desta forma, o potencial de liberação de material tóxico para a camada de células, e o segundo indica a quantidade percentual do halo em que existe lise das células (8), demonstrando, assim, a proporção da área sem crescimento (zona limite entre presença e ausência de crescimento celular), conforme parâmetros indicados na Tabela 1.

Resultados

O controle negativo (Fig. 1A) apresentou RI=0/0, indicando ausência de formação de halo e de lise celular (Tabela 2). Já o controle positivo (Fig. 1B) apresentou RI=2/5, o que indica que gerou halo menor que 0,5cm de extensão e que ocorreu lise celular acima de 80%.

Com relação aos elásticos testados os resultados demonstraram RI de 0/0 para os grupos 1 (Fig. 1C) e 2 (Fig. 1D) e de 4/5 e 3/4 para os grupos 3 (Fig. 1E) e 4 (Fig. 1F), respectivamente, indicando que no grupo 3 ocorreu formação de halo maior que 1cm e lise celular acima de 80% e no grupo 4 ocorreu halo menor que 1cm e lise em cerca de 60 a 80% das células.

Tabela 1. Índice de Resposta (RI) utilizados para avaliar o grau de citotoxicidade dos materiais, conforme os parâmetros indicados por Stanford (8).

Índice do tamanho do Halo (R)	Índice da quantidade de lise das células (I)
0 = não há detecção de halo ao redor ou sob a amostra	0 = não se observa lise
1 = halo limitado à área sob a amostra	1 = até 20% do halo com lise
2 = halo maior que 0,5cm em extensão da amostra	2 = 20 a 40% do halo com lise
3 = halo maior que 1,0cm em extensão da amostra	3 = 40 a 60% do halo com lise
4 = halo maior que 1,0cm em extensão da amostra, mas não envolve toda a placa	4 = 60 a 80% do halo com lise
5 = halo envolvendo a placa por inteiro dentro do halo	5 = acima de 80% de células com lise

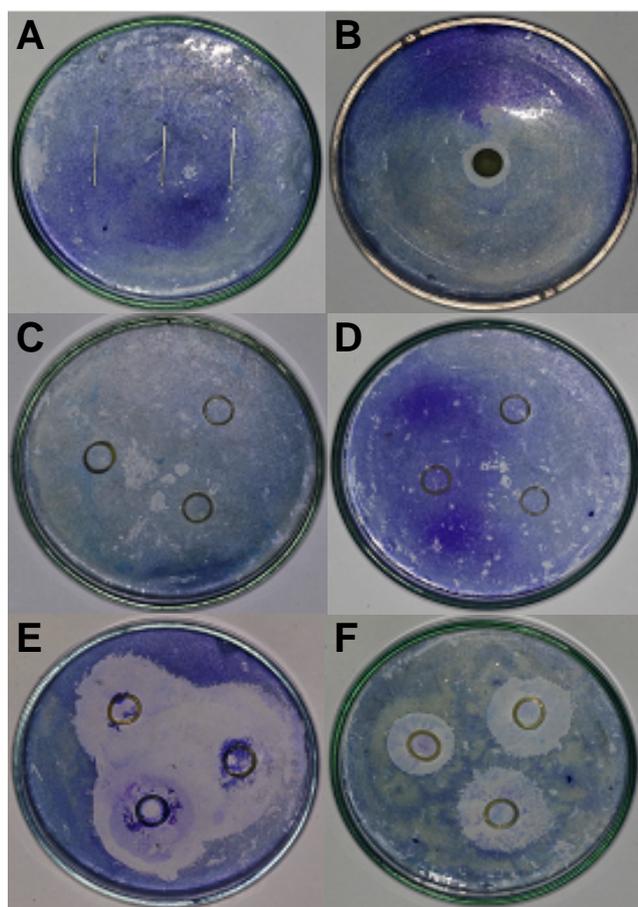


Fig. 1. Placas de Petri contendo (A) controle negativo (fio ortodôntico de aço inoxidável), (B) controle positivo (amálgama de cobre), (C) elásticos do Grupo 1 (American Orthodontic), (D) elásticos do Grupo 2 (TP Orthodontic), (E) elásticos do Grupo 3 (Morelli) e (F) elásticos do Grupo 4 (Uniden), após coloração. Observam-se halos de inibição em B, E e F.

Tabela 2. Valores de RI (Índice de Resposta, segundo parâmetros de Stanford) obtido para os grupos avaliados em cultura de células após 24 horas.

	Índice do tamanho do halo das células	Índice da quantidade de lise
Controle +	2	5
Controle -	0	0
Grupo 1	0	0
Grupo 2	0	0
Grupo 3	4	5
Grupo 4	3	4

Discussão

A utilização de diversos tipos de materiais durante o tratamento ortodôntico pode provocar diferentes reações biológicas aos tecidos bucais por causa de diferenças na composição desses materiais (9). Dessa forma, os avanços da biotecnologia definem a necessidade da investigação da biocompatibilidade dos materiais, ou seja, a coexistência desses materiais manufaturados com tecidos corporais e fluidos, que permanecem no organismo humano por períodos de tempo variados sem irritar os tecidos moles (10-12). Portanto, biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de atuação do material com uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma aplicação específica (6). Uma reação adversa deste material é chamada de toxicidade (13), a qual pode ser avaliada por métodos *in vivo* e *in vitro* (14-16).

Para o presente estudo, selecionou-se o teste *in vitro* com ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar, utilizando uma linhagem de células epitelióides derivadas de carcinoma de laringe humano, por ser um sistema sensível e de fácil obtenção e cultivo. Os controles citotóxicos, positivo (amálgama de cobre) e negativo (fio de aço inoxidável), também foram escolhidos pela facilidade de obtenção e pela utilização bem-sucedida em outros experimentos (10,17). Tanto o controle positivo quanto o negativo obtiveram resultados compatíveis com a literatura. O controle positivo apresentou certa citotoxicidade em decorrência do mercúrio presente no amálgama e o controle negativo, de fio orto-

dôntico de aço inoxidável, apresentou total biocompatibilidade (9,10,17,18).

O método baseado na difusão em ágar está entre os mais antigos testes de pesquisa para avaliar os efeitos de materiais líquidos ou sólidos sobre monocamada de células (18-20), sendo considerado um método rápido e sensível para determinar a citotoxicidade relativa. As técnicas de cultura em monocamada empregam linhagem de determinadas células (fibroblastos de ratos ou células humanas) que crescem em placas de Petri e recebem uma camada de ágar, sobre a qual o material a ser testado é colocado, e o conjunto é incubado por um período de tempo predeterminado. Os materiais tóxicos apresentam zonas que correspondem à morte celular. Na comparação dos resultados entre os elásticos ortodônticos observou-se ausência de toxicidade dos elásticos dos grupos 1 e 2 (American Orthodontics e TP Orthodontics, respectivamente). Entretanto os elásticos do grupo 3 e 4 (Morelli e Uniden, respectivamente) demonstraram alta toxicidade, sendo superior até mesmo ao amálgama utilizado como controle positivo, o qual tem em sua composição o mercúrio, substância com toxicidade comprovada aos tecidos (12). A alta citotoxicidade apresentada pelos elásticos da marca Morelli estão de acordo com os resultados relatados por Wigg et al. (13), que compararam esse elástico com um similar da marca American Orthodontics. Já os elásticos da marca Uniden (Grupo 4) também mostrou citotoxicidade elevada, embora menor do que a dos elásticos da marca Morelli (Grupo 3). Variações

ocorrem na composição dos elásticos de látex (1) e isto pode explicar a diferença de resultados obtidos entre as marcas estrangeiras (American Orthodontics e TP Orthodontics) e as nacionais (Morelli e Uniden).

Segundo Schmalz (6), o grande perigo do uso de elásticos intra-orais com potencial citotóxico seria o fato de que substâncias liberadas pelos mesmos possam ser ingeridas pelo paciente e, ao longo do tempo, causar doenças pelo efeito cumulativo de substâncias tóxicas no organismo. Assim, diante dos resultados observados, deve-se considerar que o sucesso na clínica ortodôntica não envolve somente o domínio da técnica corretiva para atingir o ideal em oclusão dentária, mas também requer a aplicação de normas de biossegurança e a preocupação com as conseqüências locais e sistêmicas dos materiais dentários utilizados. Entretanto, ressalta-se que os resultados aqui obtidos não podem ser diretamente extrapolados para a situação clínica e servem apenas como um indicador do potencial citotóxico dos materiais testados.

Conclusões

De acordo com a metodologia utilizada, os resultados sugerem que os elásticos das marcas American Orthodontic e TP Orthodontic não mostraram citotoxicidade em cultura de células; já os elásticos das Marcas Morelli e Uniden apresentaram alta toxicidade com formação de extenso halo de difusão e extrema lise celular.

Referências

- Russell KA, Milne AD, Khanna RA, Lee JM. In vitro assessment of the mechanical properties of latex and non-latex orthodontic elastics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2001;120:36-44.
- Hanson M, Lobner D. In vitro neuronal cytotoxicity of latex and nonlatex orthodontic elastics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:65-70.
- Daguano JK, Santos C, Rogero SO. Citotoxicity Analysis of Bioceramics for use in Systems of Implantations. *Matéria* 2007;12:134-9.
- Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. *Rev Odontol UNESP* 2004;33: 65-8.
- Pithon MM, Santos RL, Ruellas AC, Fidalgo TK, Romanos MT, Mendes GS. Citotoxicidade in vitro de elásticos ortodônticos: comparação entre duas metodologias. *Rev Saúde Com* 2008;4:19-26.
- Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994;22 (Suppl. 2):S6-11.
- Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo. Artes Médicas; 2005.
- Stanford JW. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980;30:140-88.
- Matta EN, Calasans-Maia JA, Ruellas AC, Wigg MD. Citotoxicity Evaluatio in vitro of Orthodontic Elastic Showing Superficial Treatment. *J Bras Ortodon Ortop Facial* 2004;9:587-93.
- Pacheco MC, Wigg MD, Chevitarese O. Biocompatibilidade das soldagens ortodônticas. *Rev SBO* 1995;2:233-8.
- Tang AT, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res* 1999;45:214-22.
- Anusavice KJ. Phillips, materiais dentários, 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.
- Wigg MD, Menezes LM, Quintão CC, Moreira TC, Chevitarese O. Extra buccal orthodontic elastic: citotoxicity evaluation. *Ortodon Gauch* 1997;1:151-7.
- Palosuo T, Alenius H, Turjanmaa K. Quantitation of latex allergens. *Methods* 2002;27:52-8.
- Rogero SO, Souzaabazzi A, Ikeda TI, Cruz AS, Fernandes KC, Higa OZ. Citotoxicidade in vitro das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionozante. *Ver Inst Adolfo Lutz* 2000;59:1-5.
- Rogero SO, Higa OZ, Saiki M, Correa OV, Costa I. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. *Toxicol In Vitro* 2000;14:497-504.
- Moreira TC, Quintão CC, Menezes LM, Wigg MD, Calasans-Maia JA. Plastic elastics: citotoxicity after sterilization. *Rev SBO* 1998;3:172-7.
- Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Mater Res* 2003;6:317-20.
- Guess WL, Rosenbluth SA, Schmidt B, Autian J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J Pharm Sci* 1965;54:1545-7.
- Craig RG. Restorative dental materials. 9 ed. St Louis: Mosby Year Book; 1993.