

Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de parafusos expansores palatinos

In vitro evaluation of the cytotoxicity of palatal expanders

Resumo

Objetivo: Avaliar a citotoxicidade de parafusos expansores confeccionados com aço inoxidável ou compósito.

Métodos: Foram avaliados 6 parafusos expansores divididos em 2 grupos de acordo com o material: expansor metálico e expansor de compósito. Três grupos controle foram utilizados: controle positivo (cilindro de amálgama), controle negativo (bastão de vidro) e controle de célula (células não expostas). Os expansores esterilizados foram imersos em meio mínimo essencial de Eagle por 24 h, onde se procedeu a remoção do sobrenadante e contato com fibroblastos L929. Após contato com o meio as células foram incubadas por 24 h, sendo adicionados 100µL do corante vermelho neutro a 0,01%, seguido por incubação por 3 h e fixação das células. A citotoxicidade foi analisada em 4 períodos: 24, 48, 72 e 168 h. A contagem de células viáveis foi realizada com espectrofotômetro ($\lambda = 492\text{ nm}$) e os dados foram analisados por ANOVA.

Resultados: Os grupos controle positivo (amálgama) foram estatisticamente diferentes dos demais grupos. Não houve diferença estatística na comparação entre os demais grupos e períodos.

Conclusões: Os resultados sugerem que os parafusos expansores testados não apresentam citotoxicidade significativa conforme o desenho experimental utilizado.

Palavras-chave: Citotoxicidade; mordida cruzada; técnicas de cultura de células

Abstract

Objective: To evaluate the cytotoxicity of two palatal expanders made of stainless steel or composite.

Methods: Six expanders were divided into two experimental groups: metallic expander and composite expander. Three control groups also were assessed: positive control (amalgam), negative control (glass stick), and control cell (cells not exposed to any material). The sterilized expanders were immersed into Eagle's minimum essential medium for 24 h, and the contact assay was performed using L929 fibroblasts. The cells were incubated for 24 h, and 100µL of 0.01% neutral-red staining solution were added followed by incubation for 3 h and cell fixation. Cytotoxicity was evaluated at four different periods of time: 24, 48, 72, and 168 h. Counting of viable cells was performed by using a spectrophotometer at a wavelength of 492 nm, and data were analyzed by ANOVA.

Results: The positive control groups (amalgam) were statistically different from the other groups. No difference of cytotoxicity was found among the groups and periods of time.

Conclusions: The tested metallic and composite expanders showed no significant cytotoxicity within this experimental design.

Key words: Cytotoxicity; cross-bite; cell culture techniques

Matheus Melo Pithon^a
Rogério Lacerda dos Santos^a
Fernanda Otaviano Martins^b
Maria Teresa Villela Romanos^b

^a Programa de Doutorado em Ortodontia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

^b Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Correspondência:
Matheus Melo Pithon
Av. Otávio Santos, 395, sala 705
Centro Odontomédico Dr. Altamirando da
Costa Lima
Vitória da Conquista, BA – Brasil
45020-750
E-mail: matheuspithon@bol.com.br

Recebido: 06 de janeiro, 2009
Aceito: 06 de março, 2009

Introdução

A Odontologia tem como meta principal manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente através de prevenção de doenças, alívio da dor, melhoria da eficiência mastigatória, aprimoramento da fonética e/ou melhora da aparência. Muitos desses objetivos requerem a reposição ou alteração da estrutura dentária existente, assim como a alteração do posicionamento dos dentes. Um dos principais desafios tem sido desenvolver e selecionar materiais biocompatíveis (1). Metais, cerâmicas, polímeros e resinas compostas são os quatro grupos de materiais empregados em Odontologia (2). Qualquer material na boca cria uma interface dinâmica com interações que podem alterar um ou outro, determinando tanto uma resposta biológica ativa ao material, a biocompatibilidade, quanto uma capacidade de o material sobreviver, resistir à degradação ou sofrer corrosão no corpo (3). A biocompatibilidade é dependente da liberação de elementos desses materiais, sendo que a composição, o pré-tratamento e o manuseio dos materiais influenciam a liberação de tais elementos (4).

Até meados do século passado, pouca informação científica sobre biocompatibilidade de materiais de uso odontológico estava disponível. Reações tóxicas, inflamatórias, alérgicas ou mutagênicas são possíveis respostas biológicas aos materiais (4,5). A toxicidade é um dos principais parâmetros para a avaliação de resposta biológica e do potencial relacionado com a dose do material para causar a morte de células ou tecidos, sendo hoje o primeiro teste de triagem usado para quase todos os novos materiais (6).

A Ortodontia usa diversos tipos de materiais classificados como materiais restauradores provisórios que são destinados à aplicação por um período médio ou longo. Dentre esses materiais citam-se em especial bandas, fios de aço, resina acrílica e parafuso expensor, os quais são materiais constituintes do aparelho para disjunção palatina, o disjuntor tipo Hass. Recentemente foi lançado no mercado um parafuso expensor confeccionado de policarbonato (polímero), o qual possuiria características mecânicas superiores aos parafusos convencionais confeccionados com aço inoxidável, segundo o fabricante.

Os polímeros usados nos materiais ortodônticos podem ser divididos em três classes com características distintas: (a) artefatos prontos para serem utilizados com sua forma final dada por fabricantes industriais; (b) polímeros reformáveis usados como armação para uma variedade de artefatos removíveis ou funcionais; e (c) materiais poliméricos de impressão, adesivos e selantes. Os parafusos expansores enquadram-se na primeira categoria de polímeros manufaturados com grande demanda de uso. Como os policarbonatos têm alto módulo de força, apresentam pouca deformação elástica sob tensão e resistência ao escoamento a frio. Entretanto, esses materiais são quimicamente não resistentes quando atacados por solventes. Policarbonatos, cujo monômero é o bisfenol-A (BPA), favorecem a migração desse monômero para fora dos produtos de origem quando expostos a altas temperaturas (5).

A presença de monômero residual leva à citotoxicidade; entretanto, não há informação sobre a citotoxicidade desses expansores. Baseado nessa premissa, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade do novo parafuso expensor de policarbonato em comparação ao expensor metálico convencional utilizando culturas de células de fibroblastos gengivais L929.

Metodologia

Cultura de células

A linhagem celular utilizada de fibroblastos gengivais humanos L929 foi obtida do *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA) (fibroblasto de camundongo) cultivada em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA), 50 µg/mL de gentamicina (Schering Plough, Kenilworth, NJ, EUA), 2,5 µg/mL de fungizona (Bristol-Myers-Squibb, New York, NY, EUA), 0,25 mL solução de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 10 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, MI, EUA), e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e mantida a 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂.

Ensaio de citotoxicidade dos materiais

A amostra compreendeu 6 parafusos expansores de duas diferentes composições divididos em dois: grupo EM – Expansor Metal (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) e grupo EC – Expansor compósito (Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) (Fig. 1).

Para verificar a resposta celular frente aos extremos, outros três grupos foram avaliados: grupo CC (controle de célula), no qual as células não foram expostas a nenhum material; grupo C+ (controle positivo) constituído de um cilindro de amálgama; e C- (controle negativo), no qual um bastão de vidro ficou em contato com as células.

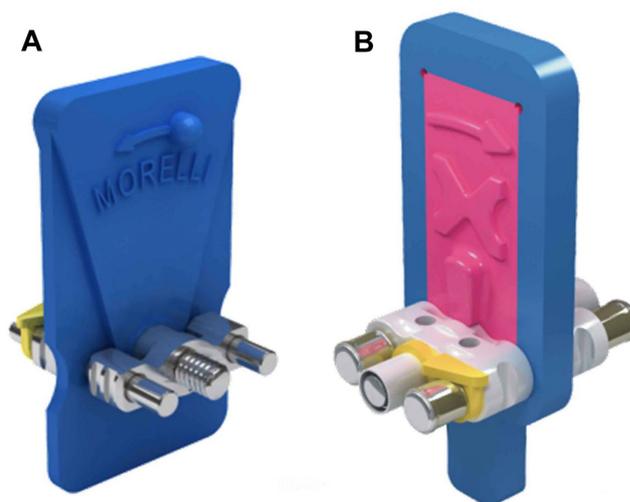


Fig. 1. Expansores avaliados: A - Expansor metálico; B - Expansor de compósito.

Os materiais foram esterilizados previamente por exposição à luz ultravioleta (Labconco, Kansas, EUA) durante 1 hora. Em seguida, três amostras de cada material foram colocadas em placas de 24 poços contendo meio de cultura (MEM) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil). A cada 24 h o meio de cultura foi substituído por meio novo e os sobrenadantes foram coletados após 24, 48, 72 e 168 h (7 dias), e avaliados quanto à toxicidade para as células L929. Os sobrenadantes foram colocados, em triplicata, em uma placa de 96 poços contendo monocamada confluenta de L929 e incubados por 24 h a 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂, totalizando 9 poços para avaliação (n=9). Terminado o tempo de incubação, o efeito na viabilidade celular foi determinado através da técnica “*dye-uptake*”, descrita por Neyndorff et al. (7), com pequenas modificações.

Após 24 h de incubação, foram adicionados 100 µL de vermelho neutro a 0,01% (Sigma, St. Louis, MI, USA), em meio de cultura, em cada poço das microplacas e estas foram incubadas a 37 °C por 3 h para penetração do corante nas células vivas. Passado esse período, após desprezar o corante, foram adicionados 100 µL de solução de formaldeído (Reagen) a 4% em PBS (NaCl 130 mM; KCl 2 mM; Na₂HPO₄ 2H₂O 6 mM; K₂HPO₄ 1 mM, pH7,2) por 5 min, para promover a fixação das células às placas. Em seguida, para a extração do corante, foram adicionados 100 µL de uma solução de ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1% com metanol (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 50%. Após 20 min a leitura foi realizada em espectrofotômetro (BioTek, Winooski, Vermont, EUA) em um comprimento de onda de 492 nm ($\lambda=492$ nm).

Análise estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A análise estatística descritiva incluiu as médias e desvios padrão dos grupos avaliados. O número de células viáveis foi analisado por análise de variância e teste de Tukey, ao nível de significância de 0,05.

Resultados

Os resultados demonstraram ausência de significância estatística entre os materiais (EM e EC) avaliados nos quatro tempos. Apenas o grupo C+ mostrou baixa viabilidade celular, sendo diferente estatisticamente dos demais (Tabela 1).

Em geral, a média de células viáveis dos grupos experimentais foi maior que as médias dos grupos CC e C-. O grupo C+ apresentou sempre as menores médias de células viáveis.

Discussão

A deficiência transversal da maxila pode ser oriunda de fatores genéticos ou ambientais, envolvendo apenas os segmentos dentários posteriores, com uma grande inclinação para o lado palatino, ou estar associada a um comprometimento esquelético da maxila, apresentando um aspecto atrésico, com uma abóboda palatina ogival e estreita. Para correção deste caso há necessidade de expansão capaz de promover uma alteração ortopédica dos segmentos maxilares, mantendo a integridade dos tecidos envolvidos e minimizando os efeitos de inclinação dentária (8-11). A disjunção rápida da sutura palatina mediana preenche estes preceitos, restabelecendo as dimensões transversais da maxila e seu correspondente arco dentário (12-14), mediante a abertura da sutura palatina, associada às reações ortopédicas em outras suturas faciais e a uma pequena movimentação dos dentes pósterosuperiores (12-14). Para tal utilizam-se aparelhos disjuntores apoiados nos primeiros molares superiores e pré-molares, constituídos por acrílico, fio de aço inoxidável, soldas de prata e parafuso expansor manufaturado a partir de uma liga de aço inoxidável.

Recentemente, no intuito de conseguir características mecânicas mais favoráveis, os fabricantes de materiais ortodônticos lançaram no mercado parafusos expansores manufaturados a partir de policarbonato. Os polímeros são usados em Medicina e Odontologia há mais de quarenta anos através de lentes, membros e córneas artificiais, implantes cocleares e oftálmicos, enxertos vasculares, próteses, implantes faciais de bochechas, queixo, lábios, dorso do nariz, produtos médicos tais como luvas, seringas descartáveis, catéteres etc. Os policarbonatos têm alto módulo de força, pouca deformação elástica sob tensão e resistência ao escoamento a frio, mas apresentam significativa degradação quando expostos a altas temperaturas com liberação de monômero para o meio (5). Clinicamente, a ingestão de alimentos quentes, principalmente bebidas em altas temperaturas, poderia provocar algum efeito deletério no material policarbonato de parafusos expansores.

Tabela 1. Comparação dos valores médios da quantidade de células viáveis (M.Cel)* dos grupos avaliados.

Grupos	1° Dia		2° Dia		3° Dia		7° Dia	
	M.Cel (DP)	A						
EM	0,874 (0,133)	A	0,205 (0,034)	A	0,171 (0,023)	A	0,546 (0,084)	A
EC	0,823 (0,185)	A	0,158 (0,04)	A	0,147 (0,027)	A	0,457 (0,221)	A
CC	0,704 (0,07)	A	0,194 (0,08)	A	0,144 (0,013)	A	0,562 (0,088)	A
C+	0,440 (0,028)	B	0,094 (0,042)	B	0,061 (0,012)	B	0,288 (0,039)	B
C-	0,734 (0,07)	A	0,185 (0,025)	A	0,167 (0,012)	A	0,497 (0,087)	A

* Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente (comparação em coluna).

Assim, o presente trabalho se dispôs a avaliar a citotoxicidade de parafusos expansores de metal e policarbonato em cultura de células. A utilização de cultura de células vem sendo utilizada como parte de uma série de testes recomendados para avaliar o comportamento biológico dos materiais a serem colocados em contato com tecidos humanos (1,15,16). Neste estudo, para avaliar a citotoxicidade dos parafusos expansores utilizou-se linhagem de célula L929 (fibroblastos de camundongos), bastante usada para avaliar a citotoxicidade de materiais de uso odontológico (17-20).

O tempo de avaliação foi de 1, 2, 3 e 7 dias, períodos em que os materiais apresentam maior liberação de componentes para o meio onde estão submersos (21). Os espécimes ficaram em contato com o meio de cultura por esses períodos, sendo coletado o sobrenadante do meio de cultura para ser colocado em contato com as células. Os espécimes não foram colocados diretamente sobre as células, uma vez que seu contato mecânico direto poderia causar lesão nas células (22).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que ambos os tipos de expansores testados não apresentaram citotoxicidade em comparação com o controle de célula e o controle negativo. Após o contato do sobrenadante com as células, estas se mostraram com viabilidade celular em todos os tempos avaliados.

Com relação aos expansores de policarbonato, o policarbonato é considerado pela indústria como um produto estável e não reativo sob condições recomendadas de armazenamento, manuseio e uso pretendido, mas por combustão ou decomposição térmica libera dióxido ou monóxido de carbono, traços de hidrocarbonetos, aldeídos, ácidos, fenóis, e seus derivados. Em sua forma de uso adequado o produto

não é considerado carcinogênico, mutagênico, teratogênico ou tóxico para reprodução. Não é inflamável ou corrosivo, mas pode causar irritação mecânica (23).

Para avaliar a resposta celular em situações extremas, utilizou-se um grupo controle positivo (C+), que teve como função gerar lesões às células. O material utilizado como controle positivo foi o amálgama odontológico (24), que é um material com comprovada citotoxicidade (25). Como esperado, o controle positivo apresentou alta toxicidade, sendo diferente estatisticamente de todos outros grupos. Já o grupo controle negativo constituiu-se de um cilindro de vidro, reconhecidamente não tóxico às células, sendo que este grupo objetivou avaliar apenas a ação física sobre as células. Este grupo demonstrou baixa citotoxicidade, sem diferença estatística com o grupo controle de célula, no qual nenhuma substância foi colocada em contato com as células.

Ressalta-se 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 das normas de biossegurança e a preocupação com as consequências locais e sistêmicas dos materiais dentários utilizados. Assim, os possíveis efeitos citotóxicos devem ser verificados para obter maior segurança no uso clínico de determinado material com contato prolongado com a mucosa bucal.

Conclusões

Pode-se concluir que os parafusos expansores metálicos e de policarbonato testados não são citotóxicos de acordo com as condições experimentais deste estudo.

Referências

- Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. *Rev Odontol UNESP* 2004;33:65-8.
- Phillips RW. *Materiais Dentários*. São Paulo: Elsevier; 2005.
- Jonke E, Franz A, Freudenthaler J, König F, Bantleon HP, Schedle A. Cytotoxicity and shear bond strength of four orthodontic adhesive systems. *Eur J Orthod* 2008;30:495-502.
- Morais LS, Serra GS, Muller CA, Palermo EFA, Andrade LR, Meyers MA et al. In vivo metal ion release from Ti-6AL-4V orthodontic mini-implants. *Revista Matéria* 2007;12:290-7.
- Howdeshell KL, Peterman PH, Judy BM, Taylor JA, Orazio CE, Ruhlen RL et al. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health Perspect* 2003;111:1180-7.
- Siqueira Goncalves T, Minghelli Schmitt V, Thomas M, Lopes de Souza MA, Macedo de Menezes L. Cytotoxicity of two autopolymerized acrylic resins used in orthodontics. *Angle Orthod* 2008;78:926-30.
- Neyndorff HC, Bartel DL, Tufaro F, Levy JG. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. *Transfusion* 1990;30:485-90.
- Bishara SE, Staley RN. Maxillary expansion: clinical implications. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1987;91:3-14.
- Holberg C, Steinhäuser S, Rudzki-Janson I. Rapid maxillary expansion in adults: cranial stress reduction depending on the extent of surgery. *Eur J Orthod* 2007;29:31-6.
- Podesser B, Williams S, Crismani AG, Bantleon HP. Evaluation of the effects of rapid maxillary expansion in growing children using computer tomography scanning: a pilot study. *Eur J Orthod* 2007;29:37-44.
- Scolozzi P, Verdeja R, Herzog G, Jaques B. Maxillary expansion using transpalatal distraction in patients with unilateral cleft lip and palate. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:2200-5.
- Hamamci N, Basaran G, Tümen EC, Ozdemir E. Nonsurgical orthodontic treatment of an adolescent girl with Class III malocclusion and asymmetric maxillary narrowing. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;134:309-17.
- Ho CT, Lo LJ, Liou EJ, Huang CS. Dental and skeletal changes following surgically assisted rapid maxillary anterior-posterior expansion. *Chang Gung Med J* 2008;31:346-57.
- Wang D, Cheng L, Wang C, Qian Y, Pan X. Biomechanical analysis of rapid maxillary expansion in the UCLP patient. *Med Eng Phys Med Eng Phys*. 2009;31:409-17.
- Estrela C. *Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

16. Santos RL, Pithon MM, Oliveira MV, Mendes GS, Romanos MTV, Ruellas ACO. Cytotoxicity of introral orthodontic elastics. *Braz J Oral Sci* 2008;7:1520-5.
17. Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sanchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regi M, Portolés MT. L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite-betaTCP/agarose biomaterial. *J Biomed Mater Res A* 2009;89:539-49.
18. Donadio M, Jiang J, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon cones *in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:e76-79.
19. Feizzadeh B, Afshari JT, Rakhshandeh H, Rahimi A, Brook A, Doosti H. Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. *Urol J* 2008;5:161-7.
20. Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol* 2008;21:1871-7.
21. Anusavice KJ. *Phillips Materiais dentários*. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
22. Costa CA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent* 2001;14:25-30.
23. Morelli D. *Folha de Segurança*; 2008: p.1-4.
24. Pithon MM, Santos RL, Ruellas AC, Sant'Anna EF, Romanos MT, Mendes GS. Avaliação *in vitro* da citotoxicidade de elásticos ortodônticos intermaxilares. *Rev Odonto Cienc* 2008;23:287-90.
25. Nakajima H, Wataha JC, Rockwell LC, Okabe T. *In vitro* cytotoxicity of amalgams made with binary Hg-In liquid alloys. *Dent Mater* 1997;13:168-73.