



Artigo Original

CITOTOXICIDADE IN VITRO DE ELÁSTICOS ORTODÔNTICOS: COMPARAÇÃO ENTRE DUAS METODOLOGIAS

IN VITRO CYTOTOXICITY OF ORTHODONTIC ELASTICS: COMPARISON BETWEEN TWO METHODOLOGIES

Resumo

Matheus Melo Pithon¹
Rogério Lacerda dos Santos¹
Antônio Carlos de Oliveira Ruellas¹
Tatiana Kelly da Silva Fidalgo¹
Maria Teresa Villela Romanos¹
Gabriella da Silva Mendes¹

O objetivo do autor do presente trabalho foi comparar duas metodologias, avaliando in vitro a biocompatibilidade de elásticos ortodônticos intra-orais através de teste de citotoxicidade em cultivo de células HEp-2 (carcinoma de laringe humana), comparando duas metodologias: ensaio de difusão em ágar e ensaio de incorporação do vermelho neutro. Foram utilizados elásticos ortodônticos de duas diferentes marcas comerciais American Orthodontic (American Orthodontic, Sheboygon, USA) e Morelli (Sorocaba, São Paulo, Brasil). Os resultados conseguidos utilizando-se ambas metodologias demonstraram baixa citotoxicidade para os elásticos das marcas American Orthodontic e alta para marca Morelli. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que ambas metodologias podem ser utilizadas quando deseja-se testar elásticos ortodônticos.

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Rio de Janeiro – RJ – Brasil

E-mail
matheuspithon@bol.com.br

Palavras-chave: citotoxicidade, método de incorporação do corante vital, ensaio difusão em agar, cultura de células.

Abstract

The aim of this study was to compare two methodologies, evaluating in vitro the biocompatibility of intra-oral orthodontic elastics through cytotoxicity test in culture of HEp-2 cells (human larynx carcinoma), comparing two methodologies: diffusion in agar and incorporation of the neutral red assay. Orthodontic elastics of two different commercial labels were used: American Orthodontic (American Orthodontic, Sheboygon, the USA) and Morelli (Sorocaba, São Paulo, Brazil). The results using both methodologies demonstrated low cytotoxicity for American Orthodontic and for Morelli. In accordance with the results can be concluded that both methodologies can be used to test orthodontic elastics.

Key words: cytotoxicity; neutral red uptake methodology; agar diffusion test; cell culture.

Introdução

A biocompatibilidade dos materiais Odontológicos tem sido motivo de grande interesse nos dias atuais. Particularmente na área de Ortodontia, vários são os materiais que permanecem em contato com os tecidos orgânicos por períodos prolongados. Os elásticos intra-orais enquadram nesta situação. Seu contato com os tecidos orais estende-se por várias horas do dia ou mesmo por todo o dia por um longo período que varia de alguns dias até meses¹.

A biocompatibilidade dos materiais pode ser avaliada por testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* podem não representar a situação real de um material. Contudo, eles podem promover alguns tipos de resultados preliminares relacionados à interação entre o material e o corpo biológico, de forma rápida e eficiente, minimizando a necessidade de testes em animais².

Em decorrência de um controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica³, como os elásticos ortodônticos que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente⁴.

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares^{5,6}.

Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*³.

Como a variedade de materiais a serem avaliados tem crescido muito, há necessidade de se estudar novas metodologias e escolher entre elas a que possa responder melhor quanto à presença de possíveis elementos tóxicos⁷.

Baseado nessa premissa o objetivo do presente trabalho foi comparar duas metodologias, avaliando a toxicidade de elásticosliando a toxicidade de elásticos ortodônticos intraorais.

Materiais e Métodos

Cultura de células

Para a realização deste estudo, foi utilizada a cultura de células HEP-2 (carcinoma de laringe humana), mantidas em meio mínimo essencial de Eagle (MEM-Eagle) (Cultilab) acrescido de 0,03 mg/ml de glutamina (Sigma), 50 µg/ml de gamicina (Schering Plough), 2,5 mg/ml de fungizona (Bristol-Myers-Squibb), solução de bicarbonato de sódio a 0,25% (Merck), HEPES 10 mM (Sigma) e 10% de soro fetal bovino (Cultilab) (meio de crescimento) ou sem soro fetal bovino (meio de manutenção) e incubadas a 37°C por 48 horas.

Amostras de Elásticos

Tabela 1 - Grupos testados no experimento.

Grupo	Marca	Cor
1	American Ortodontics	Incolor
2	Morelli	Incolor

Previamente a realização dos experimentos as amostras de elásticos foram esterilizadas durante 30 minutos em radiação ultravioleta.

Toxicidade dos elásticos

Para a determinação da citotoxicidade dos elásticos ortodônticos foram utilizadas duas técnicas: a primeira, denominada "dye-uptake" (Neyndorff *et al.*, 1990), que se baseia na incorporação do corante vermelho neutro por células vivas; e a segunda a técnica de difusão em ágar^{1,8,9}.

Como controles para comparação de resultados, foram utilizados amálgama de cobre (Pratic NG2, Vigodent, Rio de Janeiro, Brasil) como controle positivo e, um fio de aço inoxidável (3M Unitek, Monrovia, EUA) como controle negativo.

Vermelho Neutro

Volumes de 100 µl de suspensão de células HEp-2 foram distribuídos em microplacas de 96 poços. Após 48 horas, o meio de crescimento foi substituído por 100 µl do meio de cultura (MEM-Eagle) obtido após incubação com diferentes elásticos durante 0 e 24 horas. Como controles positivo e negativo foram utilizados os meios de cultura obtidos após o contato com amálgama e fio de aço inoxidável, respectivamente. O experimento foi feito em quadruplicata.

Após 24 horas de incubação, foram adicionados 100µl de vermelho neutro a 0,01% (Sigma), em meio de cultura, em cada poço das microplacas e estas foram incubadas a 37°C por 3 horas para penetração do corante nas células vivas. Passado esse período, após desprezar o corante, foram adicionados 100µl de solução de formaldeído (Reagen) a 4% em PBS (NaCl 130 mM; KCl 2 mM; Na₂HPO₄ 2H₂O 6 mM; K₂HPO₄ 1mM, pH7,2) por 5 minutos, para promover a fixação das células às placas. Em seguida, para a extração do corante, foram adicionados 100µl de uma solução de ácido acético (Vetec) a 1% com metanol (Reagen) a 50%.

Após 20 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro (BioTek) em comprimento de onda de 492nm ($\lambda = 492$ nm).

A percentagem de células viáveis foi obtida através da comparação da média da densidade ótica (DO) do controle de células (sem contato com os elásticos) com as médias das DO obtidas do sobrenadante das culturas de

células que foram colocadas em contato com os elásticos nos diferentes tempos, sendo calculada a toxicidade para 50% das culturas de células (CC₅₀).

Uma vez obtido os valores da densidade óptica entre os grupos Controle de Célula (C.C), Controle positivo (C+), Controle negativo (C-), Grupo 1 e Grupo 2, os mesmos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente ao teste de Tukey para comparação do C.C com os demais.

Difusão em ágar

Para este teste, células HEp-2 foram cultivadas em placas de Petri de vidro (10 cm de diâmetro). Após atingir confluência, aproximadamente 10⁶ céls/ml, o meio de cultura foi substituído por uma mistura de MEM, duas vezes concentrado, e ágar a 3% e 3 amostras de cada elástico foram colocadas, cuidadosamente, sobre a camada de ágar. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas em ambiente contendo 5% de CO₂. Após esse período, as células foram fixadas com formaldeído a 4% em PBS e coradas com cristal violeta a 1% (Vetec), sendo medidos os halos de lise.

Os resultados foram computados em índices de resposta (Response Index: RI), de acordo com os parâmetros de Stanford¹⁰. 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 halo¹⁰ em que existe lise das células, demonstrando, assim, a proporção da área sem crescimento (Zona limite entre presença e ausência de crescimento celular), conforme as referências citadas na Tabela 1.

Tabela 2 - Índices de Resposta (RI), utilizados para avaliar o grau de citotoxicidade dos materiais, conforme os parâmetros indicados por Stanford¹⁰.

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	4 = 60 a 80% do halo com lise
5 = halo envolvendo a placa por inteiro	5 = acima de 80% de células com lise

Resultados

Vermelho Neutro

A leitura de densidade óptica do material realizada no espectrofotômetro foi comparada com a média do controle celular, considerada 100% de viabilidade celular no ensaio. Dessa forma os valores de viabilidade celular foram expressos em porcentagem como demonstrado na tabela 3.

Os resultados demonstraram ausência de diferenças estatísticas entres os grupos: controle de células (C.C), controle – (C-) e o Grupo 1 (p>.05). Diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre os grupos

C.C e C+ (p= .000), C.C e Grupo 2 (p= .000), C+ e C- (p= .000), C+ e Grupo 1 (p= .000), C+ e Grupo 2 (p= .000), C- e Grupo 2 (p= .000), Grupo 1 e Grupo 2 (p= .000).

O controle positivo apresentou toxicidade elevada com apenas 36,9% de células viáveis, já o controle negativo apresentou baixa citotoxicidade com 97,5% de células viáveis.

Com relação aos elásticos avaliados os resultados demonstraram baixa toxicidade dos elásticos do Grupo 1 com cerca de 90,3% de células viáveis e alta toxicidade do Grupo 2 com apenas 12,4% de células viáveis (Tabela 3).

Tabela 3 Valores médios da densidade óptica e porcentagem de células viáveis entre os grupos.

	Média D.O.	% Células Viáveis	Statistical Analysis*
C. Células	0.648	100	A
Controle +	0,165	36,9	B
Controle -	0.632	97,5	A
Grupo 1	0,636	90,3	A
Grupo 2	0,081	12,4	C

* Equal letters = absence of statistically significant difference (P> .05).

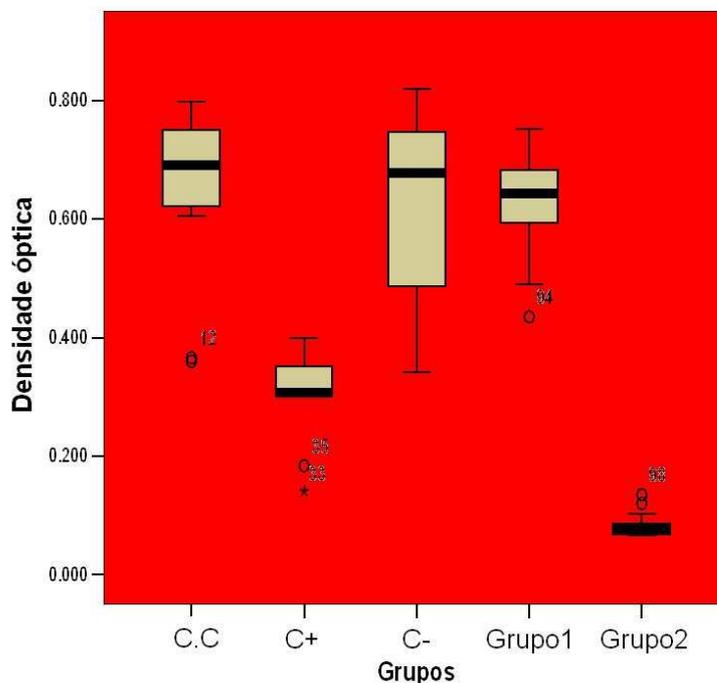


Figura 1 - Diagrama em caixas demonstrando os valores da densidade óptica entre os grupos.

Difusão em Agar

O controle positivo (Figura 2) apresentou RI=2/5, o que indica que gerou o halo menor que 0,5 cm de extensão da amostra e que ocorreu lise celular acima de 80%. Já o controle negativo (Figura 3) apresentou RI=0/0, indicando ausência de formação de halo e de lise celular (Quadro 1).

Com relação aos elásticos testados os resultados demonstraram RI de 0/0, para os da marca American Orthodontics (Figura 4) e de 4/5 para os da marca Morelli. Indicando que nesses ocorreram formação de halo maior que 1 cm e lise celular acima de 80% (Quadro 1).

Quadro 1 -Valores do RI encontrado para os grupos avaliados.

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



Figura 2 - Placa de Petri contendo o controle positivo (amálgama de cobre), após coloração.



Figura 3 - Placa de Petri contendo o controle negativo (fio ortodôntico de aço inoxidável), após coloração.

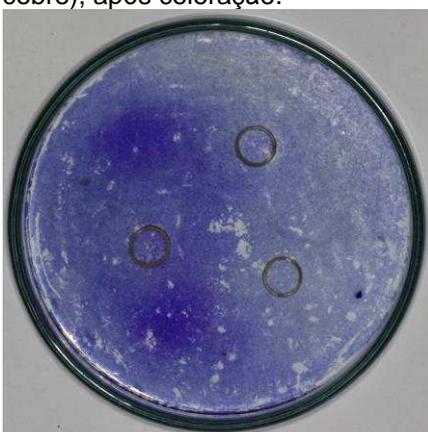


Figura 4 - Placa de Petri contendo os elásticos American Orthodontic, após coloração.

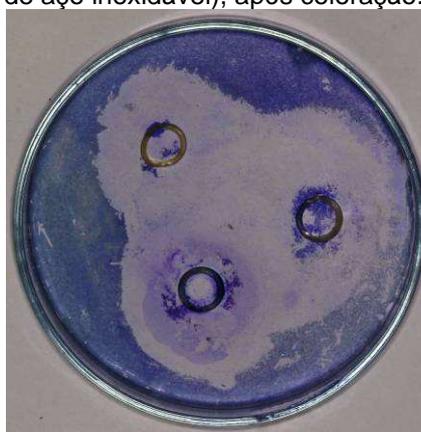


Figura 5 - Placa de Petri contendo os elásticos Morelli, após coloração.

Discussão

A utilização dos diversos tipos de materiais para a realização do tratamento Ortodôntico, podem provocar diferentes reações biológicas aos tecidos bucais, por causa das diferenças na composição⁴. Dessa forma os avanços da biotecnologia, definem a necessidade da investigação da biocompatibilidade, 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 moles¹.

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os elásticos ortodônticos que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.

Em virtude da total escassez na literatura a respeito de métodos que avaliem a citotoxicidade de elásticos ortodônticos, o presente artigo teve o propósito de comparar duas metodologias, empregadas corriqueiramente nas avaliações de materiais diversos de uso odontológico, que são a incorporação do corante vital vermelho neutro e através de difusão em ágar.

Os resultados obtidos quando da aplicação de ambas metodologias foram similares. O controle positivo e o negativo foram utilizados para verificar a eficácia do ensaio de citotoxicidade. O controle negativo utilizado foi o aço inoxidável o qual não causou dano nas células em cultura, o controle positivo utilizado foi o amálgama de cobre o qual causou dano celular. Em ambas metodologias os resultados foram similares em virtude de baixa citotoxicidade do fio ortodôntico em aço inoxidável e alta do amálgama.

Quando comparou-se os elásticos entre si observou-se baixa de citotoxicidade dos elásticos dos grupos 1 (American Orthodontic), através dos dois métodos. O grupo 2 (Morelli) por sua vez se mostrou altamente citotóxico, citotoxicidade essa superior ao do controle positivo.

Apesar de similaridade entre os resultados encontrados em ambas metodologias, observa-se maior especificidade com o uso do método da incorporação do vermelho neutro, uma vez que com esse pode-se quantificar os resultados e compara-los estatisticamente. O método de difusão em ágar apresenta resultados similares no entanto sem a especificidade do vermelho neutro.

É importante lembrar que os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas¹¹. Sendo assim, tanto os resultados destes testes quanto daqueles realizados em animais (secundários ou de aplicação) não podem ser de imediato extrapolados para as condições clínicas em seres humanos, porém são muito importantes pois determinam o comportamento biológico dos materiais e/ou de seus componentes¹¹.

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 das normas de biossegurança e a preocupação com as conseqüências locais e sistêmicas dos materiais dentários utilizados para tal. A avaliação quanto aos

possíveis efeitos citotóxicos devem ser verificadas a fim de se obter maior segurança quanto ao uso de um determinado material.

Conclusões

As duas metodologias são equivalentes e a escolha do método de ensaio mais adequado deve ser feita de acordo com o tipo de análise que deseja-se obter. Qualitativo quando utiliza-se o método de difusão em ágar ou quantitativo com o método da incorporação do vermelho neutro.

Referências Bibliográficas

1. Wigg MD, Menezes LM, Quintão CCA, Moreira TC, Chevitarese O. Extra buccal orthodontic elastic: citotoxicity evaluation. *Ortodontia Gaucha* 1997;1:151-7.
2. Daguano JKMF, Santos C, Rogero SO. Citotoxicity Analysis of Bioceramics for use in Systems of Implantations. *Revista Matéria* 2007;12:134-9.
3. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research* 2003;6:317-20.
4. Matta ENR, Calasans-Maia JA, Ruellas ACO, Wigg MD. Citotoxicity Evaluation in vitro of Orthodontic Elastic Showing Superficial Treatment. *J Bras Ortodon Ortop Facial* 2004;9:587-93.
5. Rogero SO, Souzabazzi A, Ikeda TI, Cruz AS, Fernandes KC, Higa OZ. Citotoxicidade in vitro das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* 2000;59:1-5.
6. 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.
7. Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. *Rev Odontol UNESP* 2004;33:65-8.
8. 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.
9. Moreira TC, Quintão CCA, Menezes LM, Wigg MD, Calasans-Maia JA. Plastic elastics: citotoxicity after sterilization. *Rev SBO* 1998;3:172-177.
10. Stanford JW. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent* 1980;30:140-188.
11. Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo. Artes Médicas; 2005.

Endereço para correspondência

Rua México, 78 - Recreio
Vitória da Conquista - Bahia,
CEP: 45020-390

Recebido em 20/10/2007

Aprovado em 27/02/2008