

## **Avaliação da citotoxicidade de elásticos ortodônticos intermaxilares**

Pithon, M.M.<sup>I,II</sup>; Santos, R.L.<sup>I,II</sup>; Oliveira, M.V.<sup>II</sup>; Mendes, G.S.<sup>III</sup>; Romanos, M.T.V.<sup>III</sup>

<sup>I</sup> Departamento de Ortodontia, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Av. Brigadeiro Trompowsky, s/n0, Cidade Universitária-Ilha do Fundão, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ.

e-mail: [matheuspithon@ufrj.br](mailto:matheuspithon@ufrj.br), <mailto:mlacerdaorto@hotmail.com>

<sup>II</sup> Departamento de Ortodontia, Universidade Federal de Alfenas - Unifal - Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Centro CEP 37130-000, Alfenas, MG.

e-mail: [marlio\\_vinicius@ig.com.br](mailto:marlio_vinicius@ig.com.br)

<sup>III</sup> Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Virologia, Av. Brigadeiro Trompowsky - CCS - bloco I - ss/ sala 064 Cidade Universitária 21941590, CP: 68040, Rio de Janeiro, RJ.

e-mail: [citooxicidade@zipmatil.com](mailto:citooxicidade@zipmatil.com), [teresa.romanos@micro.ufrj.br](mailto:teresa.romanos@micro.ufrj.br)

---

### **RESUMO**

O objetivo do presente trabalho é avaliar a citotoxicidade de quatro diferentes marcas comerciais de elásticos inter-maxilares intra-orais. Foram avaliados elásticos da American Orthodontics (Grupo 1), 3M Unitek (Grupo 2), Morelli (Grupo3) 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., Após 24 h, as monocamadas de células foram coradas e, em seguida, realizada uma avaliação dos halos de difusão e de lise celular. Os resultados demonstraram a ausência de citotoxicidade nos elásticos da marca American Orthodontic e 3M Unitek e alta citotoxicidade nos elásticos das marcas Morelli e Uniden. Com base nos resultados encontrados, através da metodologia utilizada, conclui-se que os elásticos da marca Morelli e Uniden são citotóxicos.

**Palavras-chaves:** citotoxicidade, elásticos, ortodontia.

---

### **Cytotoxicity evaluation of intermaxillary orthodontic elastics**

#### **ABSTRACT**

The objective of the present study is to evaluate the cytotoxicity of four different commercial brands of intermaxillary orthodontic elastics. Four commercial brands of elastics were evaluated: American Orthodontics (Group1), 3M Unitek (Group 2), Morelli (Group 3) and Uniden (Group 4).The elastics were previously sterilized with Ultraviolet light and placed in Petri dish which tissue culture HEp-2. After 24 hr, the monolayers of cells were ruddystained with violet crystal and followed by an evaluation of the diffusion halo and cells lyses. The results demonstrated no cytotoxicity for the American Orthodontic and the 3M Unitek elastics, and high cytotoxicity for Morelli and Uniden elastics. Based on the results found, supported by the methodology utilized, it was concluded that the Morelli and Uniden elastics present high cytotoxicity.

**Keywords:** cytotoxicity, elastics, orthodontics.

---

## **1 INTRODUÇÃO**

O látex tem sido amplamente utilizado desde o surgimento da Ortodontia como especialidade [1, 2]. Elásticos de látex são corriqueiramente utilizados nas diversas fases do tratamento ortodôntico, seja através da transmissão de força, para correção de mal posicionamento dentário, ou na fixação maxilo-mandibular após cirurgia ortognática [2].

Apesar da ampla aceitação e utilização desses materiais, existe dúvida quanto ao seu potencial tóxico ao organismo. Embora a toxicidade de muitos materiais odontológicos tenha sido amplamente investigada, a toxicidade de elásticos ortodônticos intermaxilares não foi extensivamente testada.

O aparecimento no mercado odontológico de novos produtos instiga à investigação da citotoxicidade desses [3, 4], com objetivo de obter informações à respeito de suas potencialidades tóxicas ou irritantes aos tecidos da cavidade bucal.

A toxicidade de um material pode ser avaliada através de testes *in vitro*, por experimentos em animais e/ou por estudos clínicos em humanos. Estudos *in vitro* são aplicados principalmente para avaliar a citotoxicidade (lesão em células) de um material dentário [5]. Comparando-se com experimentos em animais e estudos clínicos em humanos, as vantagens do estudo de toxicidade *in vitro* incluem: condições de experimento controladas, baixo custo, rapidez e ausência de problemas éticos [5].

Nos testes *in vitro*, entre as diversas metodologias, pode-se utilizar: avaliação da liberação de componentes, filtração em membrana Millipore e teste de difusão em ágar [6].

Desta forma, os autores deste trabalho propõem-se a avaliar a citotoxicidade de elásticos intermaxilares de quatro diferentes marcas comerciais, utilizando ensaio de citotoxicidade em cultura de células.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizaram-se amostras de elástico intermaxilar de diâmetros 5/16 das marcas American Orthodontic, 3M Unitek, Morelli e Uniden. Como controle positivo e negativo, utilizou-se amálgama contendo cobre (Dentsply, Brasil) (16,7 Ag<sub>3</sub>Sn + 37 Hg ) e fio de aço inoxidável diâmetro .019”x .025” (American Orthodontics, EUA), respectivamente.

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). As células foram cultivadas em monocamadas e empregadas no teste por difusão em ágar (agar overlay test), de acordo com a metodologia utilizada por Matta [7].

Os testes foram realizados em placas de Petri (Becton Dickinson, EUA) de 10 cm de diâmetro, às quais foram adicionadas uma suspensão de 10 ml de cultura de células HEp-2 em concentração de 10<sup>5</sup> células/ml, preparada em meio nutritivo de Eagle (meio mínimo essencial de Eagle = MEM-Eagle, Sigma, EUA), suplementado com 2% de soro fetal bovino (Cultilab, Brasil), com adição de glutamina (Sigma, EUA), gamicina (Schering Plough, Brasil) e fungizona (Bristol-Myers-Squibb, Brasil). Após a preparação da solução, as células foram incubadas a 37°C, durante 48 h, em ambiente com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após a constatação, em microscópio óptico invertido, de que as células estavam confluentes e formando uma monocamada em toda a extensão da placa, desprezou-se o meio nutritivo. Em seguida, adicionou-se, em cada placa 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 solução salina. A seguir, aguardou-se a solidificação, a qual ocorreu após 10-15 minutos.

Os elásticos a serem testados e os controles positivo (amálgama) e negativo (fio ortodôntico) foram previamente esterilizados por radiação ultravioleta, durante 10 min. Em cada placa, foram colocados três elásticos sobre a camada de ágar de forma cuidadosa para evitar ruptura da monocamada, mantendo equidistância entre os mesmos.

As placas de Petri foram identificadas e incubadas em estufa a 37°C, por 24 horas, em ambiente com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> [7]. Após este período, as monocamadas de células foram fixadas com formaldeído a 8% e coradas com cristal violeta, para então serem avaliados os tamanhos dos halos de difusão formados com auxílio de régua milimetrada e microscópio óptico invertido.

Os resultados foram computados em índices de resposta (Response Index: RI) de acordo com os parâmetros de Stanford [6]. O índice RI apresenta dois números separados por uma barra, o 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, a quantidade percentual do halo [6] em que existe lise das células. Desta forma, demonstra-se a proporção da área sem crescimento (zona limite entre presença e ausência de crescimento celular), conforme citadas na Tabela 1.

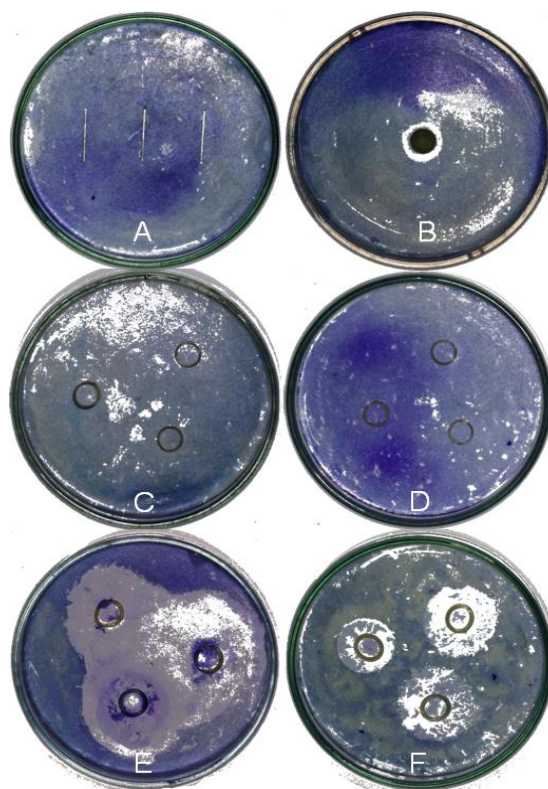
**Tabela 1:** Índices de Resposta (RI), utilizados para avaliar o grau de citotoxicidade dos materiais, conforme os parâmetros indicados por Stanford [6].

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	5 = acima de 80% de células com lise dentro do halo

### 3 RESULTADOS

O controle negativo (Figura 1 A) apresentou RI=0/0, indicando ausência de formação de halo e de lise celular. O controle positivo 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% (Figura 1 B).

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



**Figura 1:** Placas de Petri contendo: **A)** controle negativo (fio ortodôntico de aço inoxidável), após coloração; **B)** controle positivo (amálgama de cobre); **C)** grupo 1 (American Orthodontic); **D)** grupo 2 (3M Unitek); **E)** grupo 3 (Morelli); **F)** grupo 4 (Uniden).

## 4 DISCUSSÃO

O sucesso do tratamento ortodôntico 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 utilização de materiais dentários biocompatíveis.

Durante a realização do tratamento ortodôntico, a utilização dos diversos tipos de materiais não compatíveis pode provocar reações biológicas indesejadas aos tecidos bucais, por causa das diferenças na composição [7]. Segundo Schmalz [5], 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 acumulativo de substâncias tóxicas.

Biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de atuação do material, com uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma aplicação específica [5]. Uma reação adversa deste material é chamada de toxicidade [9]. Dessa forma, os avanços da biotecnologia definem a necessidade da investigação da biocompatibilidade, ou seja, da coexistência desses materiais manufaturados com tecidos corporais e fluidos que permanecem no organismo humano, por períodos de tempo variados, sem irritar os tecidos molares [8].

Para avaliar-se a compatibilidade biológica de um determinado material, existem os testes *in vivo* e os *in vitro*. Para este estudo, selecionou-se o teste *in vitro* através do ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar, utilizando-se uma linhagem de células epitelióides derivadas de carcinoma de laringe humano, por ser um sistema sensível e de fácil obtenção e cultivo. Os controles do teste de citotoxicidade, 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, 11].

No presente estudo, tanto o controle positivo quanto o negativo obtiveram resultados compatíveis com a literatura. O controle positivo apresentou certa citotoxicidade, devido ao mercúrio presente no amálgama, e o controle negativo apresentou-se totalmente citocompatível [7, 10-12]. 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 [12, 13], 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 [8].

Quando se comparou os elásticos entre si, observou-se ausência de toxicidade dos elásticos dos grupos 1 e 2 (American Orthodontic e 3M Unitek). Contudo, os elásticos do grupo 3 e 4 demonstraram alta toxicidade, sendo superior inclusive ao amálgama utilizado [8].

A citotoxicidade apresentada pelos elásticos da Marca Morelli confirma o relato anterior de Wigg [9], o qual comparou o elástico extra-bucais Morelli com o American Orthodontic.

Elásticos da Uniden também foram citotóxicos, embora em menor grau que o da Morelli.

A citotoxicidade observada para os elásticos nacionais (Morelli e Uniden) pode ser devido às variações que ocorrem na composição dos elásticos de látex [1], explicando a diferença de resultados obtidos em relação às marcas estrangeiras (American Orthodontic e 3M Unitek).

Estudos adicionais são desejados a fim de identificar o(s) composto(s) responsáveis pela toxicidade dos elásticos nacionais estudados.

## 5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir com a realização deste estudo que os elásticos das marcas American Orthodontic e 3M Unitek não mostraram citotoxicidade, ao contrário dos elásticos das Marcas Morelli e Uniden que apresentaram alta toxicidade.

## 6 BIBLIOGRAFIA

- [1] RUSSELL, K.A., MILNE, A.D., KHANNA, R.A., LEE, J.M., "In vitro assessment of the mechanical properties of latex and non-latex orthodontic elastics", *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 120, n. 1, pp. 36-44, July 2001.
- [2] HANSON, M., LOBNER, D., "In vitro neuronal cytotoxicity of latex and nonlatex orthodontic elastics", *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, v. 126, n. 1, pp. 65-70, July 2004.
- [3] DAGUANO, J.K.M.F., SANTOS, C., ROGERO, S.O., "Citotoxicity analysis of bioceramics for use in systems of implantations", *Revista Matéria*, v. 12, n. 1, pp. 134-39, Março 2007.

- [4] JORGE, J.H., GIAMPAOLO, E.T., PAVARINA, A.C., "Cytotoxicity of the dental materials. A literature review", *Revista Odontologia da UNESP*, v. 33, n. 8, pp. 65-8, Agosto 2004.
- [5] SCHMALZ, G., "Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations", *Journal of Dentistry*, v. 22, n. 2, pp. 6-11, Fevereiro 1994.
- [6] STANFORD, J.W., "Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials", *International Dentistry*, v. 30, n. 2, pp.140-188, Fevereiro 1980.
- [7] MATTA, E.N.R., CALASANS-MAIA, J.A., RUELLAS, A.C.O., WIGG, M.D., "Citotoxicity evaluation in vitro of orthodontic elastic showing superficial treatment", *Jornal Brasileiro de Ortodontia e Ortopedia Facial*, v. 9, n. 4, pp. 587-93, Agosto 2004.
- [8] ANUSAVICE, K.J., *Phillips, materiais dentários*, 11 ed., Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.
- [9] WIGG, M.D., MENEZES, L.M., QUINTÃO, C.C.A., MOREIRA, T.C., CHEVITARESE, O., "Extra buccal orthodontic elastic: citotoxicity evaluation", *Ortodontia Gaúcha*, v. 1, n. 3, pp.151-157, Maio 1997.
- [10] PACHECO, M.C.T., WIGG, M.D., CHEVITARESE, O., "Biocompatibilidade das soldagens ortodônticas", *Rev SOB*, v. 2, n. 4, pp. 233-238, Abril 1995.
- [11] MOREIRA, T.C., QUINTÃO, C.C.A., MENEZES, L.M., WIGG, M.D., CALASANS-MAIA, J.A., "Plastic elastics: citotoxicity after sterilization", *Revista SBO*, v. 3, n. 5, pp. 172-77, Junho 1998.
- [12] ROGERO, S.O., LUGÃO, A.B., IKEDA, T.I., CRUZ, A.S., "Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias", *Materials Research*, v. 6, n. 3, pp. 317-320, Abril/Junho 2003.
- [13] CRAIG, R.G., *Restorative dental materials*, 9 ed., SI Louis, Mosby Year Book, 1993