



“CITOTOXICIDADE DOS ELASTÔMEROS UTILIZADOS EM ORTODONTIA: ESTUDO In Vitro SOBRE VIABILIDADE CELULAR”

Autores:

Monique F Trevisan Doutoranda curso pós Graduação Odontologia ULBRA – Canoas –RS

Maria Perpetua M Freitas - Professora doutora do Programa do Curso de Pós graduação Odontologia ULBRA-Canoas / RS

Introdução: A biocompatibilidade dos materiais utilizados em Ortodontia ainda é questionável, especialmente em relação aos elastômeros. Baseado nisso, o objetivo desse estudo foi avaliar “in vitro” a citotoxicidade desses acessórios para fibroblastos de ratos (linhagem L929), comparando diferentes marcas comerciais e presença ou não de látex. **Metodologia:** Foram utilizados 54 corpos de prova, divididos em 9 grupos experimentais (n=6, cada), de acordo com as marcas comerciais: 3M Unitek®, American Orthodontic®, GAC®, Morelli®, RMO® e TP Orthodontic®. A viabilidade celular foi analisada através do teste com MTT, em 24h. Como controle negativo foi utilizado o crescimento celular e controle positivo, o hipoclorito de sódio a 1%. Os dados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Na análise intergrupos, em todos os tempos avaliados, houve diversidade em relação a citotoxicidade das marcas avaliadas e à presença do látex®. Após 24h, as marcas com látex mostraram toxicidade celular, todos os grupos com látex tiveram relativa melhora na viabilidade celular, exceto para o grupo RMO®, que mostrou redução acentuada. Para os sem látex, tanto a marca RMO® quanto a marca Morelli® tiveram redução nas médias, diferente daqueles da American Orthodontics® que se igualaram ao controle negativo. Na análise intragrupos, todas as marcas apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos. Nos grupos sem látex, a redução da viabilidade aconteceu em tempo mais prolongado, exceto para os da American Orthodontics®. **Conclusões:** Por fim, as médias para os grupos sem látex foram superiores ao grupo com látex, podendo sugerir que os elásticos sem látex tem menor citotoxicidade quando comparados aos com látex.

Palavras-Chave: Ortodontia, toxicidade, elastômeros.

INTRODUÇÃO

A biocompatibilidade de alguns materiais utilizados na clínica ortodôntica ainda é controversa, levando em consideração os efeitos citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos (Tells et al., 1988; Grimsdottir et al., 1992; Tang et al., 1999; Palosuo et al., 2002; Lobner e Asrari, 2002; Eliades et al. 2004; Santos et al., 2008; Santos et al., 2010(c)). Dessa forma, apesar da ampla utilização desses materiais, existem reservas, sendo a investigação da citotoxicidade dos mesmos particularmente importante para a obtenção de informações sobre o seu potencial tóxico e/ou irritante aos tecidos da cavidade bucal (Russel et al., 2001).

A toxicidade de muitos materiais odontológicos tem sido amplamente investigada, porém existem poucos estudos que abordam a toxicidade dos elastômeros utilizados na clínica ortodôntica (Lobner e Asrari, 2002; Kao, 2007(a); Santos et al., 2008; Santos et al., 2010(a); Santos et al., 2010(c)), especialmente no que diz respeito à influência da sua composição sobre a viabilidade celular.

Os elastômeros à base de látex são corriqueiramente utilizados nas diversas fases do tratamento ortodôntico (Santos et al., 2012), seja para correção do mau posicionamento dentário, fixação maxilo-mandibular após cirurgia ortognática, corrigir discrepâncias sagitais ou verticais, ou ainda, visando melhorar a intercuspidação e engrenamento dentário na fase final do tratamento (Russel et al., 2001; Hanson e Lobner, 2004; Lariato et al., 2006; Wang et al., 2007).

As reações alérgicas causadas por proteínas de látex têm sido bem documentadas, incluindo reações de hipersensibilidade imediata (Wakelin, White, 1999). Entre as reações alérgicas causadas por elastômeros ortodônticos, podem ser citadas inchaço, lesões eritematosas orais, reações respiratórias, e até mesmo choque anafilático. (Tomazic et al., 1992; Turjanmaa et al., 1996; Wakelin e White, 1999).

Baseado nestes achados e buscando elucidar questões acerca da biocompatibilidade dos elastômeros intraorais utilizados na clínica ortodôntica, este estudo visa testar a hipótese nula de que os elásticos intraorais utilizados em Ortodontia não são citotóxicos para fibroblastos de ratos.

O termo elastômero refere-se a materiais que retornam a sua configuração inicial após sofrerem consideráveis deformações (Baty et al., 1994).

"Elastômero" é o termo genérico dado a materiais de polímeros sintéticos. A borracha natural é também um elastômero, mas nem todos os elastômeros podem ser chamados de "borracha" (Fernandes et al., 2011), sendo substâncias compostas por várias moléculas que se repetem formando uma cadeia à parte das unidades fundamentais, que são denominadas monômeros (Miles e Briston, 1975).

Desde meados dos anos 80, a exposição ao látex de borracha natural na clínica odontológica aumentou significativamente com a utilização das luvas de procedimento, devido ao receio frente a transmissão de infecções virais, como por exemplo vírus HIV e hepatite (Hain et al., 2007).

Composição dos elastômeros

De acordo com o material de fabricação, existem dois tipos de elastômeros ortodônticos: os de borracha e os sintéticos. Os elastômeros de borracha, ou látex, são obtidos a partir da extração vegetal (Martins et al., 2006), provindo da seiva natural explorada diretamente da seringueira, após a retirada do líquido do látex. Sua conservação é obtida a partir da adição de conservantes

(normalmente a amônia) (Weiss e Hirshman, 1992) para alcançar as propriedades finais dos elásticos (Perrella e Gaspari 2002; Lobner e Asrari 2003), contendo somente 25% a 40% de hidrocarboneto de borracha (cis-1, 4 de poliisopreno) (Kanchana e Godfrey, 2000). Entretanto, faz-se importante enfatizar que o látex natural não está na categoria dos materiais considerados seguros (Holmes *et al.*, 1993; Schmalz 1994).

Posteriormente, com a pré-vulcanização, a produção de látex passou a envolver a mistura do látex de borracha natural, o mais puro e de mais alto peso molecular (Weiss e Hirshman, 1992), com estabilizadores, como o óxido de zinco e produtos químicos vulcanizados. A mistura é aquecida até a temperatura de 70°C (Perrella e Gaspari, 2002) para que ocorra a homogeneização entre esses componentes.

Os elastômeros sintéticos, também chamados de plásticos, são obtidos por meio de transformações químicas do carvão, petróleo e alguns álcoois vegetais (Henriques *et al.*, 2003). Sua composição química exata é uma informação não divulgada de cada fabricante (Martins *et al.*, 2006). A qualidade final destes materiais é determinada pelo nível da tecnologia, matérias-primas utilizadas na manufatura, bem como do controle de qualidade aplicado (Morton, 1995).

Biocompatibilidade dos elastômeros

Apesar de relatos de caso sobre a alergia ao látex não serem tão freqüentemente vistos na literatura, reações alérgicas têm sido relativamente prevalentes em relação aos produtos à base desse material. Em Odontologia, a maioria das reações alérgicas (Snyder e Settle, 1994) têm sido relacionadas com o uso de elastômeros ortodônticos (Neiburger, 1991).

De acordo com Cronin (1980), o látex natural é considerado não-alérgico, porém apresenta baixas propriedades mecânicas, portanto é necessário reforçá-lo. Durante este processamento é adicionado amônia, produzindo proteínas que são potencialmente alergênicas. A vulcanização é outro processo em que são adicionados os agentes químicos, tais como aceleradores e anti-oxidantes que também são alérgenos.

Para Pithon et al. (2009), a alergia ao látex natural ocorre devido à presença de muitos tipos de proteínas e o pó que cobre os elásticos ortodônticos funciona como um transportador para estas proteínas (Alavi et al., 2014). Portanto, o desenvolvimento de elásticos sem látex tornou-se cada vez mais importante para o uso clínico.

A prevalência de alergia borracha natural foi relatada como sendo inferior a 1% da população em geral e 5-15% em profissionais da saúde (Poley e Slater, 2000). Entre as reações alérgicas causadas por elastômeros ortodônticos intraorais podem ser observadas a presença de pequenas vesículas ou edema agudo e queixas de prurido e ardor, inchaço e estomatite, bem como lesões eritematosas, podendo evoluir para formas mais graves como reações respiratórias, e até mesmo choque anafilático (Everett e Hice, 1974; Tomazic et al., 1992).

A avaliação da biocompatibilidade dos materiais ortodônticos é de extrema importância, uma vez que elementos constituintes desses materiais estão relacionados a efeitos citotóxicos, genotóxicos e carcinogênicos. Dentre estes materiais, cita-se especialmente os elastômeros, uma vez que são amplamente utilizados na clínica ortodôntica, mantendo um contato direto com a mucosa, gengiva e dentes do paciente por um período de tempo prolongado (Santos et al., 2010(b)).

Para que um material seja considerado biocompatível, seu uso não deve exercer qualquer efeito tóxico sobre o organismo, sendo a determinação da citotoxicidade parte inicial dessa avaliação (Babich e Sinensky, 2001).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

A amostra foi composta por 54 corpos de prova de elastômeros intraorais (3/16), divididos em 9 grupos experimentais com n=6 cada, conforme Tabela I, incluindo as seguintes marcas comerciais: 3M Unitek® (Saint Paul-Minnesota, USA), American Orthodontic® (St. Louis-Illinois, USA), GAC® (Islandia-New York, USA), Morelli® (Sorocaba-São Paulo, Brasil), RMO® (Denver-Colorado, USA) e TP Orthodontic® (La Porte-Indiana, USA).

Como Controle Negativo (C-), foi utilizado o crescimento celular e, como Controle Positivo (C+), o hipoclorito de sódio a 1%.

Tabela I: Grupos experimentais.

	Tipo	Látex	Cor	N
CONTROLE (-)	Crescimento celular (Controle Negativo)	-	-	-
3M UNITEK®	Elástico Intra-oral(3/16)	Sim	Natural	6
American Orthodontic®	Elástico Intra-oral(3/16)	Sim	Natural	6
GAC®	Elástico Intra-oral(3/16)	Sim	Natural	6
Morelli®	Elástico Intra-oral(3/16)	Sim	Natural	6

RMO®	Elástico Intra-oral(3/16)	Sim	Natural	6
TP Orthodontic®	Elástico Intra-oral(3/16)	Sim	Natural	6
American Orthodontic®	Elástico Intra-oral(3/16)	Não	Transparente	6
Morelli®	Elástico Intra-oral(3/16)	Não	Transparente	6
RMO®	Elástico Intra-oral(3/16)	Não	Amarelo	6
CONTROLE (+)	Hipoclorito de sódio 1% (Controle Positivo)	-	-	-

Teste da Citotoxicidade

Cultura de Células

Fibroblastos de ratos da linhagem L929 foram cultivados em placas de 96 poços com uma densidade de 104 células/poço. As células foram mantidas em meio DMEM (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de gentamicina e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco®) a 37 °C em uma estufa (Sanyo®) sob uma atmosfera umedecida com 5% de CO₂ por um período de 24 horas.

Após esse período, o meio de cultura celular foi removido e substituído por 200µL do meio de cultura contendo os corpos de prova. Foi realizada avaliação no período de exposição ao meio em 24h. Como controle negativo, livre de toxicidade, foram realizados cultivos celulares e como controle positivo, usou-se de hipoclorito a 1%.

Avaliação da Viabilidade Celular

A cada poço foram adicionados 200 µL de uma solução de 10% de MTT numa concentração de 5 mg/mL. As células foram incubadas por quatro horas a 37 °C e 5% CO₂. Após esse período o sobrenadante foi removido e o MTT armazenado intracelular foi solubilizado por 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO), por 30 minutos à temperatura ambiente.

As Densidades Óticas (DO) foram medidas em 570 nm na leitora de ELISA (Biorad® Benchmark Microplate Reader, Hercules, USA) (Figura 3) e a viabilidade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{DO do grupo teste}}{\text{DO do grupo controle}} \times 100$$

Análise Estatística

Os dados foram analisados com o auxílio do programa SPSS® 17.0 (Statistical Package for the Social Sciences 15.0 for Windows -SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), utilizando os testes estatísticos não paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Com base nos resultados obtidos e após análise estatística pode-se observar que, em todos os tempos avaliados, houve diversidade em relação a citotoxicidade das marcas avaliadas e à presença do látex.

Nas primeiras 24h, a maioria das marcas que apresentavam látex em sua composição, TP®, Morelli®, 3M®, GAC® e American Orthodontics®, mostraram baixas médias de viabilidade celular, em ordem crescente, e conseqüentemente maior toxicidade celular, tendo inclusive valores inferiores ao (C+) ($p < 0,05$), diferente da marca RMO®, a qual teve seu resultado semelhante ao (C-), apresentando o maior valor de viabilidade celular (Tabela II).

Resultados semelhantes foram obtidos também para os grupos sem látex nas primeiras 24 horas, onde apenas o grupo RMO® foi semelhante ao (C-), mostrando satisfatória viabilidade celular, diferente das marcas American Orthodontics® e Morelli® que, apesar de apresentarem valores acima do (C+), ainda mostraram redução de viabilidade celular (Tabela III).

Tabela II. Comparação dos grupos entre as diferentes marcas em cada tempo avaliado para os elastômeros com látex.

Tempo	Marca	n	Mínimo	Máximo	Média	DP	p
24 hrs	RMO®	6	97,1	104,1	100,8^A	2,6	0,000**
	Controle Negativo	6	100,0	100,0	100,0^A	0,0	
	Controle Positivo	6	29,8	33,9	32,3^B	1,6	
	TP®	6	13,0	15,3	14,1^C	0,8	
	Morelli®	6	2,6	4,2	3,7^D	0,6	
	3M®	6	2,0	3,2	2,6^E	0,4	
	GAC®	6	0,9	2,9	1,6^F	0,8	
Am. orthodontics®	6	0,8	1,7	1,2^F	0,3		

DP – desvio-padrão

** significativo $p \leq 0,01$. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si

Tabela III. Comparação dos grupos entre as diferentes marcas em cada tempo avaliado para os elastômeros sem látex.

Tempo	Marca	n	Mínimo	Máximo	Média	DP	p
24 hrs	RMO®	6	98,1	104,2	100,2^A	2,2	0,001**
	Controle Negativo	6	100,0	100,0	100,0^A	0,0	
	Am. orthodontics®	6	68,0	79,6	74,3^B	4,8	
	Morelli®	6	42,2	60,9	51,9^C	7,0	
	Controle Positivo	6	29,8	33,9	32,3^D	1,6	

DP – desvio-padrão

** significativo $p \leq 0,01$.

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si

Ao comparar os grupos com e sem látex de cada marca comercial, pode-se observar que as médias para os grupos sem látex foram superiores ao grupo com látex, podendo sugerir que os elásticos sem látex tem menor citotoxicidade quando comparados aos com látex, exceto para o grupo RMO®, cujas medias foram semelhantes estatisticamente (Tabela IV).

Tabela IV. Comparação entre os grupos com e sem látex nos diferentes tempos.

Marca/Tipo	Tempo	Látex Sim		Látex Não		p
		Média	DP	Média	DP	
Am. orthodontics®	24 hrs	1,2	0,3	74,3	4,8	0,004**
Morelli®	24 hrs	3,7	0,6	51,9	7,0	0,004**
RMO®	24 hrs	100,8	2,6	100,2	2,2	0,631 ^{NS}

DP – desvio-padrão

** significativo $p \leq 0,01$

NS – não significativo

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pôde-se concluir que:

- Em todos os tempos avaliados, houve diversidade em relação a citotoxicidade das marcas avaliadas e à presença do látex;
- Nas primeiras 24h, a maioria das marcas com látex mostraram toxicidade celular, exceto a marca RMO®;
- As médias para os grupos sem látex foram superiores ao grupo com látex, podendo sugerir que os elastômeros sem látex tem menor citotoxicidade quando comparados aos com látex.

REFERÊNCIAS

- ALAVI S, TABATABAIE A R, HAJIZADEH F, ARDEKANI A H An In-vitro Comparison of Force Loss of Orthodontic Non-Latex Elastics. **Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences.** 2014;11(1):10-16.
- BABICH H, SINENSKY M C Indirect cytotoxicity of dental materials: study with Transwell inserts and the neutral red uptake assay. **Alternatives to Laboratory Animals.** 2001; 29(1):9-13.

BATY, D L, STORIE, D J, Von FRAUNHOFER, J A Synthetic elastomeric chains: a literature review. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** 1994;105(6):536-542.

Cronin E Contact dermatitis. Edinburg, UK: **Churchill Livingstone.** 1980; 219.

ELIADES T, PRATSINIS H, KLETSAS D, ELIADES G, MAKOU M Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloy. **Am J Orthod Dentofac Orthop.** 2004; 125(1): 24-29.

EVERETT F G, HICE T L Contact stomatitis resulting from the use of orthodontic rubber elastics: report of case. **J Am Dent Assoc.** 1974;88:1030-1.

FERNANDES D J, ABRAHÃO G M, ELIAS C N, MENDES A M Force Relaxation Characteristics of Medium Force Orthodontic Latex Elastics: A Pilot Study. **International Scholarly Research Network Dentistry.** 2011; 2:1-5.

GRIMSDOTTIR M R, HENSTEN-PETTERSEN A, KULLMANN A Cytotoxicity effect of orthodontic appliances. **Am. J. orthod. Dentofac. Orthop.** 1992; 14(1): 47-53.

HAIN M A, LONGMAN L P, FIELD E A, HARRISON J E Natural rubber latex allergy: implications for the orthodontist. **Journal of Orthodontics.** 2007;34:6-11.

HANSON M, LOBNER D In vitro neuronal cytotoxicity of latex and nonlatex orthodontic elastics. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** 2004; 126(1): 65-70.

HENRIQUES J F C, HAYASAKI S M, HENRIQUES R P Elásticos ortodônticos: como selecioná-los e utilizá-los de maneira eficaz. **J Bras Ortodon Ortop facial.** 2003; 48(8):471-475.

HOLMES J, BARKER M K, WALLEY E K, TUNCAY O C Cytotoxicity of orthodontic elastics. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** 1993;104:188–91.

KAO C T, DING S J, HE H, CHOU M Y, HUANG T H Cytotoxicity of orthodontic wire corroded in fluoride solution in vitro. **Angle Orthod.** 2007(a); 77:349-54.

LOBNER D, ASRARI M Neurotoxicity of dental amalgam is mediated by zinc. **J Dent Res.** 2002; 82:243-6.

LORIATO L B, MACHADO A W, Pacheco W Considerações Clínicas e Biomecânicas e elásticos em Ortodontia. **Rev Clin Ortod Dental Press.** 2006; 5(1): 44-57.

MARTINS M M, MENDES A M, ALMEIDA M A O, GOLDNER M T A, RAMOS V V F GUIMARÃES SS. Estudo comparativo entre as diferentes cores de ligaduras elásticas. **Dental Press Ortod Ortop Facial.** 2006; 11(4):81-90.

MILES D C, BRISTON J H **Tecnologia dos polímeros.** São Paulo. Ed Polígono, 1975: 1.ed. p.444.

MORTON M Rubber technology. **Londres: chapman & haall,** 1995: 3.ed. p. 638.

NEIBURGER E J A case of possible latex allergy. **J Clin Orthod.** 1991; 25: 559-60.

KANCHANA P, GODFREY K Calibration of force extension and force degradation characteristics of orthodontic latex elastics. **Am J Orthod Dentofac. Orthop.** 2000; 118:280-287.

PALOSUO T, ALENIUS H, TURJANMAA K Quantitation of latex allergens. **Methods.** 2002; 27:52-58.

PERRELLA F W, GASPARI A A Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. **Methods.** 2002; 27(1):77-86.

PITHON M M, SANTOS R L, MARTINS F O, ROMANOS M T V, ARAÚJO M T S Evaluation of the in vitro biocompatibility of orthodontic elastics. **Braz J Oral Sci.** 2009; 8(4):171-174.

POLEY G E JR, SLATER J E Latex allergy. **J Allergy Clin Immunol** 2000; 105(6): 1054-62.

RUSSEL 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. **Am J Orthod Dentofacial Orthop.** 2001;120(1):36-44.

SANTOS R L, PITHON M M, MARTINS F O, ROMANOS M T V, RUELAS A C O Cytotoxicity of Latex and Non-Latex Orthodontic Elastomeric Ligatures on L929 Mouse Fibroblasts. **Braz Dent J.** 2010(a); 21(3): 205-210.

SANTOS R L, PITHON M M, MARTINS F O, ROMANOS M T V, RUELLAS A C O Evaluation of the cytotoxicity of latex and non-latex orthodontic separating elastics. **Orthod Craniofac Res** 2010(b); 13:28–33.

SANTOS R L, PITHON M M, MARTINS F O, ROMANOS M T V Cytotoxicity of orthodontic elastics: In vitro investigation with on L929 mouse fibroblasts. **Braz J Oral Sci.** 2010(c); 9(3): 366-370.

SANTOS R L, PITHON M M, MARTINS F O, ROMANOS MTV. Cytotoxicity of separation orthodontic elastics. **Dental Press J Orthod.** 2012; 17(4):110-4.

SANTOS R L, PITHON M M, OLIVEIRA M V, MENDES G S, ROMANOS M T V, RUELLAS A C O Cytotoxicity of intraoral orthodontic elastics. **Braz J Oral Sci.** 2008; 24(7):1520-1525.

SCHMALZ G Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. **J Dent.** 1994; 22(2):6-11.

SNYDER H A, SETTLE S The rise in latex allergy: implications for the dentist. **J Am Dent Assoc.** 1994; 125(8):1089-97.

TANG A T H, LIU Y, BJORKMAN L, EKSTRAND J In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. **Am J Orthod Dentofac. Orthop.** 1999; 116(2): 132-138.

TELL R T, SYDISKIS R J, ISAACS R D, DAVIDSON W M Long-term cytotoxicity of orthodontics direct-bonding adhesives, **Am J Orthod Dentofac.Orthod.**, 1988; 93:419-422.

TOMAZIC V J, WITHROW T J, FISHER B R, DILLARD S F Latex-associated allergies and anaphylactic reactions. **Clin Immunol Immunopathol.** 1992; 64: 89-97.

TURJANMAA K, ALENIUS H, MAKINEN-KILJUNEN S, REUNALA T, PALOSUO T Natural rubber latex allergy. **Allergy** 1996; 51:593-602.

WAKELIN S H, WHITE I R Natural rubber latex allergy. **Clin Exp Dermatol** 1999; 24:245-248.

WANG T, ZHOU G, TAN X, DONG Y Evaluation of Force Degradation Characteristics of Orthodontic Latex Elastics in Vitro and in Vivo. **Angle Orthod.** 2007; 77(4):688-693.

WEISS M E, HIRSHMAN C A Latex allergy. **Can J Anaesth.** 1992; 39(6):528-32.

FIGURAS



Figura 1: Elastômeros ilustrando uma das marcas utilizadas no estudo.

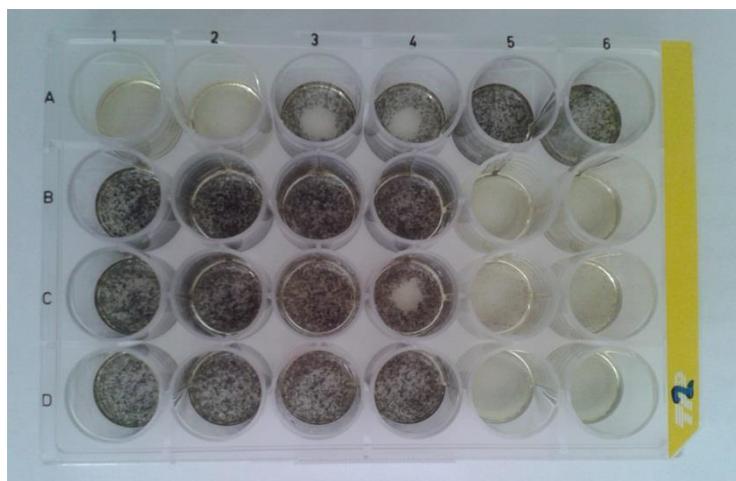


Figura 2: Placa após a retirada dos corpos de prova, ilustrando os poços e características de cada grupo em relação aos grupos controle, antes da leitura com MTT.



Figura 3: Leitora de ELISA utilizada para a análise da viabilidade celular.