

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

NÚCLEO DE PESQUISA EM ORTODONTIA E ODONTOPEDIATRIA

CARLOS EDUARDO PELINSON TOLEDO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE FIOS
ORTODÔNTICOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-graduação em Saúde, área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde Brasileira.

Orientador: Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA

FEVEREIRO – 2012

Carlos Eduardo Pelinson Toledo

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE FIOS
ORTODÔNTICOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde do Programa de Pós-graduação em Saúde, área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovada em: 14/02/2012.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Jonas Capelli Júnior – Doutor em Ortodontia – UERJ

Prof. Dr. Marco Abdo Gravina – Doutor em Ortodontia – UFJF

Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral – Doutor em Ortodontia – UFJF

JUIZ DE FORA

2012

A VIVIANE, minha esposa,
por todo amor, carinho e
compreensão.

Ao CAIO, nosso filho,
pela alegria e graça
que nos oferece.

AMO VOCÊS.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Maria Inês,
a minha sincera homenagem.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas, agradeço os ensinamentos de vida aprendidos em todos os momentos.

Ao meu orientador e coordenador do Núcleo de Pesquisa em Ortodontia e Odontopediatria do PPgS/UFJF Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral, pelos exemplos de caráter e de dedicação profissional e, também, pela oportunidade oferecida a mim para a execução deste trabalho.

À minha co-orientadora coordenadora do Núcleo de Pesquisa em Imunologia do PPgS/UFJF Profa. Dra. Ana Paula Ferreira, pela disponibilidade e orientação durante o desenvolvimento do experimento.

À estimada Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Souza, professora visitante do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia por sua gentileza, atenção, disponibilidade no trabalho dentro do Laboratório de Imunologia/ICB – UFJF.

Ao Prof. Dr. Luiz Cláudio Ribeiro, do Departamento de Estatística, da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo tratamento estatístico.

Ao Prof. Marcelo Reis Fraga, pessoa amiga e companheira, pelo exemplo de serenidade e pelas ajudas nas versões deste trabalho para o inglês.

Aos Professores Marco Abdo Gravina e Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira pelos ensinamentos compartilhados e atenções dispensadas.

Aos colegas Rodrigo César Santiago, Marcio José da Silva Campos e Sérgio Luiz Mota Júnior pelos exemplos de dedicação e pertinácia na Ortodontia.

À colega Sandra Bertelli Ribeiro de Castro pela ajuda substancial dada no Laboratório de Imunologia para a execução do ensaio *in vitro*.

À Ângela Maria de Oliveira Delgado, secretária do curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFJF, pela eficácia e acolhida carinhosa.

Aos colegas do curso de Especialização pelos bons momentos compartilhados.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a elaboração deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“A mente que
se abre a uma nova ideia
jamais voltará
ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

O ambiente bucal é particularmente favorável à biodegradação de metais devido às suas propriedades iônicas, térmicas, microbiológicas e enzimáticas. Estudos têm demonstrado que íons metálicos podem ser liberados de matérias metálicas como resultado da corrosão. Outros apontam que o Níquel é um componente comum em muitos materiais ortodônticos e uma alergia ao Níquel é comumente observada na população. Juntamente com os testes de citotoxicidade tradicionais, o estudo da produção celular de Óxido Nítrico (NO) estimulado por determinado material é um método capaz de avaliar seu potencial citotóxico. O presente estudo teve como objetivo avaliar pelo método MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio brometo] a viabilidade celular de macrófagos murinos J774 na presença de 9 diferentes fios ortodônticos e o estímulo dos fios à produção de NO produzido por estas células. A avaliação das culturas celulares foi realizada em três intervalos de tempo: 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular em todos os grupos foi maior no intervalo de tempo final, que no intervalo de tempo inicial. Este aumento foi significativo no grupo controle. Nos grupos dos materiais, a média final da viabilidade celular no tempo de 72 horas não mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo controle. A produção de NO em todos os grupos foi maior no intervalo de tempo final, que no intervalo de tempo inicial. Este aumento foi estatisticamente significativo no grupo controle. Nos grupos dos materiais, a média final da produção de NO apresentou diferença significativa apenas no grupo 8 (beta-Titânio), quando comparado com o grupo controle. Numa segunda etapa do estudo os macrófagos foram ativados com interferon-gama

(IFN- γ) procurando simular uma condição comum no organismo humano no qual estas citocinas são produzidas e liberadas frente à presença de antígenos. As médias da análise da viabilidade celular dos macrófagos murinos ativados com interferon-gama nos grupos dos fios ortodônticos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparada com a média das células do grupo controle. As médias da análise da produção de óxido nítrico pelos macrófagos murinos ativados com interferon-gama nos grupos dos fios ortodônticos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparada com a média das células do grupo controle.

Palavras-chave:

1 – Fios ortodônticos

3 – Óxido Nítrico

2 – Citotoxicidade

4 – Viabilidade

5 – Interferon-gama

SUMMARY

The oral environment is particularly favorable to metal biodegradation due to its ionic, thermal, microbiological, and enzymatic properties. Studies have shown that metal ions may be released from metallic materials as the result of corrosion. Other studies demonstrate that Nickel is a common component in many orthodontic materials and that an allergy to Nickel is commonly observed in the population. In addition to the traditional cytotoxicity tests, the study of nitric oxide cellular production stimulated by a specific material has shown to be a reliable tool for evaluating its cytotoxic potential. The present study was aimed at assessing cellular viability by MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay in a murine macrophage cell line J774 in the presence of 9 different orthodontics wires and quantify nitric oxide production by these cells. Evaluation of cell culture was undertaken in three time intervals: 24, 48 and 72 hours. The cellular viability in all groups was higher at the final time interval than at the initial time interval. This increase was statistically significant in the control group. In the material groups, the final mean of cellular viability at 72 hours showed no statistically significant difference when compared with the control group. NO production in all groups was higher at the final time interval than at the initial time interval. This increase was statistically significant in the control group. In the material groups, the final mean of NO production at 72 hours was only significant in group 8 (beta-Titanium) when compared with the control group. In a second step of the study, macrophages were activated with gamma interferon (IFN- γ) in order to stimulate a common condition of the human body in which these cytokines are produced and released with the

presence of antigens. The means of the analysis of cell viability of murine macrophages activated with gamma interferon in the groups of orthodontic wires did not show statistically significant difference when compared to the mean of cells in the control group. The means of the analysis of NO production by the murine macrophages activated with gamma interferon in the groups of orthodontic wires did not show statistically significant difference when compared to the mean of cells in the control group.

Key words:

1 – Orthodontics wires

3 – Nitric Oxide

2 – Cytotoxicity

4 – Viability

5 – Interferon-gama

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EDRF	Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio
eNOS	Óxido Nítrico Sintase endotelial
IFN-γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina 1
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio-bromídico
NiTi	Níquel-Titânio
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
TMA	<i>Titanium Molybdenum Alloy</i>
TNFγ	Fator de Necrose Tumoral gama

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

RESUMO

SUMMARY

ABREVIATURAS

1 – QUALIFICAÇÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

RESUMO

1.1 INTRODUÇÃO 18

1.1.1 Revisão bibliográfica 20

1.1.1.1 Fios Ortodônticos 29

1.1.1.1.1 Fios Ortodônticos de Aço Inoxidável 30

1.1.1.1.2 Fios Ortodônticos de Níquel-Titânio 31

1.1.1.1.3 Fios Ortodônticos de Beta-Titânio	34
1.1.1.1.4 Fios Ortodônticos Estéticos	35
1.1.1.2 Óxido Nítrico: propriedades gerais	35
1.1.1.3 Óxido Nítrico: citotoxicidade e ativação celular	41
1.1.1.4 Óxido Nítrico e Odontologia	44
1.1.2 Objetivos	47
1.2 MATERIAL E MÉTODO	48
1.2.1 Material	48
1.2.2 Método	49
1.2.2.1 Esterilização dos Materiais	49
1.2.2.2 Cultura Celular das Linhagens de Macrófagos Murinos J774	49
1.2.2.3 Cultura Celular na presença dos Fios Ortodônticos sem estímulo de Interferon-gama (IFN- γ)	50
1.2.2.4 Cultura Celular na presença dos Fios Ortodônticos com estímulo de Interferon-gama (IFN- γ)	51
1.2.2.5 Determinação da Viabilidade Celular pelo Método de MTT	51
1.2.2.6 Dosagem do Óxido Nítrico pelo Método de Griess	52
1.2.2.7 Análise Estatística	52

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
2 ARTIGOS	67
2.1 ARTIGO 1	68
2.1.1 Artigo 1: Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 na presença de fios ortodônticos. (Parte I)	68
2.2 ARTIGO 2	90
2.2.1 Artigo 2: Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 estimulados com interferon-gama (IFN- γ) na presença de fios ortodônticos. (Parte II)	90

1 – QUALIFICAÇÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

CARLOS EDUARDO PELINSON TOLEDO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE FIOS ORTODÔNTICOS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774

Trabalho aprovado para obtenção de qualificação no Curso de Mestrado em Saúde Brasileira pela seguinte banca examinadora:

- Orientador:** Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral
Mestre e Doutor em Ortodontia, UFRJ/RJ
Departamento de Odontologia Social e Infantil, UFJF/MG
- Examinador Interno:** Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ferreira
Mestra e Doutora em Imunologia, USP/SP
Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia,
UFJF/MG
- Examinador Externo:** Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Souza
Mestra em Genética e Biologia Molecular, UFRGS/RS
Doutora em Imunologia Básica e Aplicada, USP/SP
Departamento de Patologia, UFU/MG

Juiz de Fora

09 de dezembro de 2009

RESUMO

Desenvolver e selecionar materiais biocompatíveis têm sido um dos grandes desafios na área da saúde. Reações tóxicas, inflamatórias, alérgicas ou mutagênicas são possíveis respostas biológicas aos materiais e a toxicidade é um dos principais parâmetros para a avaliação biológica. A Ortodontia, com o objetivo de promover movimentações dentárias, utiliza um conjunto de materiais e, dentre eles, os fios ortodônticos. Estes acessórios, disponíveis nas formas metálicas, plásticas ou cerâmicas, estão fixados à superfície dos dentes e em contato direto com os tecidos e com o meio bucal, um ambiente úmido que pode modificar as propriedades dos mesmos. Alterações nas propriedades dos materiais no meio bucal podem ter efeitos nocivos nos tecidos adjacentes, levando ao desenvolvimento de processos inflamatórios. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade de diferentes tipos de fios ortodônticos em células da linhagem de macrófagos murinos J774 através da técnica do MTT, para averiguação da viabilidade celular, assim como a produção de óxido nítrico determinada pela ativação dos macrófagos.

Palavras-chave:

1 – Fios Ortodônticos

3 – Óxido Nítrico

2 – Citotoxicidade

4 – Viabilidade

5 – MTT

1.1 INTRODUÇÃO

Manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente é o objetivo primordial da Odontologia, seja pela prevenção de doenças, pelo alívio da dor, pela melhoria da eficiência mastigatória, pelo aprimoramento da fonética e/ou pela melhora da aparência. Muitos desses objetivos pedem a reposição ou alteração da estrutura dentária existente, assim como a alteração do posicionamento dos dentes. Desenvolver e eleger materiais biocompatíveis têm sido um dos principais desafios. Metais, cerâmicas, polímeros e resinas compostas são os quatro grupos de materiais empregados em Odontologia. Escassa informação científica a respeito desses materiais está disponível, até meados do século passado. Possíveis respostas biológicas aos materiais são reações tóxicas, inflamatórias, alérgicas ou mutagênicas. 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 é a toxicidade, sendo hoje o primeiro teste de triagem usado para quase todos os materiais (ANUSAVICE, 2005).

A Ortodontia usa distintos tipos de materiais qualificados como materiais restauradores temporários: fios, bandas, bráquetes, resinas acrílicas, cerâmicas entre outros. Estes são destinados à aplicação por um período médio ou longo (MOCKERS, DEROZE e CAMPS, 2002). Os fios ortodônticos são submetidos a um ambiente bucal úmido que pode modificar as suas propriedades (PROFFIT, 1995; MOCKERS, DEROZE e CAMPS, 2002). Qualquer um desses materiais na cavidade bucal cria uma interface dinâmica com interações que podem alterar um ou outro, determinando tanto a

biocompatibilidade – uma resposta biológica ativa ao material, quanto uma capacidade de o material resistir à deterioração ou sofrer corrosão no corpo. A biocompatibilidade é dependente da liberação de elementos desses materiais. Além disso, a liberação de tais elementos é influenciada pela composição, pré-tratamento e manuseio desses aparatos (SJÖGREN, SLETTEN e DAHL, 2000; ANUSAVICE, 2005).

O ambiente bucal possui as condições favoráveis para a colonização de um amplo número de microrganismos. A instalação do aparelho ortodôntico institui a ambientação favorável para o acúmulo de resíduos alimentares e desses microrganismos, os quais podem provocar cárie, acentuar quaisquer doenças periodontais pré-existentes e o efeito tóxico desses artifícios pode colaborar para uma generalizada gengivite. Além da presença de diferentes citocinas, no microambiente da doença periodontal, tem sido observada a produção de NO, o qual age diretamente na manutenção da inflamação, bem como na destruição tecidual (GRIMSDOTTIR e HENSTEN - PETERSEN, 1993; BATISTA, 2001; ANHOURY *et al.*, 2002).

Aparelhos ortodônticos são crescentemente usados por jovens e adultos; porém, a prática clínica tem mostrado que a presença em longo prazo de metais no ambiente bucal pode ser prejudicial à saúde. Ulcerações na mucosa causadas por aparelhos ortodônticos, irritações severas, alergias ao Níquel e especialmente as associadas às soldas têm sido relatadas (KVAM *et al.*, 1989; BISHARA, 1995b; MARIGO *et al.*, 2003; RAHILLY e PRICE, 2003; KALIMO *et al.*, 2004; SAGLAM, BAYSAL e CEYLAN, 2004; SCHULTZ *et al.*, 2004).

Noble *et al.* em 2008 afirmaram que o Níquel é um componente comum em muitos materiais ortodônticos e uma alergia ao Níquel é comumente observada na população, mais frequentemente em mulheres, e descreveram dois casos de alergia ao Níquel em pacientes ortodônticos. No entanto, há evidências de que a exposição bucal ao Níquel pode induzir tolerância imunológica a ele e assim, reduzir a incidência de alergias (VREEBURG *et al.*, 1984; VAN HOOGSTRATEN *et al.*, 1991; VAN HOOGSTRATEN *et al.*, 1993; ARTIK *et al.*, 2001; MORTZ *et al.*, 2002).

Investigações prévias foram feitas sobre a biocompatibilidade dos aparelhos ortodônticos utilizando células animal (GRIMSDOTTIR, HENSTEN-PETTERSEN e KULLMANN, 1992; MOCKERS, DEROZE e CAMPS, 2002), fibroblasto gengival humano (ELIADES *et al.*, 1994; LOCCI *et al.*, 2000) e osteoblastos, fibroblastos e ceratinócitos humanos (SESTINI *et al.*, 2006).

Desta forma, a avaliação da citotoxicidade dos fios ortodônticos, usados atualmente na clínica ortodôntica é de vital importância, a fim de detectar prováveis efeitos danosos desses aparatos ao meio bucal.

1.1.1 Revisão bibliográfica

Metais e ligas têm uma extensa gama de aplicações como materiais protéticos em ortopedia e odontologia. Historicamente, ligas metálicas preciosas foram as primeiras a serem usadas. Elas têm alta concentração em Ouro e Platina, com a característica de serem inalteráveis e biocompatíveis, como também, sendo fácil de trabalhar (NIEMI e HENSTEN-PETTERSEN, 1985; JOHANSSON, LUCAS e LEMONS, 1989; ZIMMERMANN,

SCHIRRMACHER e BENKE, 1991). Mais tarde, o uso de ligas semipreciosas como a Prata e Paládio e ligas não preciosas principalmente de Níquel, Cromo, e Cobre tornou-se difundidas. As propriedades mecânicas e físicas satisfatórias destes não preciosos materiais têm os feito como materiais de escolha para a ortodontia. Porém, desde que o ambiente bucal é particularmente favorável para a biodegradação de metais devido a suas propriedades iônicas, térmicas, microbiológicas e enzimáticas, pode ser presumido que o paciente está até certo ponto exposto a produtos do processo de corrosão. Várias investigações têm demonstrado que íons metálicos podem ser liberados de materiais metálicos como o resultado da corrosão (DOBBS e MINSKI, 1980; BARRETT, BISHARA e QUINN, 1993; GRIMSDOTTIR, HENSTEN-PETTERSEN e KULMANN, 1994; WATAHA, MALCOLM e HANKS, 1995; STAFFOLANI *et al.*, 1999).

Como outros campos da biotecnologia, a área dos materiais odontológicos apresenta o problema da biocompatibilidade, isto é, da coexistência dos materiais manufaturados com tecidos corporais e fluidos que devem permanecer no organismo humano por períodos de tempo variados, sem irritar os tecidos moles. Raros materiais odontológicos, ou talvez nenhum, são integralmente inertes do ponto de vista fisiológico, pois contém uma variedade de componentes com potencialidades tóxicas ou irritantes (PHILLIPS, 1993; TSUCHIYA *et al.*, 1994). Biocompatibilidade significa que os tecidos do paciente que entram em contato com os materiais não devem sofrer qualquer reação tóxica, irritante, inflamatória, alérgica, mutagênica ou carcinogênica (ARVIDSON, COTTLER-FOX e FRIBERG, 1986; JACOBSEN

e HENSTEN-PETTERSEN, 1989; VAHEY, SIMONIAN e CONRAD, 1995; SUN, WATAHA, HANKS, 1997). No campo da odontologia, a ortodontia é a especialidade em que o problema de biocompatibilidade é a mais aparente, uma vez que os pacientes são geralmente jovens e, então, mais suscetíveis a desenvolver reações inflamatórias, como também por causa do uso de ligas com possível efeito tóxico (GRIMSDOTTIR, HENSTEN-PETTERSEN, KULMANN, 1994; WATAHA, MALCOLM e HANKS, 1995). Convencionalmente, biocompatibilidade equivale à ausência de interação entre um material e os tecidos, sendo, atualmente, considerada a capacidade de atuação do material com uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma aplicação específica (WATAHA, 2001). Essa qualidade depende da sua composição, posição e interação com a cavidade bucal, ou seja, se liberam seus componentes e se estes são tóxicos, imunogênicos ou mutagênicos (CRAIG, 1993). Interações com sistemas biológicos complexos ocorrem quando um material é colocado em um tecido vivo. Essas resultam em algum tipo de resposta biológica e dependem do material, do hospedeiro e das forças e condições colocadas sobre o material. De qualquer maneira, o material afeta o hospedeiro e vice-versa (LEMONS, 1990; WATAHA, 2001).

Embora as reações adversas com materiais odontológicos sejam raras, elas podem ser locais ou sistêmicas e acontecer com todos os tipos de materiais. Contudo, o número de reações adversas nem sempre é totalmente relatado ou apurado, sendo imperativo um maior número de documentação e estudos (HENSTEN-PETTERSEN, 1998; HENSTEN-PETTERSEN, JACOBSEN e GRIMSDOTTIR, 2001).

A *International Organization Standardization (ISO)* e o *Council on Dental Materials, Instruments and Equipment of the American Dental Association* recomendaram o uso de uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo* para estudar a biocompatibilidade dos materiais, uma vez que se acreditava que nenhum teste seria apropriado para definir biocompatibilidade. A maior categoria de testes para avaliação de materiais, de acordo com estas normatizações, é o teste de citotoxicidade. Esforços têm sido feitos para definir e controlar as variáveis que afetam estes testes (HANKS, WATAHA e SUN, 1996). As reações biológicas em se tratando de materiais odontológicos são divididas em: tóxicas, inflamatórias, alérgicas e mutagênicas. A toxicidade foi a primeira resposta estudada, já que os materiais podem ser capazes de liberar substâncias para o corpo dos pacientes. A inflamação é um segundo tipo fundamental de uma intrincada resposta biológica envolvendo a ativação do sistema imune do hospedeiro e que pode resultar de alergias, de toxicidade ou pode ainda, preceder esse processo (ANUSAVICE, 2005).

A citotoxicidade é um fenômeno complexo *in vivo*, o qual pode resultar em um amplo espectro de efeitos, desde a morte celular até anomalias metabólicas, onde ocorrem alterações funcionais ou em alguma via específica. O efeito citotóxico é causado por um irritante primário e as reações podem variar de um eritema a necroses, dependendo da toxicidade do irritante primário, da sua concentração e do tempo de exposição (GRIMSDOTTIR e HENSTEN-PETTERSEN, 1993). A primeira etapa para assegurar a biocompatibilidade de um dispositivo médico é testar a citotoxicidade e pode ser medida através de três tipos de testes: *in vitro*, utilizando-se culturas de

células, *in vivo*, utilizando-se experimentos em animais e através de estudos clínicos. Um resultado negativo para o teste de citotoxicidade *in vitro* sugerirá que o material estará livre de produtos danosos ou que sua quantidade é insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas do corpo. Porém, apesar do mérito do teste, não podemos afirmar que o material pode ser considerado biocompatível, uma vez que o esse teste de citotoxicidade é o primeiro passo para análise do material em estudo. Por outro lado, um teste de citotoxicidade *in vitro* positivo pode ser um sinal que o material contém uma ou mais substâncias tóxicas que podem apresentar importância clínica (WATAHA, 2001; SCHMALZ, 2002).

Em tubos de ensaio, placas de cultura celular ou em outro local fora do organismo vivo são feitos os testes *in vitro*. Estes são muito variados e geralmente células ou bactérias são deixadas em contato com o material estudado. O efeito do material normalmente é determinado pela mensuração do número, pela média de crescimento, pela função metabólica, ou outra função das células expostas aos materiais (WATAHA, 2001). Os sistemas biológicos usados nos testes de citotoxicidade *in vitro* podem ser de culturas de órgãos, cultura de células ou organelas. O sistema de cultura celular é o mais utilizado para os testes em materiais odontológicos; algumas experiências têm utilizado cultura de órgãos (germes dentários). A cultura de células se refere àquela derivada de células dispersas retiradas do tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular já estabelecida em cultura por desagregação enzimática, mecânica ou química. Esses testes são vantajosos porque permitem uma padronização da metodologia, são controláveis

experimentalmente, são rápidos e relativamente baratos e simples. Eles são tidos como éticos e legais podendo substituir experimentos em animais e seres humanos nas pesquisas e, devido ao fato de serem feitos longe do contato com o organismo, muitas interações complexas, que mascaram a resposta biológica no corpo, estão ausentes. Por conseguinte, os resultados dos testes *in vitro*, em relação ao material, podem ser mal conduzidos na resposta biológica final (SCHMALZ, 1994; WATAHA, 2001).

O contato entre célula e material pode ser por contato direto, indireto ou através da diluição de extrato. As células crescem ao lado ou sobre o material testado no contato direto. Material e células são separados por uma barreira permeável (discos de dentina, filtro de Millipore, camada de ágar) no contato indireto. Por sua vez, na diluição de extratos, os corpos de prova de dimensões padronizadas (inteiros ou fragmentados) são mantidos em contato com o meio de cultura e este contendo o extrato do material é colocado sobre as células ao invés do próprio material (SCHMALZ, 1994; COSTA e SOUZA, 2005). A citotoxicidade avaliada em culturas celulares pode ser determinada através de avaliação qualitativa ou quantitativa. Através da microscopia celular é realizada a avaliação qualitativa: são observadas mudanças na morfologia geral das células, vacuolização, destacamento, lise celular ou de membrana, e, o resultado é numérico (ex. 0, 1, 2, 3) ou pode ser descrito como atóxico, leve, moderado ou severo com relação à citotoxicidade. A avaliação quantitativa mede a morte celular, a proliferação celular ou a formação de colônias celulares. Meios objetivos quantificam o número de células, a quantidade de

proteínas, a liberação de enzimas, a liberação ou redução de corante vital ou algum outro parâmetro de medida (ROGERO *et al.*, 2003).

Diversos protocolos, incluindo ensaio de *Trypan Blue*, liberação de Cromo, avaliação da síntese de DNA, avaliação do metabolismo celular (MTT assay), microscopia eletrônica de varredura (MEV), têm sido utilizados nos testes de viabilidade e citotoxicidade de materiais. O ensaio de MTT por ser relativamente simples de ser realizado, apesar de criterioso como todos os outros, é um dos mais utilizados para se determinar a citotoxicidade de materiais de diversas naturezas sobre células em cultura (COSTA e SOUZA, 2005). Os parâmetros a serem analisados, ao se testar a citotoxicidade, são os tipos de células empregados, a duração da exposição, as formas físicas dos dispositivos e os métodos de avaliação. Destes, os tipos de células é que podem ser o fator mais importante, porque cada função e mecanismo celular são basicamente diferentes (PARK *et al.*, 2002). A citotoxicidade pode também estar relacionada com moléculas que podem ocasionar danos aos tecidos ao serem liberadas a partir de um determinado estímulo. Recentemente, estudos têm relatado a presença de uma molécula com potencial citotóxico, o óxido nítrico (NO), em tecidos dentais e seu envolvimento em doenças inflamatórias bucais (MATEJKA *et al.*, 1998; BAEK *et al.*, 2005).

LOCCI *et al.*(2000) avaliaram *in vitro* o efeito do aparelho ortodôntico e de seus componentes (bráquetes, bandas e arcos) expostos e não expostos a fenômenos de corrosão por imersão prolongada sobre algumas funções celulares, assim como o contato direto e indireto (liberação de íons metálicos) dos componentes do aparato ortodôntico, em separado, em culturas de

fibroblastos de gengiva humana. *In vitro*, estas células estão livres da influência do organismo como um todo e se adaptam às condições particulares do microambiente no qual elas são mantidas. Avaliaram, também, a capacidade das células em manter certas funções vitais como proliferação, síntese, e secreção de glicosaminoglicanas que são componentes importantes da matriz extracelular; e a morfologia das células crescidas na superfície do aparelho ortodôntico e a capacidade delas para aderir ao substrato. Concluíram que o arco é o componente mais biocompatível do aparelho ortodôntico, e o bráquete o menos biocompatível. Um estudo comparativo nos efeitos dos íons metálicos mais comuns liberados pelos aparelhos ortodônticos na proliferação celular também foi feito. Das concentrações liberadas pelo aparelho ortodôntico, a mais alta redução na síntese de DNA foi observada na presença do íon de Cobre.

Sestini *et al.* (2006) avaliaram, *in vitro*, a toxicidade de dois tipos de arcos normalmente usados em aparelhos ortodônticos, com uma composição química similar mas diferentes na concentração de Níquel e Manganês, assim como as junções destes arcos obtidas por soldas de prata convencional, elétrica e a laser. Níquel e Cromo, conhecidos como possíveis metais tóxicos, também foram examinados usando arcos puros de Níquel e de Cromo-Titânio. Para tal, segmentos de cada arco, cortados em diferentes tamanhos, foram adicionados em cultivos celulares de osteoblastos, fibroblastos e ceratinócitos humanos. Os resultados mostraram que os diferentes arcos ortodônticos avaliados não são particularmente tóxicos para as células. A solda elétrica é bem tolerada, enquanto que a solda de prata convencional é tóxica para a

diferenciação do osteoblasto, a viabilidade do fibroblasto e o crescimento do ceratinócito. A solda a laser foi bem tolerada por todas as células testadas, mostrando uma alta biocompatibilidade.

Recentemente Hafez *et al.* (2011) avaliaram, em um estudo longitudinal, *in vivo*, a citotoxicidade, a genotoxicidade, e a liberação iônica dos aparelhos ortodônticos fixos em pacientes. Foram avaliados longitudinalmente 18 indivíduos do grupo controle e 28 do grupo dos indivíduos em tratamento. Quatro combinações de bráquetes e fios foram testados: grupo 1 (bráquete e fio de aço inoxidável); grupo 2 (bráquete de aço inoxidável e fio de Níquel-Titânio); grupo 3 (bráquete de Titânio e fio de aço inoxidável) e grupo 4 (bráquete de Titânio e fio de Níquel-Titânio). Os bráquetes usados foram os de aço inoxidável da American Orthodontics (Sheboygan, Wis) e os de Titânio da Dentaureum (Ispringen, Germany), e os fios ortodônticos usados foram os de aço inoxidável e os de Níquel-Titânio ambos da GAC *International* (Bohemia, NY). Amostras de células da mucosa bucal foram coletadas antes, 3 e 6 meses após a colocação do aparelho. As células foram avaliadas para a citotoxicidade, a genotoxicidade e a incorporação de Níquel e de Cromo. No grupo dos indivíduos em tratamento, os valores da viabilidade celular da mucosa bucal foram de 8,1% no pré-tratamento, e de 6,4% e 4,5% aos 3 e 6 meses de tratamento, respectivamente. O teor de Níquel celular aumentou de 0,52 ng/mL para 0,68 e 0,78 ng/mL nos períodos de 3 e 6 meses de tratamento, respectivamente. Enquanto que, o teor de Cromo celular aumentou de 0,31 ng/mL para 0,41 e 0,58 ng/mL nos períodos de 3 e 6 meses de tratamento, respectivamente. Comparado com o grupo controle, os indivíduos

em tratamento mostraram diferenças significativas para os danos ao DNA e teor de Cromo celular apenas no período de 3 meses de tratamento. Comparado ao grupo controle, essas alterações não foram evidentes no período de 6 meses de tratamento. Segundo Hafez *et al.* (2011), estes achados indicam, possivelmente, tolerância ou reparação das células e do DNA, e que os aparelhos ortodônticos fixos diminuem a viabilidade celular, induzindo danos ao DNA e aumentando o conteúdo de Níquel e de Cromo nas células da mucosa bucal.

1.1.1.1 Fios Ortodônticos

O bom ortodontista deve possuir a habilidade manual de um artesão e o conhecimento profundo da ciência ortodôntica. O conhecimento a respeito de fios ortodônticos permite ao profissional realizar movimentos mais eficientes e evitar danos aos dentes e tecidos de suporte. Apesar do grande número de marcas disponíveis no mercado e do grande apelo comercial, os fios ortodônticos mais utilizados atualmente se distribuem em quatro grupos básicos de ligas, sendo elas: o aço inoxidável; as ligas de Níquel-Titânio (NiTi) com suas variações durante o processo de fabricação (superelásticos, termodinâmicos e com adição de cobre); as ligas de beta-titânio e as estéticas de compósitos, recentemente lançadas no mercado (QUINTÃO e BRUNHARO, 2009).

Pelo fato dos fios ortodônticos manterem proximidade com a mucosa bucal por períodos longos de tempo, precisam ser resistentes à corrosão, não devem permitir a liberação de íons na cavidade bucal e nem gerar respostas

alérgicas (EVANS e DURNING, 1996). Ou seja, o fio deve apresentar biocompatibilidade com os tecidos bucais (GRAVINA *et al.*, 2004; MENEZES, QUINTÃO e BOLOGNESE, 2007).

Desde quando os primeiros profissionais vislumbraram a possibilidade de promover a movimentação dentária, essa era obtida pelo apoio dos dentes nos fios. Edward Angle, em 1887, utilizava ligas de Níquel-Prata para acessórios ortodônticos. As substitui, posteriormente, pelas ligas de Cobre, Níquel e Zinco, sem Prata. Finalmente, as ligas de Ouro passaram a ser as de sua escolha (KUSY, 2002).

Até o início da década de 1930, a liga de Ouro (tipo IV) foi a mais empregada na fabricação de acessórios ortodônticos. O Ouro de 14 a 18 quilates foi rotineiramente utilizado, naquela época, para fios, bandas, ganchos e ligaduras, assim como as bandas e os arcos de Irídio-Platina. A vantagem das ligas de Ouro residia no fato de serem tratadas termicamente, de forma a variar sua rigidez em cerca de 30%, e possuírem excelente resistência à corrosão (KUSY, 2002).

1.1.1.1 Fios Ortodônticos de Aço Inoxidável

Em 1929 os aços inoxidáveis foram introduzidos na Ortodontia, quando a empresa americana Renfert Company começou a vender fios dessa liga, produzida pela empresa alemã Krupp (ANUSAVICE, 2005).

No Congresso da AAO de 1931, Norris Taylor e George Paffenbarger introduziram o aço como substituto ao Ouro, alegando possuir maior resiliência e menor possibilidade de rompimento sob tensão. Em 1933, o fundador da

empresa Rocky Mountain, Archie Brusse, sugeriu o primeiro sistema de aplicação clínica do aço inoxidável em Ortodontia, durante o encontro da Sociedade Americana, na cidade de Oklahoma. A partir de então, a rivalidade entre o Ouro e o aço se iniciou formalmente. Fatores econômicos, indubitavelmente, influenciaram, em todo o mundo, esta vasta aceitação do aço em relação ao Ouro (KUSY, 2002).

Foi a Elgin Watch Company que, na década de 40, desenvolveu a liga de Cobalto-Cromo composta por Cobalto (40%), Cromo (20%), Prata (16%) e Níquel (15%), primeiramente utilizada na fabricação de molas para relógios. Na década de 60, as ligas de Cobalto-Cromo foram introduzidas na Ortodontia e patenteadas como Elgiloy®, pela Rocky Mountain Orthodontics. Essas apresentam propriedades mecânicas semelhantes às do aço inoxidável e, para fios com iguais dimensões, geram forças de magnitude semelhante (KUSY, 2002). Entretanto, para que se possa utilizar seu pleno potencial de resposta, torna-se necessário realizar tratamento térmico após a confecção de dobras, antes de se amarrar o fio aos bráquetes. A maioria dos ortodontistas nunca explorou essa liga no seu total potencial e muitas vezes sequer conseguem distingui-las das de aço, devido à semelhança física entre as mesmas (QUINTÃO e BRUNHARO, 2009).

1.1.1.1.2 Fios Ortodônticos de Níquel-Titânio

Em 1963, as ligas de Níquel-Titânio foram desenvolvidas no Laboratório Naval Americano, em Silver Springs – Maryland, pelo pesquisador Willian Buehler. Ele observou pela primeira vez o chamado “efeito memória de

forma” desse material. Não havia ainda aplicação dessa liga na Ortodontia (GOLDBERG e BURSTONE, 1979; MIURA, MOGI e OKAMOTO, 1990).

Em 1972, a Unitek Corporation produziu essa liga para uso clínico, sob o nome comercial de Nitinol®, composta por 55% de Níquel e 45% de Titânio, numa estrutura equiatômica (BISHARA, 1995a). Entretanto, naquela época, a liga não possuía efeito memória de forma ou superelasticidade. Mesmo assim, foi considerada como um avanço para a obtenção de forças leves sob grandes ativações. Em 1976, várias marcas de fios de Níquel-Titânio foram colocadas no mercado ortodôntico e os mesmos foram caracterizados como materiais de alta recuperação elástica e baixa rigidez, ganhando vasta aceitação clínica por essas propriedades. Não apresentavam, entretanto, efeitos de termoativação nem superelasticidade (QUINTÃO e BRUNHARO, 2009).

Em 1985, foi relatado o uso clínico e laboratorial de uma nova liga superelástica de Níquel-Titânio, chamada “Chinese NiTi”, desenvolvida especialmente para aplicações em Ortodontia. O termo “superelasticidade” ainda não havia sido empregado até aquela época. O fio de Níquel-Titânio chinês foi o primeiro a exibir potencial superelástico. Originalmente desenvolvido na China, e posteriormente tendo suas propriedades melhoradas, foi relatado que tal fio possuía maior recuperação elástica e menor rigidez que o de Níquel-Titânio convencional de mesma secção transversal, além de menor deformação permanente após flexão. A partir daí, vários estudos foram conduzidos na tentativa de se produzir fios ortodônticos com propriedades similares, sendo esse objetivo alcançado em 1986, com a introdução do

“Japanese NiTi”. Essas ligas foram produzidas pela GAC (GAC Int., NY, EUA) sob o nome comercial de Sentalloy (BURSTONE, QIN e MORTON, 1985; MOHLIN *et al.*, 1991; CHEN, ZHI e ARVYSTAS, 1992).

As ligas termodinâmicas de Níquel-Titânio surgiram, para fins comerciais, na década de 1990. Além das propriedades de recuperação elástica e resiliência dos fios superelásticos, os fios de Níquel-Titânio termodinâmicos possuem a característica adicional da ativação pela temperatura bucal (ANDREASEN, 1980).

Na década de 1990, surgiram no mercado os fios de Níquel-Titânio gradualmente termodinâmicos, por existir um consenso que a resposta dentária à aplicação de força e à quantidade de movimento dentário obtida são dependentes da área da superfície do periodonto. Isso significa que um arco ideal não só deve gerar forças constantes e suaves, como também ser capaz de variar o nível de força de acordo com a área periodontal envolvida. Dessa forma, é necessário que ocorra a variação da força gerada, em um mesmo fio, nos diferentes segmentos do arco. O nível de força aplicada é graduado através de toda a extensão da parábola, de acordo com o tamanho dos dentes do paciente (KUSY, 2002).

Em meados da década de 1990, os fios de Níquel-Titânio com adição de Cobre (CuNiTi) surgiram no mercado. Os mesmos são compostos, basicamente, por Níquel, Titânio, Cobre e Cromo. Devido à incorporação de Cobre, apresentam propriedades termoativas mais definidas do que os fios superelásticos de NiTi, e permitem a obtenção de um sistema ótimo de forças,

com controle mais acentuado do movimento dentário. Foram introduzidos no mercado, pela Ormco Corporation, com três temperaturas de transição (27°C, 35°C e 40°C), possibilitando aos clínicos a quantificação e aplicação de níveis de carga adequados aos objetivos do tratamento ortodôntico (QUINTÃO *et al.*, 2009).

1.1.1.1.3 Fios Ortodônticos de Beta-Titânio

As ligas de beta-Titânio são constituídas de Titânio e, quando submetidas ao tratamento térmico, apresentam alteração no rearranjo estrutural de seus átomos, sendo referidas como ligas de titânio em fase “beta” (GOLDBERG e BURSTONE, 1979). A liga de beta-titânio tem sido utilizada como material estrutural desde 1952. Porém, até 1979, a tecnologia de trefilação não permitia a fabricação de fios com secções transversais compatíveis com as aplicadas em Ortodontia. Em 1977, a fase beta do Titânio foi estabilizada à temperatura ambiente (KUSY, 2002).

As primeiras aplicações clínicas dessa liga para a Ortodontia ocorreram na década de 1980, quando uma forma diferente de Titânio, chamado “de alta temperatura”, foi sugerida. A partir de então, ganhou vasta aceitação clínica e popularidade, sendo comercialmente disponibilizada como “TMA” (*Titanium Molybdenum Alloy*) e, durante muitos anos, apenas uma empresa possuía o direito de fabricação. Atualmente, o mercado oferece um maior número de marcas comerciais (GOLDBERG e BURSTONE, 1979).

1.1.1.1.4 Fios Ortodônticos Estéticos

Como o tratamento ortodôntico estende-se por vários meses, a aparência da aparelhagem é avaliada pelos pacientes como um fator significativo a ser considerado. A demanda pela estética fez com que diversas empresas começassem a produzir, no final da década de 1970, braquetes não-metálicos, de policarbonato ou cerâmicos. Atualmente, os braquetes estéticos representam uma realidade na clínica ortodôntica, oferecendo uma alternativa aos metálicos. Entretanto, o mesmo não ocorreu em relação aos fios estéticos, que foram pouco relatados na literatura ortodôntica até meados da primeira década do século XXI (HERSHEY, 1988; HUANG, 2003).

Diferentes tipos de fios ortodônticos estéticos já foram lançados no mercado, tais como: fios metálicos com cobertura de teflon, fios metálicos recobertos por resina epoxídica, fios ortodônticos compostos por uma matriz à base de *nylon* contendo fibras de silicone para reforço, e fios ortodônticos feitos de material compósito polimérico reforçado com fibra de vidro (QUINTÃO e BRUNHARO, 2009).

1.1.1.2 Óxido Nítrico: propriedades gerais

O óxido nítrico (NO) é um gás diatômico hidrofóbico que pode ter sido originado na atmosfera primitiva do planeta Terra e se mantido através da evolução como um mediador em muitos sistemas biológicos. Uma vez que essa molécula representou uma otimização de um sistema que é primordial para o organismo, presumivelmente, ela foi preservada (MONCADA e MARTIN, 1993).

O NO é sintetizado por diferentes células do organismo e detém uma função crucial como molécula de sinalização celular (AGULLÓ, 2007). Além de ser um radical gasoso, é um metabólito reativo e multifuncional que pode agir como neurotransmissor e como um vasodilatador, sendo uma molécula importante na defesa imunológica contra células tumorais e patógenos em geral (CHI *et al.*, 2003).

Até recentemente, o NO produzido por combustão interna de máquinas e de estações de energia, um óxido tóxico do nitrogênio, era considerado como uma causa isolada da chuva ácida e da poluição da atmosfera. A primeira síntese do NO em laboratório pode ser creditada ao cientista belga Jan Baptista van Helmont (1577-1644) por volta de 1610. Os efeitos do NO foram observados novamente nos idos da década de 1980 como um agente bactericida, levando a resultados que marcaram o século XX de tal modo que a molécula de NO foi nomeada como sendo a molécula do ano pelo jornal Science, em 1992 (BRENNAN, THOMAS e LANGDON, 2003).

No organismo, através do trabalho de Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad, ganhadores do prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia em 1998, foi reconhecida a importância do papel do NO. Estes expuseram o efeito do NO como um mediador biológico produzido por células de mamíferos (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001)

Na fisiologia dos mamíferos, o NO desempenha papel modulador do tônus vascular para regular o fluxo e a pressão sanguínea e, como é também um neurotransmissor periférico, está envolvido nos mecanismos de defesa do

hospedeiro, atuando na imunidade inata (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991; MONCADA e MARTIN, 1993).

Até fins de 1980, quando foi descoberto que o NO era responsável pelo relaxamento vascular da musculatura lisa, não era esperado o que uma molécula simples pudesse significar na fisiologia dos mamíferos. É capaz de passar livremente entre as células e por dentro delas, atravessando as membranas celulares, por ser uma molécula sem carga (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Palmer, Ferrige e Moncada (1987) testaram a hipótese de que nitrovasodilatadores, cuja ação é a liberação de NO, mimetizariam os efeitos do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Concluíram que o relaxamento dos tecidos induzidos pelo EDRF foi o mesmo daqueles induzidos pelo NO. A atividade biológica, a estabilidade e a susceptibilidade para ser um inibidor e para ser um potenciador, de ambas as substâncias, sugeriram que o EDRF e o NO são substâncias idênticas.

Um estudo de Ignarro *et al.* (1987) reconheceu que o NO além de produzir ações idênticas às daquelas do EDRF também foi inativado por ânions de superóxido e estabilizado pela enzima superóxido dismutase do mesmo modo que o EDRF.

Nos dias de hoje, o NO é tido como sendo fundamental em uma vasta área de acontecimentos intracelulares e extracelulares, em uma extensa variedade de tecidos. Também é uma molécula efetora trivial para a destruição fisiológica e filogenética em diferentes patogenias inflamatórias, auto-imunes e

tem implicações nas doenças periodontais (GREEN, NACY e MELTZER, 1991; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

O conhecimento do NO como mediador químico do processo inflamatório, tem relevância cada vez maior em mecanismos complexos de hemodinâmica, hemostasia e inflamação. O NO, por ser um potente vasodilatador, regula a resposta vascular inicial da reação inflamatória aguda e as funções de outras células envolvidas nesse processo. Sua ação transcurre pela função hemostática, incluindo vasodilatação; pela neurotransmissão; pela inibição da adesão e da agregação plaquetária; pela ação de defesa contra agentes infecciosos tais como bactérias, fungos e parasitas e ele age também como destruidor de células tumorais (LIEW e COX, 1991; LIEW, LI e SEVERN, 1991; NUSSLER e BILLIAR, 1993; MARTIN *et al.*, 1997; RUIZ *et al.*, 1997; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Algumas doenças e condições que estão associadas com a produção alterada de óxido nítrico são: hipertensão e hipotensão, doenças tromboembólicas, choque séptico, broncoespasmo, síndrome respiratória aguda, hipertensão pulmonar, falha renal, imunodeficiência, encefalopatia induzida por HIV, impotência, depressão e malignidade (BRENNAN, THOMAS e LANGDON, 2003).

Embora possua uma aparente simplicidade, o NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela complexa enzima óxido nítrico sintase (NOS) (VALLANCE e COLLIER, 1994).

Em 1981 as enzimas óxido nítrico sintases (NOS) foram identificadas e descritas e as três principais isoformas (eNOS, nNOS e iNOS) foram clonadas e purificadas. Posteriormente, mais de 16.000 estudos sobre as NOS, muitos deles sobre sua estrutura, funções e atividade, foram publicados (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001).

As enzimas NOS são produzidas, cada uma delas por genes distintos e denominadas em ordem de descoberta como NOS₁, NOS₂ E NOS₃. A primeira delas, NOS₁, a ser purificada e clonada de tecido neuronal, é também chamada de nNOS. A isoforma encontrada em células endoteliais é conhecida como eNOS ou NOS₃. Essas duas isoformas são também denominadas de constitutivas visto que se manifestam continuamente em neurônios e células epiteliais, respectivamente. Essas proteínas também são dependentes de uma elevação na concentração de Cálcio para sua atividade e, portanto, produzem baixas concentrações de óxido nítrico. Por outro lado, a segunda isoforma, a NOS₂, é induzível, independente do Cálcio e é também chamada de iNOS (DRAPIER, 1991).

As NOS são codificadas em genes separados em cromossomos distintos, localizados no cromossomo 07 (eNOS), no cromossomo 12 (nNOS) e no cromossomo 17 (iNOS). A isoforma endotelial é encontrada em endotélio vascular, plaquetas e no coração (endocárdio e miocárdio) e a isoforma neuronal é encontrada em neurônios centrais e periféricos. Estas duas isoformas são constitutivas normais das células, essencialmente expressadas e funcionalmente reguladas ou modeladas. A iNOS pode ser manifestada em muitos tipos celulares incluindo aqueles de musculatura lisa, músculo do

coração, intestino, células imunes e hepatócitos. Esta isoforma se expressa somente depois da ativação de células com produtos gerados por uma infecção, incluindo as endotoxinas, como as citocinas ($\text{TNF}\gamma$ ou IL-1) e lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos (VALLANCE e COLLIER, 1994; MARIOTTO, MENEGAZZI e SUZUKI, 2004).

A molécula sinal nitrito (NO_2) é sintetizada sob demanda após a ativação enzimática, pela NOS, por curtos períodos de tempo. A molécula de NO, é sintetizada através de iNOS que induz a liberação de NO por longos períodos de tempo uma vez que se manifesta (KRÖNCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997).

O NO difunde-se para fora da célula, uma vez sintetizado, e pode agir localmente afetando as células proximais. Por ser um gás extremamente instável e com uma meia vida de poucos segundos, a sua ação é restrita a cada local do evento. Devido a isso, em nosso organismo o NO se apresenta em baixas concentrações sendo difícil uma monitorização desse gás *in vivo* (COOPER e HAUSMAN, 2004; YAO, VLESSIDIS e EVMIRIDIS, 2004).

Um novo padrão não enzimático de produção de NO foi descrito envolvendo redução química de nitrato inorgânico. Este padrão foi demonstrado em vários sistemas principalmente no trato gastrointestinal. A bactéria oral comensal reduz na dieta nitrato para nitrito, o qual mais adiante é reduzido para NO. A acidificação de nitrito salivar engolido gera óxido nítrico no estômago com subseqüentes propriedades antimicrobianas. Estas interações entre hospedeiro e bactéria podem complementar o sistema de defesa contra

patógenos na cavidade bucal e no intestino (DUNCAN, DOUGALL e JOHNSTON, 1995; WEITZBERG e LUNDBERG, 1998).

1.1.1.3 Óxido Nítrico: citotoxicidade e ativação celular

O NO desempenha uma importante função como sinalização molecular em muitas partes do organismo, bem como sendo uma importante molécula citotóxica de resposta imune inata. De um lado, atua como um mensageiro fisiológico intercelular e, por outro lado, exibe atividade citotóxica *in vivo*. O NO é citostático ou citotóxico em células eucarióticas e procarióticas interagindo com distintas moléculas da via metabólica celular (FREEMAN, 1994; KRÖNCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997). Muitas células imunes são capazes de produzir NO incluindo os macrófagos e os monócitos (WEINBERG *et al.*, 1995).

Macrófagos ou células endoteliais, situadas em determinado local, produzem NO nas proximidades das células alvo. As células produtoras de NO, por sua vez, são ativadas, induzindo a sua produção em toda parte. Provavelmente, grande parte de NO oxida-se antes que chegue a atingir seus alvos. Por essa razão é impossível afirmar qual é a concentração de NO que leva à toxicidade das células. Além disso, através de sua função citoprotetora o NO age diretamente na redução da produção de radicais livres ou interferindo na resposta imune. A produção de radical livre pela interação do NO com o superóxido tem os dois efeitos: de proteção (matando bactérias e neutralizando O₂) e de toxicidade pela formação de radicais de peroxinitrito e de hidroxil. Em macrófagos, condrócitos, timócitos, células da musculatura lisa e em células

dendríticas, a ativação destas induz à síntese de NO mediando a morte das mesmas (MILES *et al.*, 1996; KRÖNCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997).

Sérios danos ao DNA causados pelo NO podem levar à morte celular via apoptose ou necrose. A necrose é resultante de quebras celulares com liberação de conteúdos celulares e inflamação. Por outro lado, a apoptose é resultante de fragmentação de DNA e de condensação de conteúdos celulares com a formação de corpúsculos celulares ligados à membrana plasmática. Desse modo, a liberação de NO leva a uma cascata que gera sérios danos celulares: quebra, necrose e inflamação. O NO também pode reagir com outros compostos intracelulares ou extracelulares formando compostos citotóxicos (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Os macrófagos desempenham um papel crucial tanto na imunidade natural quanto na imunidade adquirida. Essas células fagocitam desde tecidos próprios que estejam lesados ou mortos, como eritrócitos, até partículas estranhas, como macromoléculas e inclusive, antígenos. Outra função diz respeito à secreção de enzimas, espécies de oxigênio reativo, NO e mediadores lipoderivados (ex. prostaglandinas) os quais são utilizados para matar patógenos, controlar a propagação de infecções, assim como podem lesar tecidos normais nas proximidades da inflamação (FERREIRA e TEIXEIRA, 2005).

Quando um fagócito encontra um microrganismo, este é envolvido pela porção da membrana fagocítica, que então se invagina, formando um

discreto fagossomo. Este processo conduz a um acentuado aumento de consumo de O_2 pelo fagócito iniciando um complexo sistema de sinalização que é especificamente constituído pelo superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e óxido nítrico. Os polimorfonucleares de sangue humano e macrófagos murinos, mostraram ser modelos experimentais adequados para a estimação quantitativa de atividade fagocítica sob a influência de diferentes agentes imunomoduladores. Macrófagos murinos, da linhagem J774.2, não sofrem alteração na produção de NO pela ação de diferentes agentes imunomoduladores com exceção de lipopolissacarídeos (STOIKA *et al.*, 2001).

Cunha *et al.* (1993), investigando o efeito da fagocitose na indução do NO, demonstraram que a fagocitose por si só não é suficiente como um co-sinal para a indução de NOS em macrófagos murinos. Além disso, a ingestão de certas partículas pode inibir a indução desta enzima.

A atividade antimicrobiana de macrófagos ativados está correlacionada com a inibição da oxidação de nitrogênio da L-arginina e, outros estudos sugerem que dois sinais são necessários para a indução de mecanismos bioquímicos levando a uma atividade efetora (GREEN *et al.*, 1990).

O interferon-gama ($IFN-\gamma$) é uma citocina que desempenha um importante papel tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa e é a principal citocina ativadora de macrófagos. Macrófagos ativados são importantes células efetoras nos processos inflamatórios e na defesa do hospedeiro contra microorganismos. Ele induz a produção de peróxido de

hidrogênio, óxido nítrico e outras moléculas responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos (REIS, SOUZA, MINEO, ESPÍNDOLA, 2001; STOIKA *et al.*, 2001). A ativação consiste em alterações quantitativas na expressão de várias proteínas que conferem aos macrófagos ativados a capacidade de exercer algumas funções que não podem ser executadas por monócitos em repouso. Um macrófago é considerado ativado se ele desempenha uma determinada função medida em um ensaio específico como, por exemplo, morte microbiana (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2007).

O papel do NO é mais claramente estabelecido na modulação de respostas imunológicas (LANGREHR *et al.*, 1993). Entretanto, algumas diferenças foram encontradas a respeito da ação citotóxica do NO em diferentes tipos celulares de mamíferos e também em linhagens celulares de vários tumores (KRÖNCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997).

1.1.1.4 Óxido Nítrico e Odontologia

Ainda é desconhecido o papel do NO na mucosa bucal normal. Os achados sugerem que uma concentração excessiva de NO na saliva exerce um papel potencial nas modificações das doenças da mucosa bucal apresentando um efeito regulador patofisiológico. O aumento de nitrito quantificado na saliva foi encontrado em pacientes com ulcerações orais aftosas recorrentes (OHASHI, IWASE e NAGUMO, 1999).

Há poucos estudos sobre o efeito do NO nas doenças orais e embora tenha havido escassas publicações relativas a essa área anatômica, o interesse sobre essa molécula expandiu-se velozmente e é quase certo que ele

tenha importantes e danosas ações no desenvolvimento da doença periodontal e para o câncer (BRENNAN, THOMAS e LANGDON, 2003).

As doenças periodontais representam um grupo predominante de condições inflamatórias crônicas. O entendimento do papel da molécula de NO, no contexto das patogêneses e na conduta em relação a essas doenças, pode guiar a oportunidades de desenvolvimento de agentes terapêuticos que regulem respostas de defesa. A resposta inflamatória é amplamente auto-limitante, todavia quando a inflamação é desregulada ou, quando o fator iniciante persiste, como acontece na doença periodontal, a inflamação pode ser implacável, levando a um excessivo dano tecidual. O papel do NO na doença periodontal não é claro e há pouca informação com respeito à produção de NO pelos tecidos do periodonto. Além de todas as funções biológicas já descritas, o NO também apresenta grande importância nas patogenias da doença periodontal (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Altas quantidades de NO podem ser geradas na periodontite principalmente por macrófagos, polimorfonucleares, linfócitos e fibroblastos, seguidas pela produção de citocinas induzidas principalmente por LPS. Foi observado que bactérias periodontopáticas são capazes de induzir a produção de substrato de NOS à L-arginina e o produto final L-citrulina, em inflamação gengival humana (BLIX e HELGELAND, 1998; MATEJKA *et al.*, 1998).

Os efeitos benéficos da manifestação de iNOS, nas periodontites, podem incluir atividade antimicrobiana, modulação imunológica, inibição de trombose microvascular, e perfusão tecidual. Entretanto, os efeitos prejudiciais

do NO podem incluir uma ação citotóxica para tecidos e osso alveolar, vermelhidão gengival, explicada pelo aumento da permeabilidade vascular, tendência de aumento do sangramento dos tecidos moles e, ainda, o aumento da reabsorção do osso alveolar (LOHINAI e SZABO, 1998).

O entendimento do envolvimento do NO, como os relatados para as doenças periodontais, é apenas o começo. É certo, dada à vasta extensão de implicações do NO na saúde e na doença, o seu papel essencial na inflamação periodontal. É provável que o NO seja um importante causador do dano tecidual induzido no hospedeiro, mediado pela produção de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas e pela produção de espécies reativas de nitrogênio. Para aqueles indivíduos susceptíveis ao desenvolvimento da doença periodontal severa, a intervenção objetivando a modulação da resposta do hospedeiro em nível local, irá tornar-se de grande valor terapêutico nos próximos anos. O entendimento da produção de NO, seu papel e seu controle nas periodontites humanas é de importância crítica no desenvolvimento de cada estratégia (DAGHIGH *et al.*, 2002; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

O NO atua como um importante regulador na formação e reabsorção óssea. HAYASHI *et al.*, (2002), examinando o papel desta molécula no movimento dentário ortodôntico com inibidores específicos de NOS, sugerem que esta molécula seja um importante mediador bioquímico na resposta do tecido periodontal em relação à força ortodôntica. Movimentos dentários ortodônticos decorrem da resposta do tecido periodontal à força ortodôntica que guia a modelação e a remodelação do osso alveolar adjacente.

Precusores atóxicos de NO podem ser usados para diminuir o tempo de tratamento ortodôntico visto que diferentes fatores têm o poder de influenciar a relação de movimento dentário ortodôntico por meio de vários biomediadores, dentre os quais o NO. Considera-se que estas respostas ocorram devido à ativação de sinais padrões específicos e a identificação desses padrões pode conduzir a uma intervenção farmacológica para controlar a taxa de movimento ortodôntico dentário. É notório que estudos científicos sejam realizados para que uma avaliação mais detalhada permita aplicações clínicas (HAYASHI *et al.*, 2002; AKIN, GURION e OLMEZ, 2004).

1.1.2 Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade de fios ortodônticos (aço inoxidável, Níquel-Titânio superelástico, Níquel-Titânio termoativado, Beta-Titânio e Níquel-Titânio ultra-estético) usados atualmente na clínica ortodôntica.

E tem como objetivo específico avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular (MTT assay) da linhagem de macrófagos murinos J774 não ativadas e, posteriormente, ativadas com interferon-gama (IFN- γ) na presença de fios ortodônticos (aço inoxidável, Níquel-Titânio superelástico, Níquel-Titânio termoativado, Beta-Titânio e Níquel-Titânio ultra-estético) e, também, os efeitos destes fios ortodônticos na produção de óxido nítrico (NO) nesta linhagem de macrófagos, com e sem ativação de interferon-gama (IFN- γ).

1.2 MATERIAL E MÉTODO

1.2.1 Material

A amostra do estudo foi constituída de fios ortodônticos. Os mesmos foram numerados de 1 a 9 de acordo com o tipo e o fabricante (Quadro 1).

Quadro 1

FIO	TIPO	FABRICANTE
1	Aço Inoxidável	Morelli Ortodontia
2		Highland Metals Inc.
3	Níquel Titânio superelástico	Morelli Ortodontia
4		3M Unitek
5	Níquel-Titânio termoativado	Morelli Ortodontia
6		3M Unitek
7	Beta-Titânio (TMA)	Orthometric
8		3M Unitek
9	NiTi superelástico estético	Eurodonto Orthodontic Products

Tipos e Fabricantes dos fios ortodônticos utilizados na amostra.

Foram utilizados, no experimento sem estímulo de IFN- γ , 3 fragmentos de aproximadamente 2 mm de cada material, para cada tempo (24, 48 e 72 horas), em um total de 9 fragmentos de cada material para a determinação da viabilidade celular pelo método de MTT e para a dosagem de óxido nítrico.

Foram utilizados, no experimento com estímulo de IFN- γ , 6 fragmentos de aproximadamente 2 mm de cada material, exceto para o fio 9, no qual foram utilizados 4 fragmentos, para o tempo de 48 horas para a determinação da viabilidade celular pelo método de MTT e para a dosagem de óxido nítrico.

Os fragmentos foram obtidos a partir de arcos ortodônticos pré-contornados inferiores 0,017" x 0,025".

1.2.2 Método

O presente protocolo de avaliação utilizando o MTT é o seguido no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas e no Núcleo de Pesquisa em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (VITRAL *et al.*, 2008).

1.2.2.1 Esterilização dos Materiais

Os materiais foram esterilizados com o intuito de eliminar possíveis contaminações e, conseqüentemente resultados inverídicos. Foi utilizado o óxido de etileno para a esterilização dos fragmentos dos fios ortodônticos utilizados na amostra. Posteriormente, estes foram manipulados no fluxo laminar onde foram resguardadas todas as condições de esterilidade.

1.2.2.2 Cultura Celular da Linhagem de Macrófagos Murinos J774

Células da linhagem J774.A1 (ATCC no. TIB-67, *American Type Culture Collection*, Manassas, Va) foram cultivados em frascos (NUNC) de 25cm² contendo meio de cultura suplementado (5% de soro fetal bovino, 50 UI por mililitro de penicilina, 1% de aminoácido não essencial, e 2% de L-glutamina (*Gibco, Grand Island, NY*)), e incubado a temperatura de 37°C em 5% de dióxido de carbono. Após serem transferidas para um recipiente adequado, as células foram lavadas através de centrifugação a 1200rpm, durante 10 minutos, a 4°C.

Para determinação da viabilidade e contagem celular utilizou-se o corante vital azul de Tripán, em uma proporção de 1:1 (corante:meio de cultura) em câmara de Neubauer (WILSON, 2000).

1.2.2.3 *Cultura Celular na presença dos Fios Ortodônticos sem estímulo de Interferon-gama (IFN- γ)*

Células da linhagem J774 (2×10^4 célula/poço) foram cultivadas em placas de 96 ou 24 poços em um volume de 100 μ L, ressuspensas em meio de cultura RPMI-suplementado. Os fragmentos de fios foram distribuídos, individualmente, nos poços e mantidos em cultura em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) com 5% de dióxido de carbono a 37° C. O grupo controle foi constituído de células da linhagem J774, cultivadas sem a presença dos fios ortodônticos a serem testados. Após cada período de incubação, os sobrenadantes foram coletados para determinação dos níveis de óxido nítrico (NO). O ensaio de MTT também foi utilizado para mensuração da atividade citotóxica dos fios ortodônticos sobre a linhagem celular nos três períodos de cultivo.

1.2.2.4 *Cultura Celular na presença dos Fios Ortodônticos com estímulo de Interferon-gama (IFN- γ)*

Células da linhagem J774 (2×10^4 célula/poço) foram cultivadas em placa de 96 ou 24 poços em um volume de 100 μ L, ressuspensas em meio de cultura RPMI-suplementado. Adicionalmente, foram acrescentadas 10 μ l/poço de interferon-gama (IFN- γ). Os fios ortodônticos foram distribuídos nos poços, individualmente, sobre as células ativadas com IFN- γ , deixados em cultura por

48 horas a 37°C, com 5% de CO₂. O grupo controle foi constituído de células da linhagem J774, ativadas com 10µl/poço de IFN-γ, cultivadas sem a presença dos fios ortodônticos a serem testados. Após esse período de incubação os sobrenadantes foram coletados para posterior quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO). O ensaio de MTT foi utilizado para mensuração da atividade citotóxica dos fios ortodônticos sobre a linhagem celular.

1.2.2.5 Determinação da Viabilidade Celular pelo Método de MTT

A viabilidade celular das culturas dos macrófagos J774 foi determinada pelo método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio-bromídico, *Roche Applied Science, Germany*) de acordo com Mosmann (1983), que se baseia na capacidade da enzima mitocondrial desidrogenase succinato em converter o sal amarelo de tetrazólio (MTT) solúvel em água em cristais de formazan nas células metabolicamente ativas. Este produto azul-escuro, insolúvel em água, é armazenado no citoplasma das células, o qual se solubiliza em álcool-ácido gerando uma cor azul. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. Após a coleta dos sobrenadantes, aos fragmentos dos fios e às células que permaneceram nos poços da placa foram acrescentados 90µl de RPMI complemento e 10µl de solução MTT A 50mg/mL por poço. As células foram incubadas por 4 horas, à temperatura de 37°C em estufa de CO₂. Em seguida, a reação do MTT foi interrompida com 100µl/poço de solução álcool-ácido, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 570nm em leitor de microplacas (Spectramax 190 - Molecular Device).

1.2.2.6 Dosagem do Óxido Nítrico pelo Método de Griess

Para a avaliação da produção de NO pelas células de linhagem J774, 100 µL de sobrenadante, de cada poço, foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Esta avaliação foi feita utilizando o método de Griess, como descrita por Green *et al* (1982) com algumas modificações. As concentrações de nitrito presentes nos sobrenadantes foram obtidas através da análise de regressão linear a partir da curva padrão, empregando-se diluições duplas seriadas de nitrito de sódio a partir de 200µM até a 11^a diluição. As amostras (sobrenadantes de cultura das células) foram utilizadas puras. O reagente de Griess foi preparado adicionando-se sulfanilamida a 1% e α -naftiletilenoaminohidrocloro (NEED) a 0,1% em 2,5% DE H₃PO₄. A absorbância foi determinada a 540 nm, através do leitor de microplacas (Spectramax 190-Molecular Device).

1.2.2.7 Análise Estatística

Toda a análise estatística foi feita utilizando o programa *Statistical Package for the Social Scienses* (versão 13.0, SPSS, Chicago).

No artigo 1, o teste de Mann-Withney foi aplicado ao comparar as médias de cada grupo de fio com o grupo controle em cada intervalo de tempo e os testes de Friedman e Wilcoxon foram aplicados ao comparar a variação das medias para cada material nos tempos 24, 48 e 72 horas.

No artigo 2, os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram aplicados ao avaliar a viabilidade celular comparando os valores obtidos para

cada tipo de fio ortodôntico com o grupo controle e a análise de variância e o teste de Dunnett foram aplicados ao avaliar a produção de óxido nítrico comparando os valores obtidos para cada tipo de fio ortodôntico com o grupo controle.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2007. 572 p.

AGULLÓ, L. **Introducción al óxido nítrico**. Disponível em: <<http://cgmp.blauplanet.com/es-intno.html>>. Acesso em: 10 out. 2010.

AKIN, E.; GURTON, A. U.; OLMEZ, H. Effects of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 126, n. 5, p. 608-614, Nov. 2004.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v. 1, n. 357(Pt 3), p. 593-615, Aug. 2001.

ANDREASEN, G. A clinical trial of alignment of teeth using a 0.019 inch thermal nitinol wire with a transition temperature range between 31 degrees C. and 45 degrees C. **Am J Orthod**, v. 78, n. 5, p. 528-537, Nov. 1980.

ANHOURY, P. *et al.* Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. **Angle Orthod**, v.72, n. 4, p. 338-343, Aug. 2002.

ANUSAVICE, K. J. **Phillips' science of dental materials**. 11th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003.

ARTIK, S. *et al.* Tolerance to nickel: oral nickel administration induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity. **J Immunol**, v. 167, n. 12, p. 6794-6803, Dec. 2001.

ARVIDSON, K. *et al.* Cytotoxic effects of cobalt-chromium alloys on fibroblasts derived from human gingiva. **Scand J Dent Res**, v. 95, n. 4, p. 356-363, Aug. 1987.

BAEK, H. S. *et al.* Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. **Yonsei Med J**, v. 46, n. 4, p. 579-583, Aug. 2005.

BAEK, H. S. *et al.* Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. **Yonsei Med J**, v. 46, n. 4, p. 579-583, Aug. 2005.

BARRETT, R. D.; BISHARA, S. E.; QUINN, J. K. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 103, n. 1, p. 8-14, Jan. 1993.

BATISTA, A. C. **Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) em gengivites associadas à placa bacteriana e periodontites crônicas localizadas**. Bauru: USP, 2001.

BISHARA, S. E. *et al.* Comparisons of the thermodynamic properties of three nickel-titanium orthodontic archwires. **Angle Orthod**, v. 65, n. 2, p. 117-122, 1995.

BISHARA, S. E. Oral lesions caused by an orthodontic retainer: a case report. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 108, n. 2, p. 115-117, Aug. 1995.

BLIX, I. J.; HELGELAND, K. LPS from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and production of nitric oxide in murine macrophages J774. **Eur J Oral Sci**, v. 106, n. 1, p. 576-581, Feb. 1998.

BRENNAN, P. A.; THOMAS, G. J.; LANGDON, J. D. The role of nitric oxide in oral diseases. **Arch Oral Biol**, v. 48, n. 2, p. 93-100, Feb. 2003.

BURSTONE, C. J.; QIN, B.; MORTON, J. Y. Chinese NiTi wire – a new orthodontic alloy. **Am J Orthod**, v. 87, n. 6, p. 445-452, Jun. 1985.

CHEN, R.; ZHI, Y. F.; ARVYSTAS, M. G. Advanced Chinese NiTi alloy wire and clinical observations. **Angle Orthod**, v. 62, n. 1, p. 59-66, 1992. Erratum in: **Angle Orthod**, v. 62, n. 3, p. 164, 1992.

CHI, D. S. *et al.* Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide**, v. 8, n. 2, p. 127-132, Mar. 2003.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The cell – A molecular approach**. Boston: ASM Press, 2004.

COSTA, C. A. S.; SOUZA, P. P. C. Testes de citotoxicidade em culturas de células. In: ESTRELA, C. **Metodologia científica**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005. p. 213-230.

CRAIG, R. G. **Restorative dental materials**. 9th ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1993. p. 141-147.

CUNHA, F. Q. *et al.* Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Immunology**, v. 79, n. 3, p. 408-411, Jul. 1993.

DAGHIGH, F. *et al.* Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. **J Periodontol**, v. 73, n. 4, p. 392-400, Apr, 2002.

DOBBS, H. S.; MINSKI, M. J. Metal ion release after total hip replacement. **Biomaterials**, v. 1, n. 4, p. 193-198, Oct. 1980.

DRAPIER, J. C. L-arginine-derived nitric oxide and the cell-mediated immune response. **Res Immunol**, v. 142, n. 7, p. 551-602, 1991.

DUNCAN, C. *et al.* Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nat Med**, v. 1, n. 6, p. 546-551, Jun. 1995.

ELIADES, T. *et al.* Surface characterization of ceramic brackets: a multitechnique approach. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 105, n. 1, p. 10-18, Jan. 1994.

EVANS, T. J.; DURNING, P. Aligning archwires, the shape of things to come? A fourth and fifth phase of force delivery. **Br J Orthod**, v. 23, n. 3, p. 269-275, Aug. 1996.

FERREIRA, A. P.; TEIXEIRA, H. C. **Tópicos de Imunologia Básica**. Juiz de Fora: Do Autor, 2005. 83 p.

FREEMAN, B. Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side. **Chest**, v. 105, n. 3 Suplemento, p. 79S-84S, Mar. 1994.

GOLDBERG, J.; BURSTONE, C. J. An evaluation of beta titanium alloys for use in orthodontic appliances. **J Dent Res**, v. 58, n. 2, p. 593-599, Feb. 1979.

GRAVINA, M. A. *et al.* Fios Ortodônticos: propriedades mecânicas relevantes e aplicação clínica. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 9, n. 1, p. 113-128, Jan./Fev. 2004.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n.1, p. 131-138, Oct. 1982.

GREEN, S. J. *et al.* Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J Immunol**, v. 144, n. 1, p. 278-283, Jan. 1990.

GREEN, S. J.; NACY, C. A.; MELTZER, M. S. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to *Leishmania* and other intracellular pathogens. **J Leukoc Biol**, v. 50, n. 1, p. 93-103, Jul. 1991.

GRIMSDOTTIR, M. R.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Cytotoxic and antibacterial effects of orthodontic appliances. **Scand J Dent Res**, v. 101, n. 4, p. 229-231, Aug. 1993.

GRIMSDOTTIR, M. R.; HENSTEN-PETTERSEN, A.; KULLMANN, A. Cytotoxic effect of orthodontic appliances. **Eur J Orthod**, v. 14, n. 1, p. 47-53, Feb. 1992.

GRIMSDOTTIR, M. R.; HENSTEN-PETTERSEN, A.; KULLMANN, A. Proliferation of nickel-sensitive human lymphocytes by corrosion products of orthodontic appliances. **Biomaterials**, v. 15, n. 14, p. 1157-1160, Nov. 1994.

HAFEZ, H. S. *et al.* Cytotoxicity, genotoxicity, and metal release in patients with fixed orthodontic appliances: a longitudinal in-vivo study. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 140, n. 3, p. 298-308, Sept. 2011.

HANKS, C. T.; WATAHA, J. C.; SUN, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dent Mater**, v. 12, n. 3, p. 186-193, May. 1996.

HAYASHI, K. *et al.* Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 122, n. 3, p. 306-309, Sept. 2002.

HENSTEN-PETTERSEN, A. Skin and mucosal reactions associated with dental materials. **Eur J Oral Sci**, v. 106, n. 2, p. 707-712, Apr. 1998.

HENSTEN-PETTERSEN, A.; JACOBSEN, N.; GRIMSDOTTIR, M. R. Allergic reactions and safety concerns. In: BRANTLEY, W. A.; ELIADES, T. **Orthodontic materials scientific and clinical aspects**. New York: Thieme Stuttgart, 2001. p. 287-299.

HERSHEY, H. G. The orthodontic appliance: esthetic considerations. **J Am Dent Assoc**, v. 117, n. 4, p. 29E-34E, Sept. 1988. Erratum in: **J Am Dent Assoc**, v. 117, n. 6, p. 698, Nov. 1988.

HUANG, Z. M. *et al.* Fabrication of a new composite orthodontic archwire and validation by a bridging micromechanics model. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2941-2953, Aug. 2003.

IGNARRO, L. J. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U. S. A.**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec. 1987.

JACOBSEN, N.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Occupational health problems and adverse patient reactions in orthodontics. **Eur J Orthod**, v. 11, n. 3, p. 254-264, Aug. 1989.

JOHANSSON, B. I.; LUCAS, L. C.; LEMONS, J. E. Corrosion of copper, nickel, and gold dental casting alloys: an in vitro and in vivo study. **J Biomed Mater Res**, v. 23, n. A3 Suppl, p. 349-361, Dec. 1989.

KALIMO, K.; MATTILA, L.; KAUTIAINEN, H. Nickel allergy and orthodontic treatment. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 18, n. 5, p. 543-545, Sept. 2004.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis**, v. 7, n. 1, p. 2-10, Jan. 2001.

KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? **Nitric Oxide**, v. 1, n. 2, p. 107-120, Apr. 1997.

KUSY, R. P. Orthodontic biomaterials: from the past to the present. **Angle Orthod**, v. 72, n. 6, p. 501-512, Dec. 2002.

KVAM, E.; BONDEVIK, O.; GJERDET, N. R. Traumatic ulcers and pain in adults during orthodontic treatment. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 17, n. 3, p. 154-157, Jun. 1989.

LANGREHR, J. M. *et al.* Nitric oxide – a new endogenous immunomodulator. *Transplantation*, v. 55, n. 6, p. 1205-1212, Jun. 1993.

LEMONS, J. E. Dental implant biomaterials. **J Am Dent Assoc**, v. 121, n. 6, p. 716-719, Dec. 1990.

LIEW, F. Y. *et al.* A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. **Eur J Immunol**, v. 21, n. 10, p. 2489-2494, Oct. 1991.

LIEW, F. Y.; COX, F. E. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol Today**, v. 12, n. 3, p. 17-21, Mar. 1991.

LOCCI, P. *et al.* Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. **J Biomed Mater Res**, v. 51, n. 4, p. 561-568, Sept. 2000.

LOHINAI, Z. M.; SZABO, C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. **Medical Science Monitor**, v. 4, p. 1089-1095, 1998.

MARIGO, M. *et al.* Evaluation of immunologic profile in patients with nickel sensitivity due to use of fixed orthodontic appliances. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 124, n. 1, p. 46-52, Jul. 2003.

MARIOTTO, S.; MENEGAZZI, M.; SUZUKI, H. Biochemical aspects of nitric oxide. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 14, p. 1627-1645, 2004.

MARTIN, V. *et al.* Induction of nitric oxide production by polysides from the cell walls of *Streptococcus mutans* OMZ 175, a gram-positive bacterium, in the rat aorta. **Infect Immun**, v. 65, n. 6, p. 2074-2079, Jun. 1997.

MATEJKA, M. *et al.* Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J Periodontal Res**, v. 33, n. 8, p. 517-518, Nov. 1998.

MENEZES, L. M.; QUINTÃO, C. A.; BOLOGNESE, A. M. Urinary excretion levels of nickel in orthodontic patients. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 131, n. 5, p. 635-638, May. 2007.

MILES, A. M. *et al.* Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. **J Biol Chem**, v. 271, n. 1, p. 40-47, Jan. 1996.

MIURA, F.; MOGI, M.; OKAMOTO, Y. New application of superelastic NiTi rectangular wire. **J Clin Orthod**, v. 24, n. 9, p. 544-548, Sept. 1990.

MOCKERS, O.; DEROZE, D.; CAMPS, J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. **Dent Mater**, v. 18, n. 4, p. 311-317, Jun. 2002.

MOHLIN, B. *et al.* Examination of Chinese NiTi wire by a combined clinical and laboratory approach. **Eur J Orthod**, v. 13, n. 5, p. 386-391, Oct. 1991.

MONCADA, S.; MARTIN, J. F. Evolution of nitric oxide. **Lancet**, v. 341, p. 1511, Jun. 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-142, Jun. 1991.

MORTZ, C. G *et al.* Nickel sensitization in adolescents and association with ear piercing, use of dental braces and hand eczema. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis (TOACS). **Acta Derm Venereol**, v. 82, n. 5, p. 359-364, 2002.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

NIEMI, L.; HENSTEN-PETTERSEN, A. In vitro cytotoxicity of Ag-Pd-Cu-based casting alloys. **J Biomed Mater Res**, v. 19, n. 5, p. 549-561, May.-Jun. 1985.

NOBLE, J. *et al.* Nickel allergy and orthodontics, a review and report of two cases. **Br Dent J**, v. 204, n. 6, p. 297-300, Mar. 2008.

NUSSLER, A. K.; BILLIAR, T. R. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. **J Leukoc Biol**, v. 54, n. 2, p. 171-178, Aug. 1993.

OHASHI, M.; IWASE, M.; NAGUMO, M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. **J Oral Pathol Med**, v. 28, n. 8, p. 355-359, Sept. 1999.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, Jun. 1987.

PARK, J. C. *et al.* Evaluation of the cytotoxicity of polyetherurethane (PU) film containing zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) on various cell lines. **Yonsei Med J**, v. 43, n. 4, p. 518-526, Aug. 2002.

PHILLIPS, R. W. **Materiais dentários**. 9^a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1993. p. 35-38.

PROFFIT, W. R. **Ortodontia Contemporânea**. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1995.

QUINTÃO, C. C. A.; BRUNHARO, I. H. V. P. Fios ortodônticos: conhecer para otimizar a aplicação clínica. **R Dental Press Ortodon Ortop Facial**, v. 14, n. 6, p. 144-157, Nov./Dez. 2009.

QUINTÃO, C. C. *et al.* Force-deflection properties of initial orthodontic archwires. **World J Orthod**, v. 10, n. 1, p. 29-32, 2009.

RAHILLY, G.; PRICE, N. Nickel allergy and orthodontics. **J Orthod**, v. 30, n. 2, p. 171-174, Jun. 2003.

REIS, D. *et al.* Myosin V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN-gamma. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 2, p. 221-226, Feb. 2001.

ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat Res**, v.6, n.3, p. 317-319, 2003.

RUIZ, A. P. *et al.* El papel de óxido nítrico em La hemodinâmica, hemostasia e inflamación. **Ev Cub Estomatol**, v. 34, p. 84-86, 1997.

SAGLAM, A. M.; BAYSAL, V.; CEYLAN, A. M. Nickel and cobalt hypersensitivity reaction before and after orthodontic therapy in children. **J Contemp Dent Pract**, v. 5, n. 4, p. 79-90, Nov. 2004.

SCHMALZ, G. Materials science: biological aspects. **J Dent Res**, v. 81, n. 10, p. 660-663, Oct. 2002.

SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. **J Dent**, v. 2 (Suppl22), p. S6-S11, 1994.

SCHULTZ, J. C. *et al.* Cutaneous and oral eruption from oral exposure to nickel in dental braces. **Dermatitis**, v. 15, n. 3, p. 154-157, Sept. 2004.

SESTINI, S. *et al.* In vitro toxicity evaluation of silver soldering, electrical resistance, and laser welding of orthodontic wires. **Eur J Orthod**, v. 28, n. 6, p. 567-572, Dec. 2006. Epub 2006 Oct 11.

SJÖGREN, G.; SLETTEN, G.; DAHL, J. E. Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by millipore filter, agar overlay, and MTT tests. **J Prosthet Dent**, v. 84, n. 2, p. 229-236, Aug. 2000.

STAFFOLANI, N. *et al.* Ion release from orthodontic appliances. **J Dent**, v. 27, n. 6, p. 449-454, Aug. 1999.

STOIKA, R. *et al.* In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. **Med Sci Monit**, v. 7, n. 4, p. 652-658, Jul.-Aug. 2001.

SUN, Z. L.; WATAHA, J. C.; HANKS, C. T. Effects of metal ions on osteoblast – like cell metabolism and differentiation. **J Biomed Mater Res**, v. 34, n. 1, p. 29-37, Jan. 1997.

TSUCHIYA, T. *et al.* Improved sensitivity and decreased sample size in a cytotoxicity test for biomaterials: a modified colony microassay using a microplate and crystal violet staining. **J Appl Biomater**, v. 5, n. 4, p. 361-367, 1994.

VAHEY, J. W.; SIMONIAN, P. T.; CONRAD, E. U. 3rd. Carcinogenicity and metallic implants. **Am J Orthop**, v. 24, n. 4, p. 319-324, Apr. 1995.

VALLANCE, P.; COLLIER, J. Biology and clinical relevance of nitric oxide. **BMJ**, v. 309, n. 6952, p. 453-457, Aug. 1994.

VAN HOOGSTRATEN, I. M. *et al.* Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. **J Invest Dermatol**, v. 101, n. 1, p. 26-31, Jul. 1993.

VAN HOOGSTRATEN, I. M. *et al.* Reduced frequency of nickel allergy upon oral nickel contact at an early age. **Clin Exp Immunol**, v. 85, n. 3, p. 441-445, Sept. 1991.

VITRAL, J. C. A. *et al.* Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de Óxido Nítrico: descrição de uma técnica. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, v. 8, n. 3, p. 359-365, 2008.

VREEBURG, K. J. *et al.* Induction of immunological tolerance by oral administration of nickel and chromium. **J Dent Res**, v. 63, n. 2, p. 124-128, Feb. 1984.

WATAHA, J. C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. **J Prosthet Dent**, v. 86, n. 2, p. 203-209, Aug. 2001.

WATAHA, J. C.; MALCOLM, C. T.; HANKS, C. T. Correlation between cytotoxicity and the elements released by dental casting alloys. **Int J Prosthodont**, v. 8, n. 1, p. 9-14, Jan./Feb. 1995.

WEINBERG, J. B. *et al.* Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **Blood**, v. 86, n. 3, p. 1184-1195, Aug. 1995.

WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J. O. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. **Nitric Oxide**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 1998.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J. R. W. **Animal cell culture**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2000. p. 175-219.

YAO, D.; VLESSIDIS, A. G.; EVMIRIDIS, N. P. Determination of nitric oxide in biological samples. **Mikroch Acta**, v. 147, p. 1-20, 2004.

ZIMMERMANN, H. P.; SCHIRRMACHER, V.; BENKE, R. Track formation in moving 3T3 cells associated with endocytosis of gold particles. **Eur J Cell Bio**, v. 36, p. 7-8, 1991.

2 ARTIGOS

2.1 ARTIGO 1

2.1.1 Artigo 1: Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 na presença de fios ortodônticos. (Parte I)

Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 na presença de fios ortodônticos. (Parte I)

Resumo:

Os objetivos deste estudo foram avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular com o ensaio MTT em uma linha de células de macrófagos murinos J774 com 9 diferentes fios ortodônticos e também seus efeitos na produção de óxido nítrico (NO) por esta linha de macrófagos. A viabilidade celular das culturas dos macrófagos J774 foi determinada pelo método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio-bromídico) com 9 diferentes fios ortodônticos. A produção de NO por estes macrófagos foi analisada pelo método de Griess. Culturas de células foram avaliadas em 24, 48 e 72 horas. Não houve diferença significativa para a viabilidade celular entre o controle e o grupo de fios nos intervalos de tempo analisados. Na comparação com o grupo controle, houve diferença significativa na produção de NO nos grupos 1, 6 e 9 no intervalo de 24 horas. O grupo 8 mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle no intervalo de tempo final. A viabilidade celular em todos os grupos foi maior no intervalo de tempo final, que no intervalo de tempo inicial. Este aumento foi significativo no grupo controle. Nos grupos dos materiais, a média final da viabilidade celular no tempo de 72 horas não mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo controle. A produção de NO em todos os grupos foi maior no intervalo de tempo final que no intervalo de tempo inicial. Este aumento foi significativo no grupo controle. Nos grupos dos

materiais, a média final da produção de NO apresentou diferença significativa apenas no grupo 8 (beta-titânio), quando comparado com o grupo controle.

1. INTRODUÇÃO

Como em outros campos da biotecnologia, a área dos materiais odontológicos enfrenta o desafio da ausência de biocompatibilidade, isto é, da coexistência dos materiais manufaturados com tecidos corporais e fluidos que devem permanecer no organismo humano por períodos de tempo variados sem agredir os tecidos moles. Raros materiais odontológicos, ou talvez nenhum, são integralmente inertes do ponto de vista biológico, pois contém uma variedade de componentes com potencialidade tóxica ou irritante (PHILLIPS, 1993; TSUCHIYA *et al.*, 1994). A biocompatibilidade caracteriza-se pela capacidade dos materiais de não promoverem ações tóxicas, irritantes, inflamatórias, alergênicas, mutagênicas ou carcinogênicas sobre os tecidos (ARVIDSON, COTTLER-FOX e FRIBERG, 1986; JACOBSEN e HENSTEN-PETTERSEN, 1989; VAHEY, SIMONIAN e CONRAD, 1995; SUN, WATAHA, HANKS, 1997).

O desenvolvimento de materiais biocompatíveis tem sido um dos principais desafios na área de saúde. Um dos principais parâmetros para a avaliação de resposta biológica e do potencial de dano ou morte celular são os testes de citotoxicidade, sendo este o primeiro teste de triagem usado para quase todos os materiais (ANUSAVICE, 2003).

O ambiente bucal possui as condições favoráveis para a colonização de um amplo número de microorganismos. A instalação do aparelho para a

realização dos tratamentos ortodônticos cria condições favoráveis para o acúmulo de resíduos alimentares e de microorganismos que podem provocar cáries e acentuar doenças periodontais pré-existentes. No microambiente da doença periodontal, além da presença de diferentes citocinas, tem sido observada a produção de NO, o qual age diretamente na manutenção da inflamação, bem como na destruição tecidual (GRIMSDOTTIR e HENSTEN - PETERSEN, 1993; BATISTA, 2001; ANHOURY *et al.*, 2002).

Uma vez que o ambiente bucal é particularmente favorável à biodegradação de metais devido às suas propriedades iônicas, térmicas, microbiológicas e enzimáticas pode ser presumido que o paciente está até certo ponto exposto a produtos do processo de corrosão. Estudos têm demonstrado que íons metálicos podem ser liberados de matérias metálicas como resultado da corrosão (DOBBS e MINSKI, 1980; BARRETT, BISHARA e QUINN, 1993; GRIMSDOTTIR, HENSTEN-PETERSEN e KULMANN, 1994; WATAHA, MALCOLM e HANKS, 1995; STAFFOLANI *et al.*, 1999).

Vários estudos sobre biocompatibilidade dos componentes dos aparelhos ortodônticos utilizaram diferentes linhagens celulares: fibroblasto gengival humano (ELIADES *et al.*, 1994; LOCCI *et al.*, 2000), osteoblastos, fibroblastos e ceratinócitos humanos (SESTINI *et al.*, 2006), macrófagos murinos J774 (VITRAL *et al.*, 2010a; VITRAL *et al.*, 2010b).

Locci *et al.*(2000) avaliaram *in vitro* o efeito dos componentes do aparelho ortodôntico expostos e não expostos ao fenômeno da corrosão sobre algumas funções celulares. Concluíram que o fio ortodôntico é o componente

mais biocompatível e o bráquete o menos biocompatível. Sestini *et al.* (2006) pesquisaram a citotoxicidade de dois tipos de fios ortodônticos com diferentes concentrações de Níquel e Manganês. Os resultados mostraram que estes não foram tóxicos para as células.

Noble *et al.* em 2008 afirmaram que o Níquel é um componente comum em muitos materiais ortodônticos e uma alergia ao Níquel é comumente observada na população, mais frequentemente em mulheres. Outros autores (VREEBURG *et al.*, 1984; VAN HOOGST RATEN *et al.*, 1991; VAN HOOGST RATEN *et al.*, 1993; ARTIK *et al.*, 2001; MORTZ *et al.*, 2002) relatam haver evidências de que a exposição bucal ao Níquel pode induzir tolerância imunológica a ele e, assim, reduzir a incidência de alergias.

A Organização Internacional de Padronização e o Conselho sobre Instrumentos, Equipamentos e Materiais Dentários da Associação Americana de Odontologia recomendam uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo* para estudar a biocompatibilidade de materiais, e, de acordo com as normas, os testes mais importantes para a avaliação inicial de materiais são os da viabilidade celular. Entre estes, o 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil tetrazólio-bromídico (MTT; Sigma, St. Louis, Mo) é um importante teste para determinar a citotoxicidade de materiais de diferentes origens em culturas celulares (HANKS, WATAHA e SUN, 1996).

Citotoxicidade também pode estar relacionada à liberação de moléculas por certo estímulo e causa alteração do tecido. Estudos têm relatado uma molécula potencialmente citotóxica, o NO, nos tecidos da cavidade oral e

seu envolvimento em doenças inflamatórias (LOHINAI e SZABO, 1998; MATEJKA *et al.*, 1998; BATISTA *et al.*, 2002). NO é uma molécula reguladora produzida principalmente por macrófagos ativados e ela é de suma importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Este gás parece ter efeitos benéficos, assim como prejudiciais. Efeitos benéficos podem incluir atividade antimicrobiana e a modulação imunológica. Seus efeitos prejudiciais são as ações citotóxicas para os tecidos adjacentes do hospedeiro, incluindo o osso alveolar (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991; KRÖNCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Os objetivos deste estudo foram avaliar *in vitro* a viabilidade celular com o teste de MTT em uma linhagem de células de macrófagos murinos J774 com 9 diferentes fios ortodônticos e também seus efeitos na produção de NO por esta linhagem de macrófagos.

2. MATERIAL E MÉTODO

A amostra do estudo consistiu de 3 fragmentos de 2 mm de comprimento de 9 tipos diferentes de fios ortodônticos (Quadro 1) com calibre de 0,017" x 0,025" para cada intervalo de tempo. Eles foram usados como comprados comercialmente e foram esterilizados com óxido de etileno.

Foi utilizada a linhagem celular de macrófagos murinos J774 A.1 (ATCC no. TIB-67, *American Type Culture Collection*, Manassas, Va), que foi colocada em uma garrafa de plástico (NUNC) com um meio de cultura suplementado (5% de soro fetal bovino, 50 UI por mililitro de penicilina, 1% de

aminoácido não essencial, e 2% de L-glutamina (*Gibco, Grand Island, NY*), e incubados a 37° C em 5% de dióxido de carbono. Após a transferência para um recipiente adequado, as células foram lavadas com centrifugação a 1200 rpm, por 10 minutos a 4° C.

Quadro 1

FIO	TIPO	FABRICANTE
1	Aço Inoxidável	Morelli Ortodontia
2		Highland Metals Inc.
3	Níquel Titânio superelástico	Morelli Ortodontia
4		3M Unitek
5	Níquel-Titânio termoativado	Morelli Ortodontia
6		3M Unitek
7	Beta-Titânio (TMA)	Orthometric
8		3M Unitek
9	NiTi superelástico estético	Eurodonto Orthodontic Products

Tipos e Fabricantes dos fios ortodônticos utilizados na amostra.

Para a determinação da viabilidade e contagem de células, foi usado o azul de Tripán em uma proporção de 1:1 (corante: meio de cultura) na câmara de Neubauer (WILSON, 2000).

Em placas de 96 poços foram cultivados 2×10^4 células J774/poço, em um volume de 100 μ L, ressuspensas em meio de cultura RPMI-suplementado. Os fragmentos de fios foram distribuídos, individualmente, nos poços e mantidos em cultura em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) com 5% de dióxido de carbono a 37° C. Após cada período de incubação, o sobrenadante foi coletado para posterior quantificação do NO e as células foram avaliadas quanto à citotoxicidade. O grupo controle consistiu de

macrófagos murinos J774, que foram cultivados em placas de 96 poços, sem a presença do material a ser testado.

Assim, após a coleta dos sobrenadantes, aos fragmentos dos fios e às células que permaneceram nos poços da placa foram acrescentados 90µl de RPMI completo e 10µl de solução MTT a 50mg/mL por poço. As células foram incubadas por 4 horas, à temperatura de 37°C em estufa de CO₂. Em seguida, a reação do MTT foi interrompida com 100µl/poço de solução álcool-ácido, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 570nm em leitor de microplacas (*Spectramax 190-Molecular Device, Sunnyvale, Calif*) (MOSMANN, 1983; WILSON, 2000).

Para a avaliação da produção de NO, 100 µL de sobrenadante, de cada poço, foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. A mesma quantidade de reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% α-naftiletilenoaminohidrócloro, e 2,5% ácido fosfórico) foi adicionada ao sobrenadante (GREEN *et al.*, 1982; YAO, VLESSIDIS e EVMIRIDIS, 2004). As concentrações de nitrito presentes nos sobrenadantes foram obtidas através da análise de regressão linear a partir da curva padrão, empregando-se diluições duplas seriadas de nitrito de sódio a partir de 200 µM até a 11^a diluição. A absorbância foi determinada a 540 nm, através do leitor de microplacas.

2.1 Análise Estatística

Na análise estatística foi empregado o teste de Mann-Whitney para comparar as médias de cada grupo de fio com o grupo controle em cada intervalo de tempo e os testes de Friedman e de Wilcoxon para analisar a

variação das médias do grupo controle e de cada grupo de fio nos tempos 24, 48 e 72 horas.

3 RESULTADOS

A Tabela I fornece as médias e os desvios padrões para a análise da viabilidade celular para cada material nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, os p valores do teste de Mann-Whitney para a comparação de cada material com o grupo controle, e os p valores do teste de Friedman teste e os p valores do teste de Wilcoxon para a comparação de viabilidade celular entre 24 e 48 horas, 24 e 72 horas e 48 e 72 horas para cada grupo.

Na análise da diferença entre os tempos dentro de cada grupo, o grupo controle apresentou $p < 0,05$ nos intervalos de tempo 24-48 horas e 24-72 horas. Os grupos de fios não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os intervalos de tempo estudados.

Não houve diferença estatisticamente significativa das médias da viabilidade celular entre o grupo controle e os grupos de fios nos respectivos tempos (24 horas, 48 horas e 72 horas).

A Tabela II fornece as médias e os desvios padrões para a análise da produção de NO, para cada material nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, os p valores do teste de Mann-Whitney para a comparação de cada material com o grupo controle, e os p valores do teste de Friedman e do teste de Wilcoxon para a comparação da produção de NO entre 24 e 48 horas, 24 e 72 horas e 48 e 72 horas para cada grupo.

Tabela 1

GRUPO	CONTROLE								
	24 hs			48 hs			72 hs		
Média	0,395			0,614			0,643		
Desvio Padrão	0,066			0,172			0,062		
p value (Mann-Whitney)	***			***			***		
Friedman Test				0,011					
24-48 hs				0,028					
Wilcoxon 24-72 hs				0,028					
48-72 hs				ns					

GRUPO	1			2			3		
	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs
Média	0,327	0,815	0,563	0,421	0,682	0,621	0,391	0,649	0,608
Desvio Padrão	0,060	0,178	0,038	0,126	0,086	0,005	0,025	0,263	0,041
p value (Mann-Whitney)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Friedman Test	ns			ns			ns		
24-48 hs	ns			ns			ns		
Wilcoxon 24-72 hs	ns			ns			ns		
48-72 hs	ns			ns			ns		

GRUPO	4			5			6		
	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs
Média	0,361	0,732	0,607	0,427	0,841	0,681	0,404	0,647	0,621
Desvio Padrão	0,028	0,036	0,191	0,054	0,300	0,036	0,068	0,101	0,004
p value (Mann-Whitney)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Friedman Test	ns			ns			ns		
24-48 hs	ns			ns			ns		
Wilcoxon 24-72 hs	ns			ns			ns		
48-72 hs	ns			ns			ns		

GRUPO	7			8			9		
	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs
Média	0,377	0,694	0,765	0,362	0,738	0,601	0,511	0,668	0,520
Desvio Padrão	0,007	0,012	0,235	0,039	0,145	0,128	0,237	0,046	0,071
p value (Mann-Whitney)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Friedman Test	ns			ns			ns		
24-48 hs	ns			ns			ns		
Wilcoxon 24-72 hs	ns			ns			ns		
48-72 hs	ns			ns			ns		

p valor < 0,05 – N de cada grupo, Média, desvio-padrão, p valor do teste de Mann-Whitney para a comparação da viabilidade celular dos macrófagos murinos para cada material em relação ao grupo controle em cada tempo; p valor do teste de Friedman e do teste de Wilcoxon para a comparação da viabilidade celular dos macrófagos murinos entre os tempos para cada grupo (ns = não significativo).

Tabela 2

GRUPO	CONTROLE								
	24 hs			48 hs			72 hs		
Média	0,583			2,250			3,848		
Desvio Padrão	0,367			0,426			2,043		
p value (Mann-Whitney)	***			***			***		
Friedman Test				0,006					
24-48 hs				0,028					
Wilcoxon 24-72 hs				0,028					
48-72 hs				ns					

GRUPO	1			2			3		
	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs
Média	1,763	2,718	3,362	1,576	2,376	2,372	0,729	2,195	3,182
Desvio Padrão	0,424	0,355	0,580	0,685	0,262	0,631	0,243	0,417	0,300
p value (Mann-Whitney)	0,024	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Friedman Test	ns			ns			ns		
24-48 hs	ns			ns			ns		
Wilcoxon 24-72 hs	ns			ns			ns		
48-72 hs	ns			ns			ns		

GRUPO	4			5			6		
	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs
Média	1,046	3,322	3,555	1,015	2,936	4,962	1,308	2,911	5,342
Desvio Padrão	0,422	0,922	0,269	0,169	0,940	2,841	0,350	0,762	1,255
p value (Mann-Whitney)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,048	ns	ns
Friedman Test	ns			ns			ns		
24-48 hs	ns			ns			ns		
Wilcoxon 24-72 hs	ns			ns			ns		
48-72 hs	ns			ns			ns		

GRUPO	7			8			9		
	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs	24 hs	48 hs	72 hs
Média	0,654	2,544	5,436	0,679	2,345	6,637	1,283	2,892	5,373
Desvio Padrão	0,372	0,847	1,158	0,335	0,328	0,711	0,347	0,898	0,637
p value (Mann-Whitney)	ns	ns	ns	ns	ns	0,048	0,048	ns	ns
Friedman Test	ns			ns			ns		
24-48 hs	ns			ns			ns		
Wilcoxon 24-72 hs	ns			ns			ns		
48-72 hs	ns			ns			ns		

p valor < 0,05 – N de cada grupo, Média, desvio-padrão, p valor do teste de Mann-Whitney para a comparação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos murinos para cada material em relação ao grupo controle em cada tempo; p valor do teste de Friedman e do teste de Wilcoxon para a comparação da produção de óxido nítrico pelos macrófagos murinos entre os tempos para cada grupo (ns = não significativo).

Na análise da diferença entre os tempos dentro de cada grupo, o grupo controle apresentou $p < 0,05$ nos intervalos de tempo 24-48 horas e 24-72 horas. Os grupos de fios não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os intervalos de tempo estudados.

Na comparação com o grupo controle houve diferença estatisticamente significativa na produção de NO nos grupos 1, 6 e 9 no tempo 24 horas. O grupo 8 apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle no tempo de 72 horas.

4 DISCUSSÃO

A primeira etapa para assegurar a biocompatibilidade de um material a ser utilizado em seres humanos na área de saúde é testar sua citotoxicidade. Esta pode ser avaliada através de três tipos de testes: *in vitro*, utilizando-se culturas celulares e *in vivo*, em experimentos com animais de laboratórios e, também, através de estudos clínicos. Um resultado negativo num teste *in vitro* sugere que o material está livre de liberar produtos danosos ou que a quantidade destes é insuficiente para causar efeitos agudos em grupos celulares isolados. Todavia, deve ficar claro que os testes de citotoxicidade constituem o primeiro passo na análise do material. Por outro lado, um teste de citotoxicidade positivo pode ser um sinal de que o material contém substâncias que são liberadas e com capacidade de causar danos ou interferir no metabolismo celular (WATAHA, 2001; SCHMALZ, 2002).

Além dos testes de citotoxicidade tradicionais, o estudo da produção de NO em relação a um material específico é outra maneira de determinar o potencial de toxicidade de um material, porque a citotoxicidade pode estar

relacionada a moléculas, que, após ser liberadas em resposta a um determinado estímulo, podem causar danos aos tecidos (BATISTA *et al.*, 2002).

Na análise da viabilidade celular as médias do grupo controle aumentaram de 24 horas para 48 horas e de 48 horas para 72 horas, sendo o aumento estatisticamente significativo nos intervalos 24-48 horas e 24-72 horas. Com exceção do grupo 7 que apresentou um comportamento semelhante ao grupo controle, as médias da viabilidade celular para os demais grupos apresentaram um aumento de 24 horas para 48 horas e uma redução de 48 horas para 72 horas. Todavia, em nenhum dos grupos estas variações foram estatisticamente significativas.

Verifica-se também que as médias da viabilidade celular dos grupos de matérias em cada um dos tempos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao grupo controle.

No grupo controle somente as células estavam presentes nos meios de cultura, permitindo que a proliferação celular se desse de maneira progressiva nos intervalos de tempo estudados, o que pode ser observado através das médias apresentadas pelo grupo e do aumento significativo destas médias nos tempos estudados. A introdução dos fragmentos metálicos nos meios de cultura pode levar a uma maior proliferação celular, já que os macrófagos J774 são células de resposta imunológica. Observa-se, portanto, que as médias de todos os grupos no tempo 48 horas são maiores que a média do grupo controle. No tempo 72 horas, porém, há uma diminuição na média da

viabilidade celular, mas em nenhum dos grupos esta viabilidade no tempo final apresenta diferença significativa em relação ao grupo controle.

Pelos resultados apresentados, nenhum dos grupos de fio ortodôntico demonstrou capacidade de afetar significativamente a proliferação celular, sendo, portanto, considerados não citotóxicos no presente teste.

De acordo com Abbas, Lichtman e Pillai (2007) a produção de NO pode ser considerada o resultado da fisiologia normal das células como os macrófagos e podem ser afetados por substâncias moduladoras imunes que podem aumentar ou diminuir a produção dessas moléculas. O NO surgiu como um importante modulador da função celular na saúde e na doença e pode ter efeitos tanto citotóxico quanto citoprotetor (WILEY, 2007).

Na análise da produção de NO as médias do grupo controle aumentaram de 24 para 48 horas e de 48 para 72 horas, sendo o aumento estatisticamente significativo nos intervalos 24-48 horas e 24-72 horas. Com exceção do grupo 2 no qual houve uma redução da média de 48 para 72 horas, todos os demais grupos apresentaram um comportamento semelhante ao grupo controle. Todavia, em nenhum dos grupos estas variações foram estatisticamente significativas.

No tempo de 24 horas, a produção de NO foi maior em todos os grupos de fios quando comparados com o grupo controle. No entanto, uma diferença estatisticamente significativa foi verificada somente nos grupos 1, 6 e 9. O contato entre o material e a célula pode estimular uma maior produção de NO, uma vez que os macrófagos ativados são os produtores primários dessa

molécula de grande importância na resposta imune e processos inflamatórios (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001). No período de 48 horas as médias de produção de NO não apresentaram diferença estatisticamente significativa em nenhum dos grupos. No tempo final, 72 horas, o grupo 8 (beta-Titânio ou TMA) apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($p = 0,048$).

Tanto na análise das médias da viabilidade celular quanto da produção de NO observa-se que no tempo final do estudo o único a apresentar diferença significativa em relação ao controle foi a média de produção de NO no grupo de fios beta-Titânio. Nos demais grupos diferenças não se fizeram presentes nem na viabilidade celular nem na produção do NO neste tempo final. Outros trabalhos sobre citotoxicidade de materiais ortodônticos apontam os fios como os componentes menos citotóxicos dos aparelhos ortodônticos (LOCCI *et al.*, 2000; SESTINI *et al.*, 2006).

Na literatura ortodôntica são encontrados relatos de reações alérgicas aos fios de Níquel-Titânio devido à presença do Níquel, Cobalto e Cromo (ROSE, JONAS e KAPPERT, 1998). Todavia os fios de NiTi avaliados no presente estudo não apresentaram nenhuma ação significativa sobre a proliferação celular ou sobre a produção de NO que possam sugerir citotoxicidade. Quanto aos fios de beta-Titânio que possuem na sua composição principalmente o Titânio e o Molibdênio, não há trabalhos relatando ações citotóxicas. O Titânio é utilizado nos implantes odontológicos devido à sua capacidade de osteointegração.

Com relação ao problema da corrosão que os fios podem apresentar no meio bucal, liberando produtos nocivos aos tecidos (DOBBS e MINSKI, 1980; BARRETT, BISHARA e QUINN, 1993; GRIMSDOTTIR, HENSTEN-PETTERSEN e KULMANN, 1994; WATAHA, MALCOLM e HANKS, 1995; STAFFOLANI *et al.*, 1999), estudos *in vivo* devem ser os de escolha para esta análise. Os testes de citotoxicidade, nos quais as células ficam em contato com os fragmentos de fios por até 72 horas em meios de cultura, não disponibilizam o tempo necessário para que o processo de corrosão tenha início. A ação mecânica da mastigação assim como a presença de microorganismos podem ser fatores que interagindo com os fios ortodônticos podem levar a reações nas quais o produto final pode ser prejudicial aos tecidos a eles associados.

5 CONCLUSÃO

1. Viabilidade celular em todos os grupos foi maior no intervalo de tempo final, que no intervalo de tempo inicial. Este aumento foi significativo no grupo controle.
2. Nos grupos dos materiais, a média final da viabilidade celular no tempo de 72 horas não mostrou diferença significativa quando comparado com o grupo controle.
3. A produção de NO em todos os grupos foi maior no intervalo de tempo final, que no intervalo de tempo inicial. Este aumento foi estatisticamente significativo no grupo controle.

4. Nos grupos dos materiais, a média final da produção de NO apresentou diferença significativa apenas no grupo 8 (beta-titânio), quando comparado com o grupo controle.

6 REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2007. 572 p

ANHOURY, P. *et al.* Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. **Angle Orthod**, v.72, n. 4, p. 338-343, Aug. 2002.

ANUSAVICE, K. J. **Phillips' science of dental materials**. 11th ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003.

ARTIK, S. *et al.* Tolerance to nickel: oral nickel administration induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity. **J Immunol**, v. 167, n. 12, p. 6794-6803, Dec. 2001.

ARVIDSON, K. *et al.* Cytotoxic effects of cobalt-chromium alloys on fibroblasts derived from human gingiva. **Scand J Dent Res**, v, 95, n. 4, p. 356-363, Aug. 1987.

BARRETT, R. D.; BISHARA, S. E.; QUINN, J. K. Biodegradation of orthodontic appliances. Part I. Biodegradation of nickel and chromium in vitro. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 103, n. 1, p. 8-14, Jan. 1993.

BATISTA, A. C. **Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico-sintase induzível (iNOS) em gengivites associadas à placa bacteriana e periodontites crônicas localizadas.** Bauru: USP, 2001.

BATISTA, A. C. *et al.* Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Dis**, v. 8, n. 5, p. 254-260, Sept. 2002.

DOBBS, H. S.; MINSKI, M. J. Metal ion release after total hip replacement. **Biomaterials**, v. 1, n. 4, p. 193-198, Oct. 1980.

ELIADES, T. *et al.* Surface characterization of ceramic brackets: a multitechnique approach. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 105, n. 1, p. 10-18, Jan. 1994.

GREEN, L. C. *et al.* Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 126, n.1, p. 131-138, Oct. 1982.

GRIMSDOTTIR, M. R.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Cytotoxic and antibacterial effects of orthodontic appliances. **Scand J Dent Res**, v. 101, n. 4, p. 229-231, Aug. 1993.

GRÍMSDÓTTIR, M. R.; HENSTEN-PETTERSEN, A.; KULLMANN, A. Proliferation of nickel-sensitive human lymphocytes by corrosion products of orthodontic appliances. **Biomaterials**, v. 15, n. 14, p. 1157-1160, Nov. 1994.

HANKS, C. T.; WATAHA, J. C.; SUN, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dent Mater**, v. 12, n. 3, p. 186-193, May. 1996.

JACOBSEN, N.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Occupational health problems and adverse patient reactions in orthodontics. **Eur J Orthod**, v. 11, n. 3, p. 254-264, Aug. 1989.

KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis**, v. 7, n. 1, p. 2-10, Jan. 2001.

KRÖNCKE, K. D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? **Nitric Oxide**, v. 1, n. 2, p. 107-120, Apr. 1997.

LOCCI, P. *et al.* Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. **J Biomed Mater Res**, v. 51, n. 4, p. 561-568, Sept. 2000.

LOHINAI, Z. M.; SZABO, C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. **Medical Science Monitor**, v. 4, p. 1089-1095, 1998.

MATEJKA, M. *et al.* Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J Periodontal Res**, v. 33, n. 8, p. 517-518, Nov. 1998.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-142, Jun. 1991.

MORTZ, C. G. *et al.* Nickel sensitization in adolescents and asociation with ear piercing, use of dental braces and hand eczema. The Odense Adolescence Cohort Study on Atopic Diseases and Dermatitis (TOACS). **Acta Derm Venereol**, v. 82, n. 5, p. 359-364, 2002.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

NOBLE, J. *et al.* Nickel allergy and orthodontics, a review and report of two cases. **Br Dent J**, v. 204, n. 6, p. 297-300, Mar. 2008.

PHILLIPS, R. W. **Materiais dentários**. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1993. p. 35-38.

ROSE, E. C.; JONAS, I. E.; KAPPERT, H. F. In vitro investigation into the biological assessment of orthodontic wires. **J Orofac Orthop**, v. 59, p. 253-264, 1998.

SCHMALZ, G. Materials science: biological aspects. **J Dent Res**, v. 81, n. 10, p. 660-663, Oct. 2002.

SESTINI, S. *et al.* In vitro toxicity evaluation of silver soldering, electrical resistance, and laser welding of orthodontic wires. **Eur J Orthod**, v. 28, n. 6, p. 567-572, Dec. 2006. Epub 2006 Oct 11.

STAFFOLANI, N. *et al.* Ion release from orthodontic appliances. **J Dent**, v. 27, n. 6, p. 449-454, Aug. 1999.

SUN, Z. L.; WATAHA, J. C.; HANKS, C. T. Effects of metal ions on osteoblast – like cell metabolism and differentiation. **J Biomed Mater Res**, v. 34, n. 1, p. 29-37, Jan. 1997.

TSUCHIYA, T. *et al.* Improved sensitivity and decreased sample size in a cytotoxicity test for biomaterials: a modified colony microassay using a microplate and crystal violet staining. **J Appl Biomater**, v. 5, n. 4, p. 361-367, 1994.

VAHEY, J. W.; SIMONIAN, P. T.; CONRAD, E. U. 3rd. Carcinogenicity and metallic implants. **Am J Orthop**, v. 24, n. 4, p. 319-324, Apr. 1995.

VAN HOOGSTATEN, I. M. *et al.* Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. **J Invest Dermatol**, v. 101, n. 1, p. 26-31, Jul. 1993.

VAN HOOGSTATEN, I. M. *et al.* Reduced frequency of nickel allergy upon oral nickel contact at an early age. **Clin Exp Immunol**, v. 85, n. 3, p. 441-445, Sept. 1991.

VITRAL, J. C. *et al.* In-vitro study of the cellular viability and nitric oxide production by J774 macrophages with ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 137, n. 2, p. 247-253, Feb. 2010.

VITRAL, J. C. *et al.* In-vitro study of cellular viability and nitric oxide production by J774 macrophages stimulated by interferon gamma with ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v. 137, n. 5, p. 665-670, May. 2010.

VREEBURG, K. J. *et al.* Induction of immunological tolerance by oral administration of nickel and chromium. **J Dent Res**, v. 63, n. 2, p. 124-128, Feb. 1984.

WATAHA, J. C. Principles of biocompatibility for dental practitioners. **J Prosthet Dent**, v. 86, n. 2, p. 203-209, Aug. 2001.

WATAHA, J. C.; MALCOLM, C. T.; HANKS, C. T. Correlation between cytotoxicity and the elements released by dental casting alloys. **Int J Prosthodont**, v. 8, n. 1, p. 9-14, Jan./Feb. 1995.

WILEY, J. W. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. **Neurogastroenterol Motil**, v. 19, p. 541-544, 2007.

WILSON, A. P. Cytotoxicity and viability assays. In: MASTERS, J. R. W. **Animal cell culture**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2000. p. 175-219.

YAO, D.; VLESSIDIS, A. G.; EVMIRIDIS, N. P. Determination of nitric oxide in biological samples. **Mikroch Acta**, v. 147, p. 1-20, 2004.

2.2 ARTIGO 2

2.2.1 Artigo 2: Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 estimulados com interferon-gama (IFN- γ) na presença de fios ortodônticos. (Parte II)

5 CONCLUSÃO

1. As médias da análise da viabilidade celular dos macrófagos murinos ativados com interferon-gama nos grupos dos fios ortodônticos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparada com a média das células do grupo controle.
2. As médias da análise da produção de óxido nítrico pelos macrófagos murinos ativados com interferon-gama nos grupos dos fios ortodônticos não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparada com a média das células do grupo controle.