

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Programa de Pós-Graduação em Saúde
Área de Concentração em Saúde Brasileira

ADRIANA ALVES SILVA

**EFEITO DE LIGADURAS ELÁSTICAS SOBRE A
VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE ÓXIDO
NÍTRICO EM CÉLULAS J774**

JUIZ DE FORA
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Programa de Pós-Graduação em Saúde
Mestrado em Saúde Brasileira
Núcleo de Pesquisa em Ortodontia e Odontopediatria

ADRIANA ALVES SILVA

**EFEITO DE LIGADURAS ELÁSTICAS SOBRE A VIABILIDADE
CELULAR E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774**

Dissertação de Mestrado apresentada ao 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 obtenção do título de Mestre em Saúde Brasileira.

Orientador: Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral
Co-Orientadora: Dr^a Ana Paula Ferreira

JUIZ DE FORA
Fevereiro – 2008

Silva, Adriana Alves.

Efeito de ligaduras elásticas sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células J744 / Adriana Alves Silva ; orientador: Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral ; co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira. - - 2008.
99 f.

Dissertação (Mestrado em Saúde Brasileira) –Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina, 2008.

1. Ortodontia. 2. Materiais dentários. 3. Viabilidade. I. Vitral, Robert Willer Farinazzo. II. Ferreira, Ana Paula. III. Título.

CDU 616.314-089.23

Adriana Alves Silva

**EFEITO DE LIGADURAS ELÁSTICAS SOBRE A VIABILIDADE
CELULAR E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774**

Dissertação de Mestrado apresentada ao 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 obtenção do título de Mestre em Saúde Brasileira. Aprovada em 20 de fevereiro de 2008.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Cátia Cardoso Abdo Quintão
Doutora em Ortodontia – UERJ

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ferreira
Doutora em Imunologia – UFJF

Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Souza
Doutora em Imunologia - UFJF

Suplentes:

Prof^a Dr^a Rosângela Almeida Ribeiro
Doutora em Odontopediatria – UFJF

Prof. Dr. Celso Neiva Campos
Doutor em Endodontia - UFJF

Fevereiro - 2008

À minha filha “Elis”, que encanta e enche de alegria todos os meus dias... Ao Caíto, que sempre esteve ao meu lado incentivando-me... Aos meus pais, Cida e Antônio, meus exemplos de vida...

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema, causa primeira de todas as coisas. Agradeço a presença, a força e serenidade nos momentos difíceis... Obrigada por iluminar meus pensamentos e alcançar esta importante etapa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral, coordenador do curso de Especialização em Ortodontia da Universidade Federal de Juiz de Fora, por todos os ensinamentos e pelo direcionamento na realização deste trabalho. Obrigada por ter me incentivado a ser mais questionadora e persistente e, sobretudo, contribuído para o engrandecimento da minha formação acadêmica.

À minha co-orientadora e coordenadora do Núcleo de Imunologia do PPgS/UFJF, Prof^a Dr^a Ana Paula Ferreira, pela paciência e zelo ao ensinar toda a parte experimental desta pesquisa, propiciando-nos novos conhecimentos, e por ter disponibilizado nosso acesso ao Laboratório de Imunologia.

À Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Souza, pelos conhecimentos compartilhados, pela atenção e auxílio fundamentais na elaboração do estudo. Meus sinceros agradecimentos e gratidão.

À querida Prof^a Dr^a Cátia Cardoso Abdo Quintão, pela excelente idéia que deu origem a esta dissertação, pelo constante incentivo e confiança em mim depositada.

Ao professor Dr. Luiz Cláudio Ribeiro, do Departamento de Estatística, da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo tratamento estatístico, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada.

À minha sogra, Regina Coeli de Andrade Oliveira, que com muito carinho e cuidado fez as correções de português de parte deste trabalho. Da ausência

saudosa, ficaram as boas lembranças, os bons exemplos... Serei eternamente grata por tudo...

Aos colegas dos cursos de Especialização, Mestrado e Doutorado, pelo acolhimento e pelos bons momentos compartilhados... Em especial, agradeço à amiga de turma Júlia Cristina de Andrade Vitral, por todo apoio, pelo carinho e amizade.

À Dr^a Marília de Pádua Dornelas Corrêa, pela disponibilização dos serviços da Clínica Plastic Center para a esterilização dos materiais utilizados neste estudo.

À secretária do curso de Especialização em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da UFJF – Ângela Maria de Oliveira Delgado, pela disponibilidade e presteza demonstradas ao longo deste período de convivência.

A todos que torceram por mim, apoiaram-me nos momentos mais sacrificantes e contribuíram de alguma forma para o pleno andamento deste trabalho.

“O conhecimento é a arte de acumular dados, a sabedoria reside na sua simplificação”.

Martin Fisher

RESUMO

Muitos estudos têm avaliado o comportamento das ligaduras elásticas em relação às suas propriedades físicas. No entanto, a biocompatibilidade destes materiais não se apresenta bem documentada na literatura. O presente estudo teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular de macrófagos murinos J774 na presença de ligaduras elásticas de diferentes marcas e cores e, analisar o efeito destas ligaduras na produção de óxido nítrico (NO) produzido por estas células, com e sem ativação de interferon-gama (IFN- γ), uma citocina pró-inflamatória. Para cada tempo estudado, foram utilizados 6 elos de ligaduras elásticas de 3 marcas diferentes (Morelli, GAC e TP) nas cores prata e transparente após esterilização com óxido de etileno. As placas de cultura de 96 poços, utilizadas no experimento, foram divididas em 2 metades. A primeira foi preenchida pelas células J774 resuspensas em meio RPMI suplementado juntamente com os elos de cada tipo de ligadura e células controle. A segunda metade foi completada com outros 6 elos dos mesmos tipos de ligaduras mantidos em culturas juntamente com 10 μ l de IFN- γ (5 ng/ml) e grupo controle. As placas foram incubadas em diferentes intervalos de tempo: 24, 48 e 72 horas. As células foram submetidas à avaliação da viabilidade celular através da técnica do MTT [3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide] e os sobrenadantes foram coletados para a análise da produção de NO, utilizando-se o método de Griess. Para análise dos resultados foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Na ausência do estímulo (IFN- γ), a viabilidade celular nos grupos de ligaduras foi maior no período final da avaliação em relação ao grupo controle. No entanto, 3 grupos de ligaduras (Morelli prata, Morelli transparente e GAC prata) exibiram proliferação significativa em 72 horas. As ligaduras da marca TP

Orthodontics (prata e transparente) não influenciaram de forma significativa a viabilidade celular e a produção de NO. Embora a ligadura Morelli prata tenha estimulado as células J774 a realizarem uma maior produção de NO, os outros tipos de ligaduras nos diferentes tempos avaliados não apresentaram diferenças significativas na produção de óxido nítrico em relação às células controle. Na presença do IFN- γ , houve uma redução significativa da viabilidade celular no tempo 48 horas para o grupo das ligaduras Morelli e GAC. Entretanto, uma média de viabilidade superior ao apresentado pelas células controle foi observada em todos os grupos de ligaduras no tempo 72 horas, sendo significativa para o grupo das ligaduras GAC transparente. O grupo das ligaduras TP foi o que apresentou comportamento semelhante ao grupo controle, apesar das ligaduras TP prata terem apresentado menor viabilidade em 24 horas. O IFN- γ proporcionou aumento significativo na produção de NO em todos os grupos no período final em relação ao inicial. As ligaduras Morelli transparente e GAC (prata e transparente) demonstraram a menor produção desta molécula nos 3 tempos analisados.

Palavras-chave:

1. Elastômeros sintéticos
2. Intereferon-gama
3. Ortodontia
4. Óxido nítrico
5. Viabilidade celular

SUMMARY

Although the physical properties of elastic ligatures have been the subject of several studies, the biocompatibility of these materials has not been well documented in the literature. This study was an *in vitro* investigation of the cellular viability of the murine macrophage J774 cell line in the presence of elastomeric ligatures of different brands and colors, and of nitric oxide (NO) production of these cells both, under the presence of such ligatures, and under the influence of a proinflammatory cytokine: gamma-interferon. After sterilization with ethylene oxide, 6 chains of ligatures of 3 different brands (Morelli, GAC e TP) and colors (silver and transparent) were used at each study time. The 96-well culture plates used in the experiment were divided in 2 halves. The first was filled with J774 cells resuspended in supplemented RPMI medium, along with the chains of each kind of ligature and control cells. The second half was filled with another 6 chains of the same kinds of ligatures, kept in J774 cell cultures in supplemented RPMI medium, along with 10µl of IFN-γ (5 ng/ml) and control cells. The plates were incubated at 24, 48, and 72 hours. The MTT [3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide] technique was used for cellular viability assessment, and the supernatants were collected for NO production analysis with the Griess method. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to analyze the results. Cellular viability in the elastomeric groups was higher at the final time point in relation to the control group. However, 3 elastomeric groups (silver Morelli, transparent Morelli and silver GAC) showed significant proliferation after 72 hours. TP-ligature-exposed cells had the same behavior of controls, no significant changes in cellular viability and NO production being found. Although silver Morelli ligatures led to higher NO production, the other types of ligatures did not

significantly affect NO production, as compared to control cells. In the presence of IFN- γ , Morelli and GAC ligatures led to a significant reduction of cellular viability after 48 hours. Yet a viability mean higher than that seen in control cells was observed for all ligatures after 72 hours, with transparent GAC showing significant proliferation. Cells exposed to TP ligatures had the same behavior of controls, although silver TP ligatures led to lower viability at 24 hours. Nitric oxide production was significantly greater in all groups at the final time point in relation to the initial time point. The transparent Morelli and silver and transparent GAC showed the smallest NO production at the 3 study time points.

Keywords:

1. Cellular viability
2. Elastomeric ligatures
3. Interferon-gamma
4. Nitric Oxide
5. Orthodontics

LISTA DE ABREVIATURAS

MTT - 3, (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

iNOS - óxido nítrico sintase induzida

IFN- γ – interferon-gama

LPS – lipopolissacarídeo

IL-1 – interleucina 1

TNF – fator de necrose tumoral

GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos

PMNs - polimorfonucleares

GC – grupo controle

FCS – soro fetal bovino

μM – micromol

DO – densidade ótica

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

RESUMO

SUMMARY

ABREVIATURAS

1. QUALIFICAÇÃO

1.1 INTRODUÇÃO	19
1.2 REVISÃO DA LITERATURA	22
1.2.1 Materiais Elastoméricos	22
1.2.2 Elastômeros Sintéticos	25
1.2.3 Biocompatibilidade dos materiais elastoméricos	30
1.2.4 Óxido nítrico: Citoproteção x citotoxicidade	34
1.3 OBJETIVOS	42
1.4 METODOLOGIA	43
1.4.1 Material estudado.....	43
1.4.2 Preparação e esterilização dos materiais.....	43
1.4.3 Cultura celular da linhagem de macrófagos murinos J774.....	44
1.4.4 Cultura de células na presença dos materiais.....	44
1.4.5.Células Controle.....	45
1.4.6 Teste de viabilidade celular (MTT – Thiazolyl blue test).....	45
1.4.7 Análise da produção do óxido nítrico.....	46

1.4.8 Tratamento estatístico	46
1.5 REFERÊNCIAS	48
2. ARTIGOS	55
2.1 - Artigo 1: Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de óxido nítrico: Descrição de uma técnica. Cytotoxicity assessment of dental materials with the MTT and nitric oxide production method – Description of a technique.....	56
2.2 – Artigo 2: Efeito de ligaduras elásticas sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células J774. Effect of elastomeric ligatures on the cellular viability and nitric oxide production of J774 cells	59
2.3 – Artigo 3: Efeito de ligaduras elásticas sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células J774 estimuladas pelo interferon-gama (IFN- γ). Effect of elastomeric ligatures on the viability cellular and nitric oxide production of gamma-interferon stimulated J774 cells.....	78
3 – ANEXOS	
3.1 – Anexo A: Carta de aceite – Artigo 1	99

QUALIFICAÇÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

ADRIANA ALVES SILVA

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE LIGADURAS ELÁSTICAS SOBRE A CITOTOXICIDADE E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774

Trabalho aprovado para obtenção de qualificação no Programa de Pós-Graduação em Saúde pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Robert Willer Farinazzo Vitral, Coordenador do Curso de Especialização em Ortodontia.

Departamento de Ortodontia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Prof^a Ana Paula Ferreira, Professora de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB).

Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Prof^a Cátia Cardoso Abdo Quintão, Professora do Curso de Especialização de Ortodontia e Coordenadora do Curso de Doutorado.

Departamento de Ortodontia, Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Juiz de Fora, 24 de junho de 2006

RESUMO

Embora a toxicidade de vários materiais ortodônticos tenha sido relatada na literatura, poucos são os trabalhos relacionados à citotoxicidade dos elastômeros. As ligaduras elásticas são mantidas no interior da cavidade bucal durante determinado período e, por esta razão, torna-se necessária a realização dos testes de biocompatibilidade. Os objetivos do estudo foram avaliar a citotoxicidade das ligaduras elásticas de diferentes marcas e cores, a partir de uma linhagem de macrófagos murinos J774, e quantificar o óxido nítrico produzido por estas células estimuladas pelas ligaduras, a fim de verificar se o óxido nítrico poderia estar participando do processo inflamatório e possíveis danos às células. As ligaduras elásticas, após esterilização prévia com óxido de etileno, transparentes e com coloração prata (GAC, TP e Morelli) serão inseridas em culturas de células J774 em meio RPMI suplementado. Serão incubadas em diferentes intervalos de tempo: 12, 24 e 48 horas. Os sobrenadantes serão coletados para posterior análise do óxido nítrico, e as células submetidas à avaliação da citotoxicidade. O efeito citotóxico das ligaduras será determinado através da técnica do MTT (Thiazolyl blue test) para se averiguar a viabilidade celular. A análise da produção de óxido nítrico será realizada utilizando-se o método de Griess, através da mensuração do nitrito (NO_2).

Palavras-chave:

1 - Citotoxicidade

3 - Ortodontia

2 - Elastômeros Sintéticos

4 - Óxido nítrico

1. INTRODUÇÃO

O uso de elásticos sintéticos na Ortodontia para auxiliar na movimentação dos dentes intra-arcos parece exceder o uso de elásticos derivados da borracha natural (DEGENOVA et al., 1985).

A busca por materiais que apresentassem características elásticas, porém com propriedades mecânicas melhores que as da borracha natural e seus derivados, levou ao estudo das borrachas sintéticas, mais precisamente denominadas elastômeros sintéticos (MORTON, 1995). Os materiais elastoméricos sintéticos mais utilizados atualmente na Ortodontia são os polímeros à base de poliuretano, entre eles as ligaduras elásticas e os elásticos em cadeia (STEVENSON, 1994; MORTON, 1995).

As ligaduras elásticas foram introduzidas na Ortodontia como uma alternativa para promover a amarração do arco aos bráquetes. Atualmente representam itens essenciais na prática ortodôntica, facilitando o trabalho do profissional por serem de rápida e fácil adaptação, bastante confortáveis para os pacientes e favorecendo sua motivação em relação ao tratamento ortodôntico por estarem disponíveis em uma variedade de cores (TALOUMIS et al., 1997).

A escolha dos materiais disponíveis para a Ortodontia depende de fatores relacionados às suas propriedades físicas, mecânicas e biológicas (TOMS, 1988).

Os materiais e acessórios utilizados na Odontologia podem causar efeitos adversos em situações clínicas. Os mecanismos pelos quais muitos efeitos são causados não são totalmente elucidados. O conhecimento em relação à composição dos materiais, suas propriedades alergênicas e irritantes e seus

efeitos tóxicos são essenciais para avaliação das etiologias dos sintomas clínicos a fim de se obter um diagnóstico correto (GRIMSDOTTIR, HENSTEN-PETTERSEN E KULLMANN, 1992).

Embora a toxicidade de vários materiais ortodônticos tenha sido relatada na literatura (TELL et al., 1988; GRIMSDOTTIR et al., 1992; GRIMSDOTTIR E HENSTEN-PETTERSEN, 1993; TANG et al., 1999; DAVID e LOBNER, 2004; ELIADES et al., 2004), poucos são os trabalhos relacionados à citotoxicidade dos elastômeros.

Muitos estudos têm avaliado o comportamento das ligaduras elásticas em relação à influência do pré-estiramento, oscilações de força, deformação permanente, elasticidade, absorção de água, despigmentação entre outras propriedades físicas muito abordadas (YOUNG e SANDRICK, 1979; BATY, STORIE e VONFRAUNHOFER, 1994; TALOUMIS et al., 1997; CARDOSO e MENDES, 2002). No entanto, são escassos os estudos que avaliam as propriedades biológicas e os possíveis efeitos tóxicos deste material.

A citotoxicidade pode também estar relacionada com moléculas, que, ao serem liberadas a partir de um determinado estímulo, podem ocasionar danos aos tecidos. Recentemente, alguns estudos (MATEJKA et al., 1998; BATISTA et al., 2002; TOZUM et al., 2005) têm relatado a presença de uma molécula com potencial citotóxico, denominada óxido nítrico em tecidos dentais e seu envolvimento em doenças inflamatórias bucais.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula reguladora, produzido principalmente por macrófagos ativados, de extrema importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Esta molécula gasosa pode apresentar efeitos benéficos, tais como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune. Por outro lado, quando presente em altas concentrações, pode

atuar como uma influente molécula citotóxica desencadeando prejuízos aos tecidos adjacentes, incluindo osso alveolar (KENDAL, MARSHALL E BARTOLD, 2001).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular (MTT assay) de uma linhagem de macrófagos murinos e quantificar a produção de NO gerado por estas células na presença de ligaduras elásticas de diferentes marcas e cores. Além disso, foi verificado se a presença do interferon-gama, uma citocina pró-inflamatória, na cultura celular em associação com estas ligaduras afetaria a viabilidade e produção de NO pela mesma linhagem de células.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Materiais elastoméricos

A movimentação ortodôntica é obtida a partir da aplicação de forças biomecânicas, que são forças induzidas clinicamente, cuja energia provém principalmente de dispositivos mecânicos planejados, como arcos, molas, elásticos derivados da borracha natural, elásticos sintéticos, parafusos entre outros. Estas forças, quando aplicadas na coroa de um elemento dental, produzem uma série de reações biológicas no ligamento periodontal que resultam no movimento do dente dentro do osso alveolar. (PROFFIT, 1995).

Na busca por mecanismos que produzam forças ótimas e possam ser usados na mecânica ortodôntica de maneira conveniente, foi introduzido o uso de materiais conhecidos como elásticos. Os materiais conhecidos por este nome genérico, podem ser divididos quanto à sua real natureza química (BILLMEYER, 1980).

Os elastômeros, termo mais correto para denominar estes materiais elásticos, possuem a capacidade de retornar rapidamente às suas dimensões originais após sofrerem uma deformação substancial, ou seja, uma capacidade de devolver a energia utilizada para causar uma momentânea alteração dimensional do material, agindo assim, de modo similar a uma mola (BILLMEYER, 1980). Os materiais elastoméricos são classificados como polímeros, ou seja, materiais cuja característica é a formação de cadeias que repetem uma estrutura química mais simples, apresentando alto grau de flexibilidade devido ao seu arranjo molecular

tridimensional em forma de rede e que permite uma movimentação de seus componentes sem que haja ruptura de suas ligações químicas. São polímeros de alto peso molecular, e suas ligações químicas contendo uma série de ligações cruzadas conferem a estes materiais um padrão amorfo quando não estão sofrendo algum tipo de tensão, podendo ser conformados de acordo com as necessidades. Estas ligações também conferem a estes materiais a elasticidade, principal qualidade que promove o seu uso na Ortodontia, porém restringindo a mobilidade das cadeias poliméricas, evitando que as mesmas se rompam (MILES e BRISTON, 1965; BILLMEYER, 1980). Se a cadeia polimérica for distendida ao ponto em que as ligações cruzadas cheguem à ruptura, ocorre uma deformação permanente, ou seja, o material elástico torna-se incapaz de retornar à sua dimensão original. Contudo, se o limite elástico não é excedido, após a liberação da força, o polímero retorna à condição passiva com restabelecimento das ligações secundárias. A configuração original não é completamente reobtida, pois algumas cadeias poliméricas distendidas deslizam irreversivelmente umas sobre as outras e um novo arranjo espacial é obtido (WONG, 1976; MATA e CHEVITARESE, 1997).

O primeiro elastômero utilizado amplamente em escala industrial foi a borracha natural. Os materiais chamados usualmente de borrachas são capazes de ser estirados, no mínimo, ao dobro de seu comprimento inicial e retornam rapidamente à quase totalidade do seu comprimento original. A borracha natural apresenta a fórmula química cis 1,4 poliisopreno e é produzida através do beneficiamento de uma substância denominada látex natural, obtida da árvore chamada seringueira, designada cientificamente de *Hevea brasiliensis* (MILES e BRISTON, 1965; MORTON, 1995).

Na Ortodontia, os primeiros elásticos utilizados por Angle e Case, no início do século XX, eram derivados da borracha natural. Porém, uma série de características como a absorção de líquidos e a fragilidade das suas ligações químicas levaram ao estudo de algumas alternativas que promovessem melhorias nas suas propriedades (MATA e CHEVITARESE, 1997). Após o advento do processo denominado vulcanização, inventado em 1839 por Charles Goodyear, as características da borracha natural foram substancialmente melhoradas em relação à resistência e capacidade elástica, difundindo seu uso geral e na Ortodontia (MILES e BRISTON, 1965; MORTON, 1995). O processo de vulcanização aumenta consideravelmente a quantidade de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas, resultando em maior resistência mecânica a forças aplicadas sobre o material. Este procedimento também diminui a plasticidade do mesmo, ou seja, a deformação permanente provocada por forças externas, sem prejuízo da elasticidade. O processo da vulcanização do látex envolve uma mistura do látex com estabilizadores e agentes químicos da vulcanização, aquecidos a uma temperatura de aproximadamente 70°C. Esses estabilizadores e agentes vulcanizadores de ligações cruzadas tais como o óxido de zinco, aceleradores de reações e enxofre são adicionados à borracha natural durante o aquecimento. Desta forma, este processo acrescenta componentes potencialmente tóxicos (PERRELLA e GASPARI, 2002).

Os agentes de vulcanização possibilitam a formação de uma estrutura tridimensional a partir das ligações cruzadas entre eles próprios e as moléculas do polímero. Aceleradores e ativadores são agentes químicos que misturados ao composto natural têm como função principal reduzir o tempo e a temperatura

necessários para obtenção de um elastômero com as propriedades físicas desejáveis (MILES e BRISTON, 1965).

Os elásticos à base de látex são usados no detalhamento final da oclusão, melhor engrenamento, e fixação da maxila e mandíbula após cirurgia ortognática (HANSON e LOBNER, 2004).

2.2 Elastômeros sintéticos

A busca por materiais que apresentassem características elásticas, porém com propriedades mecânicas melhores que as da borracha natural e seus derivados, levou ao estudo das borrachas sintéticas, mais precisamente denominadas elastômeros sintéticos. Esta busca associada à escassez dos derivados do látex, durante a 1ª Guerra Mundial, culminou na produção de materiais à base de poliuretano, um derivado do petróleo, que apresenta propriedades químicas e físicas muito superiores aos derivados da borracha natural (MILES e BRISTON, 1965; MORTON, 1995). Elástico de poliuretano é um termo genérico utilizado para designar os polímeros elásticos que apresentam ligações de uretanos (WONG, 1976). São obtidos através da união de pequenas cadeias de macromoléculas, formando outras ainda maiores. As cadeias menores geralmente são de dois tipos: poliéteres ou poliésteres. Normalmente, para que ocorram as ligações entre as moléculas menores, poliéteres ou poliésteres, torna-se necessário o uso de um agente reativo como o di-isocianeto. O tipo de cadeia menor utilizada e o método de transformação destas cadeias em polímeros com

cadeias mais extensas determinam as propriedades do polímero resultante (MORTON, 1995).

Os poliuretanos foram desenvolvidos por O. Bayer, na Alemanha, em 1937. São polímeros termoplásticos e permitem a fabricação de produtos finais por diversos métodos, inclusive por injeção em moldes e extrusão, que caracterizam os dois métodos utilizados atualmente na obtenção dos elásticos sintéticos empregados na Ortodontia. Os elásticos derivados dos poliuretanos, após as reações químicas de polimerização que os originam, apresentam-se como massas amorfas, cujas cadeias poliméricas possuem forças de tração relativamente fracas entre as mesmas e ligações químicas aleatoriamente localizadas ao longo destas cadeias. Para melhorar suas propriedades mecânicas, deve-se promover a união lateral entre as cadeias por ligações covalentes cruzadas, através do processo anteriormente descrito, denominado vulcanização ou cura. Deste modo, são formadas estruturas tridimensionais, transformando o produto maleável em um material muito resistente, porém elástico. As ligações provenientes da vulcanização ainda reduzem sua solubilidade a solventes orgânicos e aumentam sua resistência à deterioração pelo calor, luz e envelhecimento natural. A adição de certos agentes e compostos químicos em poliuretanos também complementam as propriedades provenientes do processo de cura. (MORTON, 1995).

Outro fenômeno responsável pelas excelentes propriedades finais destes materiais são os pontos de amarração distribuídos ao longo das cadeias lineares formadas pelos polímeros, que são reversíveis pelo calor ou por solventes, denominadas cadeias cruzadas virtuais (MORTON, 1995). Estas são ligações químicas não-covalentes, formadas dentro de uma mesma molécula ou entre

moléculas diferentes. Quimicamente são denominadas pontes de hidrogênio e força de van der Waals (HUGET e PATRICK, 1990). O que torna esta informação importante é o fato de que a força designada ao material proveniente destas ligações cruzadas virtuais não é obtida através da adição de carga como nas borrachas convencionais, e sim, determinada quimicamente pela composição interna dos materiais. E esta composição é determinada pelo grau de tecnologia empregada, refinamento da técnica de obtenção e pela qualidade das matérias-primas utilizadas durante a confecção do material (MORTON, 1995). Portanto, a qualidade do produto final, oferecido pelas empresas e utilizado clinicamente, depende fundamentalmente das técnicas e cuidados empregados no processo de fabricação.

Além disso, os polímeros sintéticos são muito sensíveis aos efeitos de radicais livres, principalmente ozônio e luz ultravioleta. A exposição aos radicais livres resulta na diminuição da flexibilidade e força de tensão do polímero. Os fabricantes têm adicionado antioxidantes e antiozonizantes para retardar esses efeitos e aumentar o período de validade dos elastômeros (WONG, 1976; YOUNG e SANDRICK, 1979).

É preciso reconhecer que a estrutura (morfologia) é um importante contribuidor para as propriedades e desempenho dos poliuretanos (MORTON, 1995).

O uso de elastômeros sintéticos na Ortodontia tem ganhado popularidade nos últimos anos (YOUNG e SANDRICK, 1979). A aplicação dos elastômeros poliuretanos nos materiais atualmente empregados na Ortodontia concentra-se, principalmente, na composição das ligaduras elásticas e na composição dos denominados elásticos em cadeia (BISHARA e ANDREASEN, 1970; WARE, 1971).

Apesar de as ligaduras elásticas e os elásticos em cadeia serem produtos do mesmo material, a aplicação clínica dos mesmos é diferente (TALOUMIS et al., 1997). As ligaduras elásticas são utilizadas para a amarração dos arcos aos bráquetes, substituindo em algumas situações os amarrilhos metálicos, e, os elásticos em cadeia são empregados no fechamento de diastemas, retração de caninos, correção de rotações e constrição do arco (BATY, STORIE e VONFRAUNHOFER, 1994).

Para prender os arcos aos bráquetes podem ser utilizadas ligaduras metálicas, bráquetes self-ligating ou ligaduras elásticas. As vantagens das ligaduras elásticas incluem sua aplicação rápida e fácil, são confortáveis para o paciente, baixo custo e estão disponíveis em várias cores (TALOUMIS et al., 1997). No entanto, possuem algumas desvantagens: quando estendidas e expostas ao meio oral, absorvem água e saliva, sofrem descoloração, os arcos podem não ficar completamente encaixados dificultando a correção de rotações e torques, redução considerável da força nas primeiras 24 horas (BATY, STORIE e VONFRAUNHOFER, 1994; TALOUMIS et al., 1997; CARDOSO e MENDES, 2002).

A força exercida pelas ligaduras elásticas parece depender da sua magnitude inicial, do período em que é aplicada e do valor de declínio da mesma. A força exercida pelas ligaduras elásticas no encaixe de todo arco não é tão alta quanto àquela produzida pelas ligaduras metálicas (TALOUMIS et al., 1997). Entretanto, Echols (1975) demonstrou que as ligaduras elásticas permitem movimento dentário durante mecânicas de deslizamento mais facilmente do que as metálicas.

Apesar da composição exata das ligaduras elásticas não ser revelada pelos fabricantes, normalmente são feitas à base de poliuretanos poliésteres

(WONG, 1976; YOUNG e SANDRICK, 1979). Estes poliuretanos não são polímeros diretos de uretanos, mas derivados de um processo de reações de poliésteres com di ou poliisocianetos para produzir uma estrutura complexa de ligações de uretano (YOUNG e SANDRICK, 1979).

Poucos materiais dentários, ou talvez nenhum, são totalmente inertes do ponto de vista fisiológico. Eles contêm uma variedade de componentes com potencialidades tóxicas ou irritantes (PHILLIPS, 1993).

Os poliuretanos industriais não são materiais inertes, decompõem-se sob contato prolongado com enzimas, umidade e água. A água tem agido como um plastificador do material polimérico através do enfraquecimento das forças intermoleculares, proporcionando a degradação química (HUGET e PATRICK et al, 1990). A análise de substâncias lixiviáveis, que são despreendidas do material, advindas de elastômeros estirados utilizados na Ortodontia tem apresentado um aumento, após 7 dias de carga sobre as amostras, quando imersas em água. Este efeito é devido à presença de éster ou éter nas ligações, os quais são altamente susceptíveis à hidrólise e são os primeiros componentes a serem afetados pelo ataque da água (SCHOLLENBERGER e STEWART, 1971).

Devido aos longos períodos em que as ligaduras elásticas permanecem na boca, torna-se necessário que sejam protegidas da hidrólise, da termo-oxidação, ataques microbiológicos, oxidação por raios ultra-violetas e ozônio e dióxido de nitrogênio. Por isso, compostos químicos tais como antioxidantes, peróxidos orgânicos, corantes, desumidificadores, lubrificantes e outros podem ser adicionados (WONG, 1976; YOUNG e SANDRICK, 1979; MORTON, 1995).

O manchamento dos materiais elastoméricos na cavidade oral pode ser atribuído ao preenchimento de espaços vazios na matriz do material elástico por

fluidos e resíduos bacterianos. Na tentativa de solucionar o problema, os fabricantes tentam mascarar-lo através da inclusão de cores metálicas, tornando a elasticidade e a força reduzidas (WONG, 1976).

A pigmentação destes produtos, criada pelos fabricantes com o intuito de aumentar a aceitação dos pacientes, gera a questão: se o pigmento afeta a estrutura (BRANTLEY e ELIADES, 2001) e a biocompatibilidade (HOLMES et al., 1993) do produto. Certos tipos de pigmentos e outros compostos têm sido incorporados pelas indústrias poliméricas para fornecer a cor. Entretanto, como já foi mencionado, a composição destes materiais é segredo industrial, e as informações em relação ao processo de pigmentação não estão disponíveis (BRANTLEY e ELIADES, 2001).

2.3 Biocompatibilidade dos materiais elastoméricos

A biocompatibilidade tem sido descrita como a capacidade de atuação do material com uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma aplicação específica. A presença de uma reação adversa deste material é chamada de toxicidade. A toxicidade dos materiais dentários pode ser avaliada através de testes *in vitro*, experimentos em animais ou estudos clínicos em humanos (SCHMALZ, 1994; POLYZOIS, 1994).

Estudos *in vitro* são aplicados, principalmente para avaliar a citotoxicidade (lesão em células) e a genotoxicidade (lesão em cromossomos ou aberrações cromossômicas). Comparando-se com experimentos animais e estudos clínicos em humanos, as vantagens do estudo de toxicidade *in vitro* incluem: condições de

experimento controladas, sensibilidade, baixo custo, rapidez e ausência de problemas éticos (SCHMALZ, 1994).

A alta sensibilidade do teste deve-se ao isolamento das células em culturas e à ausência de mecanismos protetores que assistem as células dentro do corpo (ALBERT e WALLIN, 1998).

Existem 2 razões primárias para se caracterizar os materiais e dispositivos médicos submetidos a uma avaliação biológica. A primeira é estabelecer a constituição do material, para que os resultados dos testes biológicos possam ser vinculados à formulação específica do material. A identificação destas características da composição pode, em certos casos, ser obtida das especificações dos fabricantes do produto. A segunda razão é determinar a presença e a natureza de quaisquer produtos químicos (incluindo processos contaminantes, resíduos e substâncias lixiviáveis do próprio material) que podem ser liberados e atingir o corpo humano (ALBERT e WALLIN, 1998).

Os testes de biocompatibilidade de materiais tornam-se um passo essencial na aceitação do material, juntamente com os testes que avaliam suas propriedades físicas (POLYZOIS, HENSTEN-PETTERSEN e KULLMANN, 1994). Um resultado negativo indicará que o material estará livre de produtos prejudiciais ou que sua quantidade é insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas do corpo. Entretanto, apesar do mérito do teste, não se pode afirmar que o material possa ser considerado biocompatível, uma vez que o teste de citotoxicidade *in vitro* foi o primeiro passo para análise do material em estudo. Por outro lado, um teste de citotoxicidade positivo pode ser um sinal de que o material contém uma ou mais substâncias que podem ser liberadas em contato com a água e apresentar alguma importância clínica (WALLIN e ARSCOTT, 1998).

Os testes de citotoxicidade *in vitro* devem quantificar a viabilidade celular e o crescimento, e serem correlacionados com os testes experimentais em animais e estudos clínicos. O mais importante no uso dos dados *in vitro* é clariar o mecanismo biológico sobre o qual um efeito é produzido. Experimentos em animais e estudos clínicos demonstram um fenômeno, mas não o mecanismo envolvido. Os sistemas *in vitro* são capazes de elucidá-los, pois diferentes aspectos do complexo sistema *in vivo* podem ser investigados separadamente *in vitro* (SCHMALZ, 1994).

Os efeitos citotóxicos de vários materiais ortodônticos têm sido relatados na literatura (TELL et al., 1988; GRIMSDOTTIR et al., 1992; GRIMSDOTTIR E HENSTEN-PETTERSEN, 1993; TANG et al., 1999; DAVID E LOBNER, 2004; ELIADES et al., 2004). Por outro lado, poucos são os trabalhos relacionados à biocompatibilidade dos elastômeros. A literatura médica freqüentemente tem avaliado a citotoxicidade do catéter urinário de látex. (RUUTU e TALJA, 1985). Embora os elásticos dentais não sejam tão invasivos quanto os catéteres, os testes de citotoxicidade precisam ser realizados para demonstrar a biocompatibilidade, uma vez que os elásticos são mantidos no interior da cavidade bucal durante determinado período (HWANG e CHA, 2003).

Ao analisar o efeito citotóxico e antibacteriano de aparelhos ortodônticos, Grimsdottir e Hensten-Pettersen (1993), sugeriram que o efeito citotóxico dos dispositivos pode contribuir para manifestação de gengivite localizada.

O efeito citotóxico é causado por um irritante primário, quando este está presente em uma concentração e tempo suficientes para desencadeá-lo. As reações podem variar de um eritema a necroses, dependendo da toxicidade do irritante primário, da sua concentração e do tempo de exposição. Evidentemente,

alguns dos materiais ortodônticos liberam quantidades suficientes de produtos de corrosão que podem causar efeitos citotóxicos locais. Do mesmo modo, ao se criarem mais locais para acúmulos de placa, os efeitos do material por si podem também contribuir para gengivite local relacionada a uma etiologia não tóxica. (GRIMSDOTTIR, HENSTEN-PETTERSEN e KULLMANN, 1992) Entretanto, é possível que os produtos de corrosão de um material possam causar prejuízos teciduais locais, que não poderiam ser distinguidos de uma gengivite de origem bacteriana. Técnicas utilizando culturas de células podem ser usadas para avaliar efeitos citotóxicos locais de materiais sólidos (SCHMALZ, 1994).

Segundo Schmalz (1994), o grande perigo do uso de elásticos intra-orais com potencial citotóxico seria o fato de que as substâncias liberadas pelos mesmos possam ser ingeridas pelo paciente e, ao longo do tempo, causar doenças pelo efeito acumulativo de substâncias tóxicas.

Hanson e Lobner (2004) avaliaram a neurotoxicidade de elásticos ortodônticos com látex e sem látex. Esses autores observaram que os elásticos com látex que sofreram incorporação de zinco em sua composição, durante o processo de vulcanização, apresentaram-se citotóxicos quando comparados aos elásticos sem látex. Os autores sugeriram que a toxicidade dos elásticos com látex possa ter sido mediada pela liberação de zinco.

Hwang e Cha (2003), ao compararem elásticos de látex com elásticos de silicone, observaram que os elásticos incolores (*TP Orthodontics*) à base de látex e o elástico à base de silicone (JEPE) apresentaram maior viabilidade celular em relação aos outros grupos. Entretanto, o grupo referente ao elástico com látex (Energy Pak – Rocky Mountaim Orthodontics) apresentou a maior citotoxicidade.

Holmes et al. (1993) analisaram os possíveis efeitos citotóxicos dos corantes usados na fabricação de elásticos intra-orais. Os resultados do estudo indicaram que tanto os elásticos incolores quanto os coloridos exibiram efeitos citotóxicos em condições experimentais *in vitro*. Entretanto, a análise *in vivo* realizada a partir de fibroblastos gengivais obtidos de gengivectomias de indivíduos com boa higiene oral, demonstrou que esses efeitos indesejáveis não foram observados.

Ao avaliarem a citotoxicidade de elásticos extra-orais, Wigg et al. (1997), notaram que os elásticos extra-orais da marca comercial Morelli apresentaram-se citotóxicos quando autoclavados previamente ao ensaio de citotoxicidade. Ao passo que os elásticos extra-orais da marca *American Orthodontics* mostraram-se biocompatíveis, nas mesmas condições.

O material ideal a ser usado na cavidade oral seria aquele que não causasse dano à polpa e aos tecidos moles. Não deveria conter substâncias tóxicas que, ao serem liberadas, se difundissem e fossem absorvidas pelo sistema circulatório, causando problemas de ordem sistêmica. O material também não poderia conter agentes com potencialidade sensibilizante que induzissem ao aparecimento de respostas alérgicas. Finalmente, não deveria apresentar potencial carcinogênico (PHILLIPS, 1993).

2.4 Óxido nítrico: citoproteção x citotoxicidade

Desde 1987, o óxido nítrico (NO) tem sido reconhecido como uma molécula que apresenta várias funções estando envolvido nos processos de inflamação,

resposta imune, metabolismo ósseo e apoptose (MONCADA et al., 1991; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

O NO pode apresentar efeitos benéficos tais como a atividade microbicida e a modulação da resposta imune (KRONCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997). Por outro lado, podem ocorrer efeitos destrutivos como sua ação citotóxica nos tecidos adjacentes, incluindo o osso alveolar (KRONCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001 e MURRELL, 1995).

O NO é uma molécula gasosa sintetizada a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado por isoenzimas, globalmente denominada NO sintases (NOS) (KRONCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997). Existem muitos tipos de células que produzem NOS. Estas enzimas são classificadas em três tipos: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzida (iNOS). A produção destas isoformas parece ser tecido-específica. A NOS endotelial é produzida pelas células endoteliais e osteoclastos, e a iNOS é identificada em fibroblastos, macrófagos e células vasculares (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001; CONNELLY et al 2003).

As enzimas NO sintases (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese do NO. A eNOS e nNOS são constitutivas ou basais (cNOS) e produzem baixas concentrações de NO por um curto período de tempo. Entretanto, a iNOS, é expressa em estímulos inflamatórios, sendo produzida pelos macrófagos e células polimorfonucleares em alta quantidade e por longo período de tempo. Quando o NO é produzido localmente em altas concentrações, pode agir como uma molécula citotóxica ou citotástica contra células infectadas por fungos, bactérias, protozoários, bem como células tumorais e células próximas à região de produção de NO, podendo resultar em extensa destruição

tecidual. O NO tem uma importante atuação sobre a regulação do metabolismo ósseo, agindo diretamente sobre as células clásticas (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

A maior diferença entre a atividade da cNOS e iNOS não está na concentração de NO gerado por enzima, mas na duração (horas, dias) que o NO é produzido. Além disso, a quantidade da enzima iNOS em todas as células ativadas pode ser muito maior que cNOS. Desta forma, a citotoxicidade normalmente correlaciona-se com o produto da iNOS e não com aquele produzido pelas outras duas cNOS (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

A iNOS é produzida pelos macrófagos, que participam como células iniciadoras da resposta imunológica, assim como linfócitos B e células dendríticas. Essas células sintetizam citocinas que influenciam como co-sinal de ativação para os linfócitos. Ao mesmo tempo, têm uma função crucial na produção de moléculas pró-inflamatórias tais como o oxigênio reativo, mediadores lipoderivados e o óxido nítrico. A ampla distribuição dos macrófagos por todo o organismo permite que essas células entrem em contato com qualquer agente infeccioso que por ventura consiga atravessar as barreiras externas e atingir os tecidos internos (FERREIRA e TEIXEIRA, 2005).

Após reconhecer as células-alvo ou outros antígenos, as células fagocíticas são ativadas para ingerí-las e destruí-las com oxidantes reativos e enzimas hidrolíticas. Dois tipos de sinais são muito importantes para a ativação de células fagocíticas: presença de antígenos-alvo e citocinas específicas (STOIKA et al., 2001). Dentre as citocinas, o interferon-gama (IFN- γ) foi caracterizado como o principal ativador de macrófagos. O IFN- γ induz a produção de peróxido de nitrogênio, óxido nítrico e outras moléculas tóxicas responsáveis pela atividade

microbicida dos macrófagos. O fator de necrose tumoral (TNF α e β) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) também promovem aumento da atividade dos macrófagos, assim como produtos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) – um constituinte da membrana externa das bactérias Gram-negativas (FERREIRA e TEIXEIRA, 2005).

Macrófagos ativados apresentam alterações morfo-fisiológicas profundas como aumento de aderência e espraiamento sobre superfícies como vidro ou plástico, modificações bioquímicas e enzimáticas, liberação de metabólitos tóxicos de oxigênio e potencialização das funções fagocítica, microbicida e citotóxica (FERREIRA e TEIXEIRA, 2005).

Recentemente, muitos estudos têm relatado que macrófagos ativados podem produzir alta quantidade de NO e exercem sua toxicidade de maneira NO-dependente (HIBBS et al., 1988).

Níveis elevados desta molécula gasosa (NO) provocam prejuízos via mecanismos de citotoxicidade, incluindo reações de oxidação e nitratação, inibição enzimática, injúrias ao DNA e ativação de ciclooxigenases e metaloproteínases (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Diferentemente dos outros mensageiros intercelulares, o NO não se liga a receptores, é uma molécula instável, sua meia-vida dura alguns segundos e seu efeito é transitório e local. O NO pode atuar como mensageiro intercelular tão bem quanto ser envolvido no metabolismo intracelular (LANCASTER, 1997). Assim como os hormônios esteroidais, o NO é capaz de se difundir diretamente através da membrana plasmática das células-alvo, alterando a atividade das enzimas intracelulares e causando danos às células (COOPER e HAUSMAN, 2004).

O NO pode ainda reagir com outras biomoléculas, intra ou extracelular, formando compostos citotóxicos. Ele reage rapidamente com o ânion superóxido (O_2^-), produzindo o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), que é responsável por alguns de seus efeitos tóxicos (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

A citotoxicidade mediada por NO ocorre provavelmente em combinação com a ação de metaloproteinases e colagenases liberadas por macrófagos ativados, polimorfonucleares (PMNs) e fibroblastos residentes (KRONCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Muitos danos ao DNA mediados pelo NO podem provocar a morte celular via apoptose ou necrose. A necrose resulta na lise celular, com liberação do conteúdo celular e inflamação. No entanto, a apoptose resulta na fragmentação do DNA e condensação do conteúdo da célula, com a formação de corpos de membranas limitados, os quais são fagocitados. (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Torna-se difícil conciliar a complexidade aparente das interações do NO com outras biomoléculas em seu duplo desempenho. A atuação precisa do NO como agente citotóxico e protetor não é totalmente entendida. Embora o NO seja importante na defesa e homeostase do hospedeiro, é também considerado danoso e tem sido envolvido na patogênese de uma ampla variedade de doenças inflamatórias e auto-imunes (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

A resposta inflamatória é autolimitada. Entretanto, quando a inflamação é desregulada ou quando o fator inicializador persiste, como ocorre na doença periodontal, a inflamação pode conduzir a um excessivo prejuízo tecidual (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Os componentes e produtos bacterianos agredem o tecido periodontal adjacente, induzindo à formação de um infiltrado inflamatório intenso, com predominância de polimorfonucleares (PMNs), plasmócitos, linfócitos e macrófagos, bem como a síntese, secreção e ativação de uma série de mediadores químicos pró-inflamatórios como citocinas (fator de necrose tumoral (TNF α e β), interferon (IFN- γ), fator de crescimento fibroblástico) e óxido nítrico (MATEJKA et al., 1998).

In vivo, NOS são detectáveis em macrófagos obtidos de indivíduos com infecções, inflamações ou sob condições de estresse. *In vitro*, em culturas de macrófagos é possível produzir NO após a estimulação dos mesmos, com lipopolissacarídeos (LPS) e com uma variedade de citocinas (RIMBACH et al., 2000; REIS et al., 2001). Uma produção excessiva de NO pela enzima iNOS é responsável pela vasodilatação e hipotensão observadas no choque séptico e inflamação.

A presença de eNOS e iNOS tem sido demonstrada em tecidos dentais. Além disso, observa-se um aumento do nível de iNOS gengival durante a inflamação periodontal, quando comparada com tecidos gengivais não inflamados (LAPPIN et al., 2000).

A presença de altas quantidades de L-arginina e L-citrulina em tecido gengival inflamado *in vivo* (MATEJKA et al., 1998) e a expressão de iNOS em macrófagos, linfócitos, e polimorfonucleares em periodontites induzidas experimentalmente em ratos (LOHINAI et al, 1998), bem como em fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e células endoteliais em periodontite humana (LAPPIN et al, 2000), revelam a possível participação do NO na doença periodontal. Assim sendo, a presença deste gás, na doença periodontal pode

refletir a participação de um mediador adicional na regulação da reabsorção óssea, responsável pela progressão da doença. (BATISTA et al., 2002).

Em tecidos humanos, Matejka et al. (1998) demonstraram níveis estatisticamente elevados de NOS, do substrato L-arginina e do produto final da reação L-citrulina em amostras de tecidos gengivais inflamados.

A indução da iNOS pode também inibir a proliferação de fibroblastos e induzir à apoptose celular (GANSOUGE et al, 1997) contribuindo para o desequilíbrio entre destruição e reparo tecidual, característica da periodontite (KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

Outro estudo recente relacionado ao óxido nítrico e seu papel na inflamação foi realizado por Tozum et al (2005). Os autores analisaram o metabolismo do NO ao redor de implantes e seu possível impacto na gravidade da inflamação peri-implantes. Ao analisar 34 implantes, observaram que a produção de NO aumentou com a presença e a gravidade da inflamação, demonstrando a contribuição do NO em processos inflamatórios peri-implantes. Os autores sugeriram ainda que a carga aplicada ao implante possa refletir em um impacto no metabolismo do NO, uma vez que foram observadas alterações da concentração de nitrito no fluido sucular peri-implante, o que indica a provável atuação desta molécula no remodelamento e adaptação óssea ao redor de implantes dentais.

Alguns estudos têm procurado investigar o efeito da fagocitose na indução da síntese do NO em macrófagos. Corradin, Buchmuller-Rouiller & Mael (1991) sugeriram que a fagocitose, incluindo a ingestão de partículas tais como grãos de látex, permitiu a indução da atividade da NOS em macrófagos murinos. Entretanto, Green et al. (1990) encontraram que a ingestão de zymosan ou grãos

de látex por macrófagos murinos não foi efetiva na indução da NOS e na conseqüente produção de NO.

Cunha et al. (1993), demonstraram que a fagocitose por si só não foi suficiente como um co-sinal para a indução da NOS em macrófagos murinos da linhagem J774. No entanto, estas células ao serem estimuladas com LPS, zimosan em combinação com IFN- γ expressaram altos níveis de NOS após 12 horas de estimulação.

Por outro lado, a atuação do NO na fagocitose induzida pela hidroxiapatita, um material utilizado para restaurar a arquitetura óssea, em uma linhagem de macrófagos murinos (RAW264.7) foi avaliada por Gopinath et al (2005). Eles observaram que a fagocitose induzida por partículas de látex propiciou uma produção significativamente maior de NO quando comparada à fagocitose induzida pela hidroxiapatita na linhagem de macrófagos murinos utilizada no estudo.

A redução da produção de NO é importante em 3 aspectos. Primeiro como já foi mencionado, uma alta quantidade de NO liberado por macrófagos ativados pode ser responsável por injúrias às células e prejuízos aos tecidos. Segundo, a produção simultânea de superóxido e NO resulta numa formação rápida de peroxinitrito pelos macrófagos (RIMBACH et al, 2000). Estes radicais causam diversas reações químicas nos sistemas biológicos e promovem danos a macromoléculas e tecidos. Além disso, exibem uma ação citotóxica direta contra células em cultura. O terceiro ponto baseia-se no fato de que os radicais livres, o NO e seus derivados são denominadores-chave na carcinogênese (MAEDA e AKAIKE, 1998).

3 OBJETIVOS:

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar a biocompatibilidade de materiais utilizados em Ortodontia;

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular (MTT assay) de uma linhagem de macrófagos murinos J774 na presença de ligaduras elásticas de diferentes marcas e cores;
- Analisar o efeito das ligaduras elásticas na produção de óxido nítrico (NO), pela linhagem de macrófagos murinos J774;
- Verificar se a presença do interferon-gama, uma citocina pró-inflamatória, na cultura celular em associação com estas ligaduras afetaria a viabilidade celular e produção de NO pela mesma linhagem de células;

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material estudado

A amostra foi constituída de 6 elos de ligaduras elásticas ortodônticas do tipo modular nas cores prata e transparente de cada uma das seguintes marcas comerciais: GAC International (Islândia, NY), TP Orthodontics (LaPorte, USA) e Morelli (Sorocaba, SP) para cada tempo estudado (24h, 48h e 72h), no experimento sem estímulo de IFN- γ e, as mesmas quantidades no experimento com IFN- γ . Os elásticos utilizados eram de um mesmo lote e foram obtidos diretamente dos fabricantes, sendo mantidos em suas embalagens plásticas originais sob refrigeração e ao abrigo da luz até o início do experimento, eliminando assim, eventuais alterações causadas por variações na temperatura e luminosidade.

4.2 Preparação e esterilização dos materiais

As ligaduras elásticas foram cuidadosamente removidas dos módulos com o auxílio de uma tesoura, para eliminar a possibilidade de dano às estruturas das ligaduras elásticas durante o procedimento.

A esterilização dos materiais foi realizada com óxido de etileno, com o intuito de eliminar possíveis contaminações, e, conseqüentemente resultados inverídicos. Posteriormente, os elásticos foram manipulados no fluxo laminar a fim de se resguardar todas as condições de esterilidade.

4.3 Cultura Celular da linhagem de macrófagos murinos J774

Foram utilizadas células da linhagem murina J774 A.1 (ATCC nº.TIB-67) mantidas em cultura no laboratório de Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Esta linhagem de macrófagos foi mantida em garrafa plástica de cultura (NUNC) em meio suplementado, com 5% de soro fetal bovino (FCS - fetal calf serum), 50UI/ml de Penicilina, 1% de aminoácido não-essencial e 2% de L-Glutamina (Gibco/BRL). As células foram conservadas em incubadora com 5% de CO₂, numa temperatura de 37°C. Após 5 dias, as células foram transferidas para um recipiente adequado e lavadas através de centrifugação a 1200 rpm, durante 10 minutos a 4°C. A contagem e a viabilidade celular foram efetuadas usando a técnica padrão de contagem com o corante azul de Tripán, em uma proporção de 1/1 (corante/meio de cultura), em câmara de Neubauer (WILSON, 2000).

4.4 Cultura de células na presença dos materiais

Em placas de cultura de 96 poços, foram cultivadas 2×10^4 células J774/poço resuspensas em um volume de 100µl de meio de cultura RPMI suplementado. As placas utilizadas foram divididas em 2 metades. A primeira foi preenchida pelas células J774 resuspensas em meio RPMI suplementado juntamente com os elos de cada tipo de ligadura e células controle (1º experimento, sem estímulo - IFN-γ). A segunda metade foi completada com outros 6 elos dos mesmos tipos de ligaduras mantidos em culturas juntamente com 10µl de IFN-γ (5 ng/ml) e grupo controle (2º experimento, na presença do

IFN- γ). As placas foram deixadas em cultura em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) à 37°C, com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado para posterior quantificação do óxido nítrico e as células foram submetidas à avaliação da viabilidade celular após a remoção do material.

4.5 Células controle

O Grupo controle foi constituído de macrófagos murinos da linhagem J774, depositados em placas de 96 poços, sem a presença dos materiais elásticos. O interferon-gama foi adicionado ao grupo controle relacionado ao experimento realizado na presença do estímulo. As células controle foram importantes para acompanhar o desenvolvimento das células em geral, caso existisse algum tipo de contaminação ou falhas no processo de incubação, assim como serviram de parâmetro de normalidade com relação à viabilidade celular e a produção de NO.

4.6 Teste de viabilidade (MTT – Thiazolyl Blue Test)

Após a retirada dos sobrenadantes, foi acrescentado 90 μ l de meio RPMI suplementado e 10 μ l da suspensão de MTT (50mg/ml) às células e ligaduras que permaneceram nos poços da placa. As placas foram incubadas por 4 horas à 37°C em estufa de CO₂. Após este período, a reação de MTT foi bloqueada com 100 μ l/poço de solução álcool-ácido. Em seguida, permaneceram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. As ligaduras elásticas foram removidas com

o auxílio de uma pinça estéril e a leitura foi realizada a 570nm utilizando-se um leitor de microplacas (Spectramax 190, Molecular Device) (WILSON, 2000).

4.7 Análise da produção do óxido nítrico

A produção do NO foi estimada através do acúmulo do nitrito (NO_2^-) que é o produto de conversão estável do óxido nítrico. A mensuração foi efetuada usando o método de Griess (GREEN *et al.*, 1982; CORRADIN *et al.*, 1991; REIS *et al.*, 2001; GOPINATH *et al.*, 2005). Depois dos respectivos tempos, 100 μl do sobrenadante de cada poço da placa de cultura, foram transferidos para uma placa de 96 poços. Foi acrescentado a tais sobrenadantes, a mesma quantidade do reagente de Griess (1% sufamilamida, 0,1% N- (1-naftil) – etilina diamina hidróclorido, 2,5% H_3PO_4). As concentrações de nitrito 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 (MOSMANN, 1983). A absorbância foi determinada a 540nm, através do leitor de microplacas (Spectramax 190-MOLECULAR DEVICE).

4.8 Tratamento estatístico

A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney comparando os valores obtidos de cada grupo de ligação com o grupo controle. Houve ainda a comparação entre os intervalos analisados (24-48 horas; 48-72 horas e 24-72 horas) para cada grupo testado. Os valores de “p” menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significantes. Esta análise

estatística foi empregada nas 2 condições experimentais – na presença do interferon-gama e na ausência desta citocina.

5 REFERÊNCIAS

1. ANDREASEN, G. F., BISHARA, S. E. Comparison of elastik chains with elastics involved with intra-arch molar to molar forces. **Angle Orthod.**, Appleton, v. 40, n. 3, p. 151-158, Jul. 1970.
2. BATISTA, A.C., SILVA, T.A., CHUN, J.H., LARA, V.S. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Dis.**, v.8, n. 5, p. 254-260, Sep. 2002.
3. BATY, D. L., STORIE, D. J, VONFRAUNHOFER, J. A. Synthetic elastomeric chains: a literature review. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 105, n. 6, p. 536-542, Jun. 1994.
4. BATY, D. L., VOLZ, J. E., VONFRAUNHOFER, J. A. Force delivery properties of colored elastomeric modules. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 6, n. 1, p. 40-46, Jul. 1994.
5. BILLMEYER, F.N. Jr. **Textbook of polymer science**. 3^a. ed. New York: John Wiley & Sons, 1980. 578 p.
6. BRANTLEY, W.A., ELIADES T., **Orthodontic Materials**. 1^a. ed. New York: Thieme Stuttgart, 2001. p. 174-187.
7. CARDOSO, M. A., MENDES, A. M. Avaliação das forças liberadas por elásticos ortodônticos em cadeia esterilizados com soluções de glutaraldeído. **Ortodontia Gaúcha**, v. 5, n. 2, p. 100-11, Jul. / Dez. 2002.
8. CONNELLY, L., JACOBS, A.T., PALACIOS-CALLENDER, M., MONCADA, S., HOBBS, A.J. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. **J Biol Chem**, v. 278, p.26480-26487, 2003.
9. COOPER G.M., HAUSMAN R.E., **The cell a molecular approach**. 3^a. ed. Washington DC: ASM press, 2004. p. 545-570.

10. CORRADIN, S.B., BUCHMULLER-ROVILLER, Y., MAUEL, J. Phagocytosis enhances murine macrophages activation by interferon- γ and tumor necrosis factor- α . **Eur. J. Immunol.**, v. 21, p.2553, 1991.
11. CUNHA, F.Q., ASSREUY, J., MONCADA S., LIEW, F.Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **Immunology**, v.79, p. 408-411, Feb. 1993.
12. DAVID, A., LOBNER, D. In vitro cytotoxicity of orthodontic archwires in cortical cell cultures. **Eur. J. Orthod. Soc.**, v.26, n.4, p. 421-426, 2004.
13. ECHOLS, M.P. Elastic ligatures, binding forces and anchorage taxation. **Am. J. Orthod.**, v. 67, p. 219, 1975.
14. ELIADES, T., ELIADES, G, WATTS, D.C., Structural conformation of vitro and in vivo-aged orthodontic elastomeric modules. **Eur. J. Orthod.**, v. 6, n.21, p.649-658, 1999.
15. ELIADES, T., PRATSINIS, H., KLETSAS, D., ELIADES, G., MAKOU, M. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloy. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 125, n. 1, p. 24-29, Jan. 2004.
16. FERREIRA, A.P., TEIXEIRA, H.C. **Tópicos de Imunologia Básica**. 1^a. ed. Juiz de Fora: Do autor, 2005. 83 p.
17. GANSAUGE, S., GANSAUGE, F., NUSSLER, A.K. Exogenous, but not endogenous nitric oxide increases proliferation rates in senescent human fibroblast. **FEBS Lett.**, v. 410, p. 160-164, 1997.
18. GENOVA, D.C.D., McINNIS-LEDOUX, P., WEINBERG, R., SHAYE, R. Force degradation of orthodontic elastomeric chains – a product study. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v.87, n.5, p.377-384, May 1985.
19. GOPINATH, V.K., MUSA, M., SAMSUDIN, A.R., LALITHA, P., SOSROSENO, W., Role of nitric oxide in hydroxyapatite-induced phagocytosis by murine macrophage cell line (RAW 264.7). **Arch. of Oral Biol.**, in press, 2005.
20. GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGWISKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

21. GREEN, S.J., CRAWFORD, R.M., HOCKMEYER, J.T., MELTZER, M.S., NACY C.A. Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . **J. Immunol.**, v.145, p.4290, 1990.
22. GRIMSDOTTIR, M.R., HENSTEN-PETTERSEN, A., KULLMANN, A. Cytotoxicity effect of orthodontic appliances. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St Louis, v.14, n.1, p. 47-53, 1992.
23. GRIMSDOTTIR, M.R., HENSTEN-PETTERSEN, A. Cytotoxicity and antibacterial effects of orthodontic appliances. **Scand. J. Dent. Res.**, v.101, n.4, p. 229-231, 1993.
24. HANSON, M., LOBNER, D. In vitro neuronal cytotoxicity of látex and nonlátex orthodontic elastics. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St Louis, v.126, n.2, p. 65-70, July 2004.
25. HOLMES, J., BARKER, M.K., TUNCAY, O.C. Cytotoxicity of orthodontics elastics. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v. 104, n.2, p. 188-191, Aug. 1993.
26. HUGET, E. F.; PATRICK, K. S. Observations on the elastic behavior of a synthetic orthodontic elastomer. **J. Dent. Res.**, v. 69, n. 2, p. 496-501, Nov. 1990.
27. HWANG, C.J., CHA, J.Y. Mechanical and biological comparison of látex and silicone rubber bands. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St Louis, v.124, n.4, p. 379-386, Oct. 2003.
28. JEFFERIES, C.; VON FRAUNHOFER, J. The effects of 2% alkaline glutaraldehyde solution on the elastic properties of elastomeric chain. **Angle Orthod.**, v. 61, p. 25-30, 1991.
29. KENDALL, H.K., MARSHALL, R.L; BARTOLD, P.M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, v.7, n.1, p. 2-10, Jan. 2001.
30. KRONCKE, K., FEHSEL, K., KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotein – How, why, when, and where? **Nitric Oxide**, v.1, n.2, p.107-20, Jan. 1997.

31. LANCASTER, J.R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. **Nitric Oxide**, v.1, n.1, p. 18-30, Feb. 1997.
32. LAPPIN, D.F., KJELDSEN, M., SANDER, L., KIANE, D.F. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J. Periodont Res**, v. 35, n.6, p. 369-373, Dec. 2000.
33. LOHINAI, Z.M., SZABO, C. Role of nitric oxide physiology and pathophysiology of periodontal tissues. **Med. Sci. Monit.**, v.4, n.6, p. 1089-1095, 1998.
34. MAEDA, H., AKAIKE, T., Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation and cancer. **Biochemistry**, v. 63, p. 854-865, 1998.
35. MATEJKA, M., ULM, C., PARTYKA J. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J. Periodontal Res**, v. 33, n. 8, p. 517-8, Nov. 1998.
36. MATTA, E. N. R.; CHEVITARESE, O. Avaliação laboratorial da força liberada por elásticos plásticos. **Rev SBO**, v. 3, n. 4, p. 131-36, Ago. 1997.
37. MATTA, E. N. R.; CHEVITARESE, O. Deformação plástica de elásticos ortodônticos em cadeia: estudo in vitro. **Rev SBO**, v. 3, n. 5, p. 188-92, Ago. 1997.
38. MILES, D.C., BRISTON, J.H. **Polymer technology**. London: Temple Press Books, 1965. 444 p.
39. MONKADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, E.A., Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p.109-142, 1991.
40. MORTON, M. **Rubber technology**. 3^a. ed. Londres: Chapman & Hall, 1995. 638 p.
41. MURRELL, G.A., JANG, D., WILLIAMS, R.J., Nitric oxide activates metalloproteinase enzyme in articular cartilage. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v.206, n.1, p.15-21, Jan. 1995.
42. PAYNE, G. S. Sterilization and disinfection in the orthodontic office: a practical approach. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 91, p. 250-2, 1988.

43. PERRELLA, F.W., GASPARI, A.A. Natural rubber latex protein reduction with an emphasis on enzyme treatment. **Methods**, v. 27, p. 77-86, 2002.
44. PHILLIPS, R.W. **Materiais Dentários**, 9^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p. 35-38.
45. POLYZOIS, G., HENSTEN-PETTERSEN, A. An assessment of the physical properties and biocompatibility of three silicone elastomers. **J. Prosth. Dent.**, v. 71, n. 5, p. 500-504, May, 1994.
46. PROFFIT, W.R. **Ortodontia contemporânea**, 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1995. 596 p.
47. REIS, D.S., SOUZA, M.A., MINEO, J.R., ESPINDOLA, F.S. Myosin V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . **Braz. J. of Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 221-226, 2001.
48. RIMBACH, G., PARK, Y.C., GUO, Q., MOINI, H., QURESHI, N., SALIOU, C., TAKAYAMA, K., VIRGILI, F., PACKER, L. Nitric oxide synthesis and TNF- α secretion in Raw 264.7 macrophages; mode of action of a fermented papaya preparation. **Life science**, v.67, p. 679-694, 2000.
49. RUUTU, M., ALFTHAN, O., TALJA, M., ANDERSON, L.C. Cytotoxicity of latex urinary catheters. **Br. J. Urol.**, v.57, p.87-87, 1985.
50. SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials – advantages and limitations. **J. Dentistry**, v.22, n.2, p. 6-11, 1994.
51. SCHOLLENBERGER, C.S., STEWART, F.D. Thermoplastic polyurethane hydrolysis stability. **Journal of Elastoplastics**, v.3, p.28-56, 1971.
52. STEVENSON, S.J., KUSY, P.R. Force application and decay characteristics of untreated and treated polyurethane elastomeric chains. **Angle Orthod.**, Appleton, v. 64, n.6, p.455-467, Apr. 1994.
53. STOIKA, R.S., YAKYMOVYCH, I.A., ANTOMENKO, S.V. Transforming growth factors and HIV infection possible interrelations. **Med. Biol. & Envir.** V. 24, p. 61-69, 1996.

54. TALOUMIS, J.L., SMITH, T.M., HONDRUM, S.O., LORTON, L. Force decay and deformation of orthodontic elastomeric ligatures. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v. 11, n.1, p. 1-11, Jan. 1997.
55. TANG, A.T.H., LIU, Y., BJÖRKMAN, L., EKSTRAND, J. In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St Louis, v.116, n.2, p. 132-138, Aug. 1999.
56. TELLS, R.T. et al, Long-term cytotoxicity of orthodontics direct-bonding adhesives. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, v. 93, p. 419-22, 1988.
57. TOMS, A.P. The corrosion of orthodontic wire. **Eur. J. Orthod**, v.10, p.87-97, 1988.
58. TOZUM, T.E., TURKYILMAZ, I., YAMALIK, N., TUMER, C., KILINE, A., KARABULUT, E., ERATAY, K. Analysis of the possible impact of inflammation severity and early and delayed loading on nitric oxide metabolism around dental implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.20, n.4, p. 547-556, Aug. 2005.
59. WALLIN, R.F., ARSCOTT, E.F. A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity. **Medical Device & Diagnostic Industry Magazine**, April, 1998.
60. WARE, A. L. Some properties of plastics modules used for tooth movement. **Aust. Orthod. J.**, Sidney, p. 200-2002, Feb. 1971.
61. WIGG, M.D., MENEZES, L.M., QUINTÃO, C.C.A., MOREIRA, T.C., CHEVITARESE O. Elásticos extra-orais: avaliação da citotoxicidade. **Ortodontia Gaúcha**, v. 1, n. 2, Maio/Dez. 1997.
62. WONG, A.K. Orthodontic elastic materials. **Angle Orthod**, v. 46, n. 2, p. 196-205, Apr. 1976.
63. YOUNG, J., SANDRIK, J.L. The influence of preloading on stress relaxation of orthodontic lastic polymers. **Angle Orthod.**, Appleton, v.49, n.2, p. 104-109, Apr. 1979.

Artigos

2 – ARTIGOS

2.1 - Artigo 1: Aceito para publicação na Revista: Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada

Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica.

Cytotoxicity assessment of dental materials with the MTT and nitric oxide production method – Description of a Technique.

2.2–Artigo 2: Artigo submetido – Revista Dental Press

Efeito de ligaduras elásticas sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células J774

Effect of elastomeric ligatures on the cellular viability and nitric oxide production of J774 cells.

2.3 – Artigo 3: Artigo submetido

Efeito de ligaduras elásticas sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células J774 estimuladas pelo interferon-gama – (IFN- γ)

Effect of elastomeric ligatures on the cellular viability and nitric oxide production of gamma-interferon stimulated J774 cells.

2.1 - AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE MTT E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO: DESCRIÇÃO DE UMA TÉCNICA

(CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF DENTAL MATERIALS WITH THE MTT AND NITRIC OXIDE PRODUCTION METHOD – DESCRIPTION OF A TECHNIQUE)

JULIA CRISTINA DE ANDRADE VITRAL
PÓS-GRADUANDA – MESTRADO EM SAÚDE BRASILEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ADRIANA ALVES SILVA
PÓS-GRADUANDA – MESTRADO EM SAÚDE BRASILEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

MARIA APARECIDA DE SOUZA
MESTRE E DOUTORA EM IMUNOLOGIA
PROFESSORA VISITANTE – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ANA PAULA FERREIRA
MESTRE E DOUTORA EM IMUNOLOGIA
PROFESSORA ASSOCIADA – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ROBERT WILLER FARINAZZO VITRAL
MESTRE E DOUTOR EM ORTODONTIA
PROFESSOR ASSOCIADO – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

CORRESPONDÊNCIA: JULIA CRISTINA DE ANDRADE VITRAL – javitral@acessa.com

AV. BARÃO DO RIO BRANCO, 2595/1604 – 36010 907 – (32)32323596 - JUIZ DE FORA – MG

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE MTT E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO: DESCRIÇÃO DE UMA TÉCNICA

RESUMO: **Introdução:** Um dos problemas apresentados pelos materiais utilizados em odontologia está associado à biocompatibilidade, já que poucos são totalmente inertes do ponto de vista biológico. Os materiais a serem usados em contato com tecidos humanos devem, portanto, ser testados com o objetivo de simular reações biológicas e ajudar no entendimento das respostas obtidas. Os estudos *in vitro* constituem a primeira etapa destes testes. **Objetivo:** Apresentação de uma metodologia de avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método MTT e da análise da produção de óxido nítrico (NO), o qual está relacionado com a ação destes materiais na indução da resposta inflamatória. **Conclusão:** Verifica-se nesta metodologia que o ensaio de MTT pode ser facilmente adaptado para testes de citotoxicidade de materiais de diferentes composições e a mensuração da produção de óxido nítrico através do método de Griess fornece dados adicionais para a análise da citotoxicidade.

DESCRITORES: Macrófagos, Materiais Dentários, Testes Imunológicos de Citotoxicidade, Óxido Nítrico.

TITLE: CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF DENTAL MATERIALS WITH THE MTT AND NITRIC OXIDE PRODUCTION METHOD – DESCRIPTION OF A TECHNIQUE

ABSTRACT: **Introduction:** One of the problems presented by dental materials is their biocompatibility, once just few are fully biologically inert. Materials intended to have contact with human tissues must thus be tested, aiming to simulate biological reactions and understand the responses obtained. The first stage in the testing process is based on *in vitro* studies, that allow for quick results, improvement of protocol standardization, and production of quantitative and comparative data. Besides, because of their sensitivity, such tests identify toxic materials that can then be discarded prior to animal use. As a complex *in vivo* phenomenon, cytotoxicity produces a wide range of effects such as cell death and even metabolic aberrations. Cytotoxicity

testing is the first step towards biocompatibility assurance of any material, cell culture being the most widely used experimental system. **Objective:** This work aims to present a method for assessing the cytotoxicity of dental materials, based on the MTT and nitric oxide (NO) production analysis. MTT [3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide] is a water-soluble tetrazolium salt used for assessment of cell metabolism, and NO is related to the induction of the inflammatory response by dental materials. **Conclusion:** The MTT assay may be easily adapted for cytotoxicity testing of materials of different compositions. Measurement of NO production through the Griess method yields additional data regarding cytotoxicity.

DESCRIPTORS: Macrophages; Dental Materials; Cytotoxicity Tests Immunologic; Nitric Oxide.

2.2 – ARTIGO SUBMETIDO: REVISTA DENTAL PRESS (PROTOCOLO Nº 01508)**EFEITO DE LIGADURAS ELÁSTICAS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E
PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774****EFFECT OF ELASTOMERIC LIGATURES ON THE CELLULAR VIABILITY AND
NITRIC OXIDE PRODUCTION OF J774 CELLS**

ADRIANA ALVES SILVA
PÓS-GRADUANDA – MESTRADO EM SAÚDE BRASILEIRA/ NÚCLEO EM ORTODONTIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

MARIA APARECIDA DE SOUZA
MESTRE E DOUTORA EM IMUNOLOGIA
PROFESSORA VISITANTE – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ANA PAULA FERREIRA
MESTRE E DOUTORA EM IMUNOLOGIA
PROFESSORA ASSOCIADA – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ROBERT WILLER FARINAZZO VITRAL
MESTRE E DOUTOR EM ORTODONTIA
PROFESSOR ASSOCIADO – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

CORRESPONDÊNCIA:ADRIANA ALVES SILVA– alves_orto@yahoo.com.br/Tel: (32)3554-1659

R. OLEGÁRIO MACIEL, 676/301 BAIRRO: SANTA HELENA - 36015-350 – JUIZ DE FORA/MG

EFEITO DE LIGADURAS ELÁSTICAS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774

RESUMO: Muitos estudos têm avaliado o comportamento das ligaduras elásticas em relação às suas propriedades físicas. No entanto, a biocompatibilidade destes materiais não se apresenta bem documentada na literatura. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular de uma linhagem de macrófagos murinos J774 e quantificar o óxido nítrico (NO) produzido por estas células na presença de ligaduras elásticas de 3 marcas diferentes (Morelli, GAC e TP) nas cores prata e transparente. Os elos destas ligaduras foram mantidos em culturas de células J774 em meio RPMI suplementado nos tempos: 24 48 e 72 horas. As células foram submetidas à avaliação da viabilidade celular através da técnica do MTT [3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide] e os sobrenadantes foram coletados para a análise da produção de NO, utilizando-se o método de Griess. Para análise dos resultados foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. A viabilidade celular nos grupos de ligaduras foi maior no período final da avaliação em relação ao grupo controle. No entanto, 3 grupos de ligaduras (Morelli prata, Morelli transparente e GAC prata) exibiram proliferação significativa em 72 horas. As ligaduras da marca TP Orthodontics (prata e transparente) não influenciaram de forma significativa a viabilidade celular e a produção de NO. Embora a ligadura Morelli prata tenha estimulado as células J774 a realizarem uma maior produção de NO, os outros tipos de ligaduras nos diferentes tempos avaliados não apresentaram diferenças significativas na produção de óxido nítrico em relação às células controle.

PALAVRAS-CHAVE: Elastômeros sintéticos, Ortodontia, Óxido Nítrico e Viabilidade celular.

EFFECT OF ELASTOMERIC LIGATURES ON THE CELLULAR VIABILITY AND NITRIC OXIDE PRODUCTION OF J774 CELLS

SUMMARY: Although the physical properties of elastic ligatures have been the subject of several studies, the biocompatibility of these materials has not been well documented in the literature. The present study was aimed at assessing, *in vitro*, the cellular viability of the murine macrophage J774 cell line in the presence of elastomeric ligatures of 3 different brands (Morelli, GAC e TP) and colors (silver and transparent), and quantified the nitric oxide (NO) production by these macrophages under such ligatures. The chains of the ligatures were kept in J774 cell cultures, in RPMI medium supplemented at 24, 48, and 72 hours. The MTT [3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide] technique was used for cellular viability assessment and the supernatants were collected for NO production analysis with the Griess method. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to analyze the results. Cellular viability in the elastomeric groups was higher at the final time point in relation to the control group. However, 3 elastomeric groups (silver Morelli, transparent Morelli and silver GAC) showed significant proliferation after 72 hours. TP-ligatures-exposed cells had the same behaviour of controls, no significant changes in cellular viability and NO production being found. Although silver Morelli ligatures led to higher NO production, the other types of ligatures did not significantly affect NO production, as compared to control cells.

KEY-WORDS: Elastomeric ligatures, Cellular viability, Nitric Oxide, Orthodontics.

INTRODUÇÃO

Na odontologia, a crescente preocupação em relação à biocompatibilidade tem atraído o interesse de pesquisadores de diversas especialidades, entre as quais a

Ortodontia. Desenvolver e selecionar materiais biocompatíveis têm sido um dos principais desafios¹. Vários materiais como aço inoxidável, compósitos, cimentos de ionômero de vidro e elastômeros, são utilizados para permitir o tratamento ortodôntico das maloclusões.

Os materiais elastoméricos sintéticos mais utilizados atualmente na Ortodontia são os polímeros à base de poliuretano, entre eles as ligaduras elásticas e os elásticos em cadeia^{18,22}. As ligaduras elásticas foram introduzidas na Ortodontia como uma alternativa para promover a amarração do arco aos bráquetes. Atualmente, representam itens essenciais na prática ortodôntica, facilitando o trabalho do profissional por serem de rápida e fácil adaptação, bastante confortáveis para os pacientes e favorecendo sua motivação em relação ao tratamento ortodôntico por estarem disponíveis em uma variedade de cores²⁴. Apesar da composição exata das ligaduras elásticas não ser revelada pelos fabricantes, normalmente são feitas à base de poliuretanos poliésteres^{29, 30}. Estes poliuretanos não são polímeros diretos de uretanos, mas derivados de um processo de reações de poliésteres com di ou poliisocianetos para produzir uma estrutura complexa de ligações de uretanos³⁰.

Devido aos longos períodos em que as ligaduras elásticas permanecem na boca, torna-se necessário que sejam protegidas da hidrólise, da termo-oxidação, ataques microbiológicos, oxidação por raios ultra-violetas e ozônio e dióxido de nitrogênio. Por isso, compostos químicos tais como antioxidantes, peróxidos orgânicos, corantes, desumidificadores, lubrificantes e outros podem ser adicionados^{18, 29, 30}.

Os testes de biocompatibilidade são essenciais na aceitação do material, juntamente com os testes que avaliam suas propriedades físicas^{4, 26}. A toxicidade é um dos principais parâmetros para a avaliação da resposta biológica e do potencial relacionado com a dose do material para causar a morte das células ou tecidos. Os testes de citotoxicidade são recomendados para todos os materiais usados na área de saúde¹. Evidentemente, alguns dos materiais ortodônticos liberam quantidades suficientes de produtos de corrosão que podem causar efeitos citotóxicos locais. Do

mesmo modo, ao se criarem mais locais para acúmulos de placa, os efeitos do material por si podem também contribuir para gengivite local relacionada a uma etiologia não tóxica⁹. Entretanto, é possível que os produtos de corrosão de um material possam causar prejuízos teciduais locais, que não poderiam ser distinguidos de uma gengivite de origem bacteriana. Técnicas utilizando culturas de células podem ser usadas para avaliar efeitos citotóxicos locais de materiais sólidos²¹.

Os modelos de estudos “in vitro” são uma alternativa imprescindível na pesquisa de citotoxicidade de materiais. Permitem uma rápida avaliação, melhoram os protocolos padronizados, produzem dados quantitativos e comparáveis¹⁷. Os testes de citotoxicidade “in vitro” devem quantificar a viabilidade celular e o crescimento e serem correlacionados com experimentos em animais e estudos clínicos²¹.

A citotoxicidade pode também estar relacionada com moléculas, que, ao serem liberadas a partir de um determinado estímulo, podem ocasionar danos aos tecidos. 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^{17, 25}.

O NO é uma molécula gasosa sintetizada a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado por isoenzimas, globalmente denominada NO sintases (NOS)^{14, 15}. É uma molécula reguladora, produzido principalmente por macrófagos ativados, de extrema importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Esta molécula gasosa pode apresentar efeitos benéficos, tais como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune. Por outro lado, quando presente em altas concentrações, pode atuar como uma influente molécula citotóxica desencadeando prejuízos aos tecidos adjacentes, incluindo osso alveolar¹⁴.

Algumas células que atuam na resposta imunológica são capazes de produzir NO incluindo macrófagos/monócitos²⁷. Os Macrófagos desempenham um papel crucial tanto na imunidade natural quanto na imunidade adquirida. Eles fagocitam desde tecidos

próprios que estejam lesados ou mortos, como eritrócitos, até partículas estranhas, como macromoléculas e antígenos. Uma outra função diz respeito à secreção de enzimas, espécies de oxigênio reativo, NO e mediadores lipoderivados, que são utilizados para matar patógenos, controlar a propagação de infecções do mesmo modo que podem lesar tecidos normais nas proximidades da inflamação⁶.

Recentemente, muitos estudos têm relatado que macrófagos ativados podem produzir alta quantidade de NO exercendo sua toxicidade de maneira NO-dependente^{14, 15, 16}. O papel do NO na mucosa bucal normal ainda é desconhecido. 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 do nitrito quantificado na saliva foi encontrado em pacientes com recorrentes ulcerações orais aftosas. Observa-se um aumento do nível de iNOS gengival durante a inflamação periodontal, quando comparada com tecidos gengivais não inflamados²⁰.

Outro estudo recente relacionado ao óxido nítrico e seu papel na inflamação foi realizado por Tozum et al (2005)²⁵. Os autores analisaram o metabolismo do NO ao redor de implantes e seu possível impacto na gravidade da inflamação peri-implantes. Ao analisar 34 implantes, observaram que a produção de NO aumentou com a presença e a gravidade da inflamação, demonstrando a contribuição do NO em processos inflamatórios peri-implantes.

Embora a toxicidade de vários materiais ortodônticos tenha sido relatada na literatura^{5, 9, 10}, poucos são os trabalhos relacionados à biocompatibilidade dos elastômeros sintéticos. O presente trabalho teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular (*MTT* assay) de macrófagos murinos J774 e quantificar a produção de NO gerado por estas células na presença de ligaduras elásticas de diferentes marcas e cores.

MATERIAL E MÉTODO

Material estudado

A amostra foi constituída de 6 elos de ligaduras elásticas ortodônticas do tipo modular nas cores prata e transparente de cada uma das seguintes marcas comerciais: *GAC International* (Islândia, NY), *TP Orthodontics* (LaPorte, USA) e Dental Morelli (Sorocaba, SP), para cada tempo estudado (24, 48 e 72 horas). Os elásticos utilizados eram provenientes de um mesmo lote e foram obtidos diretamente dos fabricantes. Foram mantidos em suas embalagens plásticas originais sob refrigeração e ao abrigo da luz até o início do experimento, eliminando assim, eventuais alterações causadas por variações na temperatura e luminosidade.

Preparação e esterilização dos materiais

As ligaduras elásticas foram removidas dos módulos com o auxílio de uma tesoura, para eliminar a possibilidade de dano às estruturas das ligaduras elásticas durante o procedimento. A esterilização dos materiais foi realizada com óxido de etileno. Posteriormente, os elásticos foram manipulados no fluxo laminar a fim de se resguardar todas as condições de esterilidade.

Cultura Celular da linhagem de macrófagos murinos J774

Foram utilizadas células da linhagem murina J774 A.1 (ATCC n^o.TIB-67) mantidas em cultura no laboratório de Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Esta linhagem de macrófagos foi mantida em garrafa plástica de cultura (NUNC) em meio suplementado, com 5% de soro fetal bovino (FCS - fetal calf serum), 50UI/ml de Penicilina, 1% de aminoácido não-essencial e 2% de L-Glutamina (Gibco/BRL). As células foram conservadas em incubadora com 5% de CO₂, numa temperatura de 37°C. Após 5 dias, as células foram transferidas para um recipiente adequado e lavadas através centrifugação a 1200 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Para

determinação da viabilidade e contagem celular foi utilizado o corante azul de Tripan, em uma proporção de 1/1 (corante/meio de cultura), em câmara de Neubauer.

Cultura de células na presença dos materiais

Em placas de cultura de 96 poços, foram cultivadas 2×10^4 células J774/poço resuspensas em um volume de 100 μ l de meio de cultura RPMI suplementado. Sobre as células foram colocados os elos de cada tipo de ligaduras elásticas e, estes foram deixados em cultura em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) à 37°C, com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado e transferido para nova placa de cultura para posterior quantificação do NO e as células foram submetidas à avaliação da viabilidade após a remoção do material.

O Grupo controle foi constituído de macrófagos murinos da linhagem J774, depositados nas placas de 96 poços, sem a presença dos materiais elásticos.

Teste de viabilidade (MTT – Thiazolyl Blue Test)

Após a retirada dos sobrenadantes, foi acrescentado 90 μ l de meio RPMI suplementado e 10 μ l da suspensão de MTT (50mg/ml) às células e ligaduras que permaneceram nos poços da placa. As placas foram incubadas por 4 horas à 37°C em estufa de CO₂. Após este período, a reação de MTT foi bloqueada com 100 μ l/poço de solução álcool-ácido. Em seguida, permaneceram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. As ligaduras elásticas foram removidas com o auxílio de uma pinça estéril e a leitura foi realizada a 570nm utilizando-se um leitor de microplacas (Spectramax 190-MOLECULAR DEVICE)²⁸.

Análise da produção do óxido nítrico

A produção do NO foi estimada através do acúmulo do nitrito (NO₂⁻) que é o produto de conversão estável do óxido nítrico. A mensuração foi efetuada usando o

método de Griess^{3, 7, 8}. Depois dos respectivos tempos, 100µl do sobrenadante de cada poço da placa de cultura foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Foi acrescentado aos sobrenadantes, a mesma quantidade do reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% N- (1-naftil) – etilina diamina hidróclorido, 2,5% H₃PO₄)⁸. As concentrações de nitrito presente 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 11ª diluição¹⁹. A absorbância foi determinada a 540nm, através do leitor de microplacas (Spectramax 190-MOLECULAR DEVICE)²⁸.

Tratamento estatístico

A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney comparando os valores obtidos de cada grupo de ligadura com o grupo controle. Houve ainda a comparação entre os intervalos analisados (24-48 horas; 48-72 horas e 24-72 horas) para cada grupo testado. Os valores de “p” menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou haver diferenças significativas entre os diferentes grupos de ligaduras com o grupo controle em relação à viabilidade celular nos 3 tempos analisados (tabela 1). Com o intuito de se determinar qual o grupo que apresentava tal diferença foi realizado o teste Mann-Whitney.

As células em contato com as ligaduras Morelli prata apresentaram redução significativa na viabilidade celular em 24 horas. No tempo 48 horas, houve aumento na proliferação das células deste grupo, porém, ainda significativamente menor que o grupo controle. Os grupos das ligaduras Morelli transparente e GAC (prata e transparente) também apresentavam média de viabilidade inferior às células controle em 48 horas. No

entanto, em 72 horas, a média de viabilidade celular em todos os grupos de ligaduras foi maior quando comparado ao grupo controle. Adicionalmente, verifica-se que 3 grupos de ligaduras (Morelli prata e transparente e GAC prata) exibiram aumento significativo da viabilidade. As ligaduras elásticas da marca TP não alteraram o comportamento das células J774, demonstrando um comportamento similar às células controle. A figura 1 ilustra a comparação entre tais ligaduras com o grupo controle nos respectivos tempos.

Em relação ao tempo, observa-se que as células controle apresentaram aumento na viabilidade em 48 horas que foi significativa em relação ao período inicial (24 horas). Posteriormente, nota-se diminuição desta viabilidade em 72 horas também significativa. No entanto, ao se comparar o período de 72 com 24 horas não houve diferença significativa (tabela 2 e figura 1). As células em contato com as ligaduras Morelli (prata e transparente) e GAC prata demonstraram diferenças significativas em todos os tempos, com exceção da ligadura Morelli transparente que não apresentou diferença no período de 24 a 48 horas. No entanto, não houve diferenças significativas no comportamento das células em contato com as ligaduras GAC transparente, TP prata e transparente, nos 3 tempos analisados.

Tabela 1 - Teste de Kruskal-Wallis para a análise da viabilidade celular em função do tempo.

Tempo	p-valor
24 horas	0,010
48 horas	0,000
72 horas	0,017

Tabela 2 - Teste de Kruskal-Wallis para a viabilidade celular no tempo para cada grupo de material e grupo controle.

Material	Kruskal-Wallis p valor
Controle	0,016
Morelli prata	0,005
Morelli transparente	0,007
GAC prata	0,002
GAC transparente	n.s
TP prata	n.s
TP transparente	0,039

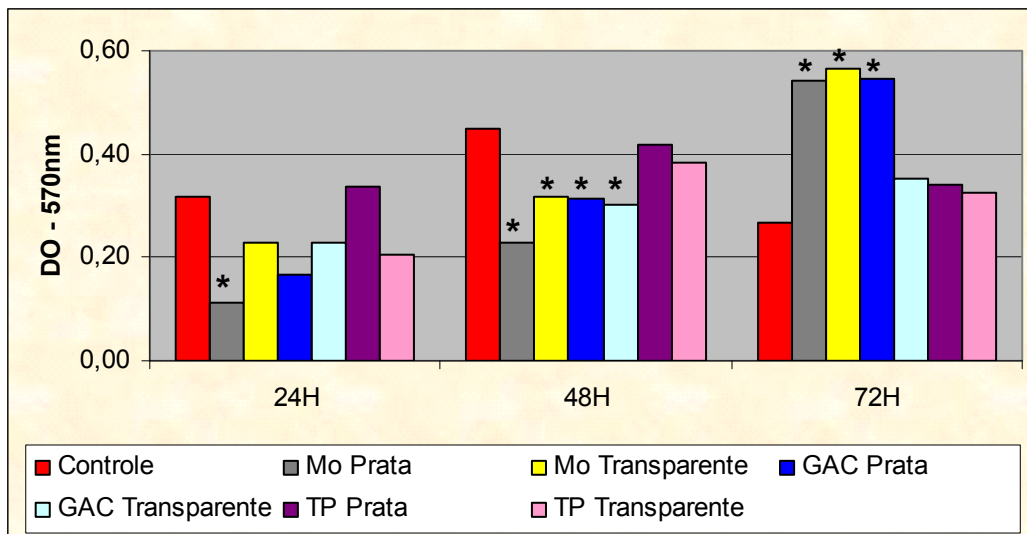


Figura 1 – Comparação entre as médias de viabilidade celular para cada grupo de ligadura em relação ao grupo controle nos três tempos analisados (Teste de Mann-Whitney – * $p < 0,05$).

A produção de óxido nítrico realizada pelas células controle e pelas células estimuladas pelas ligaduras elásticas em 24, 48 e 72 horas pode ser observada na figura 2. O teste Kruskal-Wallis (tabela 4) não apresentou diferenças significativas entre as células controle e aquelas que estavam em contato com as ligaduras nos diferentes tempos.

Apesar das ligaduras Morelli prata terem proporcionado maior produção de NO, sendo significativa no período de 24 horas, nota-se um comportamento semelhante entre os outros grupos de ligaduras e grupo controle em relação à dosagem de NO. No período de 24 a 48 horas, nota-se que houve diferença significativa na produção de NO pelas células em todos os grupos de ligaduras elásticas, exceto ligadura TP prata. Houve aumento da produção de NO em função do tempo, porém, este aumento não foi significativo no período de 48 para 72 horas. Como esperado, no período de 72 em relação a 24 horas, houve diferença significativa na produção de NO nos grupos de ligaduras, exceto no grupo da ligadura TP prata que não apresentou diferenças significativas nos 3 tempos analisados, indicando uma produção de NO estável, independentemente do tempo (tabela 5).

Tabela 4 - Teste de Kruskal-Wallis para a análise dos níveis de óxido nítrico em função do tempo. (n.s. = não significativo)

Tempo	p valor
24 horas	n.s.
48 horas	n.s.
72 horas	n.s.

Tabela 5 - Teste de Kruskal-Wallis para os níveis de óxido nítrico no tempo para cada grupo de material e grupo controle.

Material	Kruskal-Wallis p valor
Controle	0,002
Morelli prata	0,002
Morelli transparente	0,003
GAC prata	0,014
GAC transparente	0,018
TP prata	0,055
TP transparente	0,002

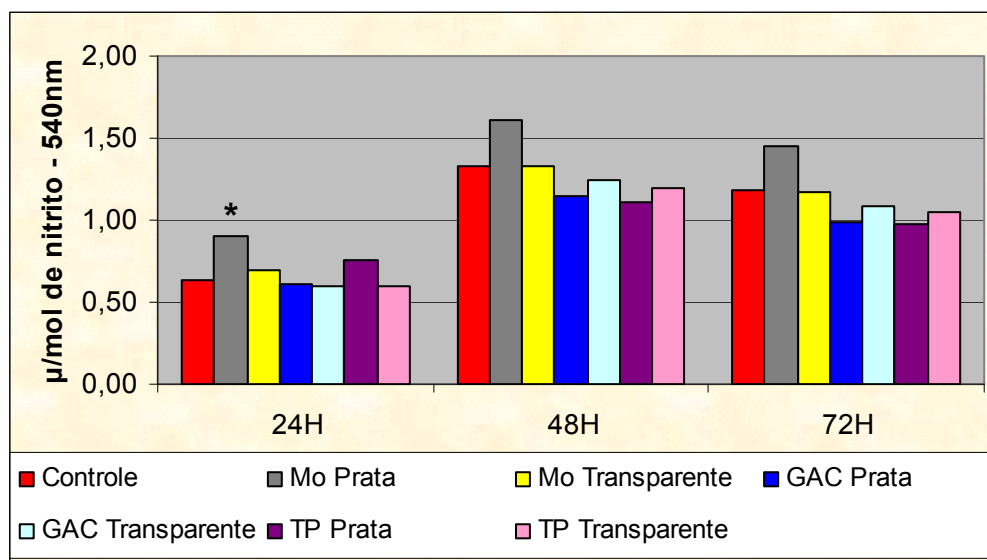


Figura 2 – Comparação entre os níveis de óxido nítrico para cada grupo de ligadura em relação ao grupo controle nos três tempos analisados (Teste de Mann-Whitney – * $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A avaliação da citotoxicidade, tradicionalmente, tem sido realizada através do método de difusão em ágar sobre monocamada de células⁴. Apesar de ser um método útil para se testar materiais, estudos recentes têm demonstrado diferenças nas medições da proliferação celular¹³. Além disso, em um ambiente como a cavidade bucal, em que a lavagem salivar é abundante, técnicas utilizando culturas de células imersas em meio líquidos seriam melhores para simular tal evento, enquanto que a presença de ágar poderia agir como uma barreira¹². O teste que utiliza o MTT (Thiazolyl Blue Test) pode ser facilmente adaptado para testes de biocompatibilidade de materiais de diferentes composições. O ensaio detecta as células vivas através da atividade metabólica das mesmas e, o sinal é dependente do grau de ativação dessas células. Além disso, é um ensaio colorimétrico, que permite uma análise visual rápida dos resultados, apresenta baixo custo e alto grau de reprodutibilidade¹⁹.

A citotoxicidade dos elásticos a base de látex (borracha natural) já se apresenta bem documentada na literatura. O presente estudo além de acrescentar a análise da biocompatibilidade de elásticos sintéticos de diferentes marcas e cores, inclui ainda a mensuração da produção de óxido nítrico (NO) determinada pela ativação de macrófagos. As culturas de macrófagos foram utilizadas em razão da ampla distribuição destas células no organismo e sua participação na produção de moléculas pró-inflamatórias como o NO²³. É importante destacar que o tempo médio de vida do NO é curto, o que significa que a permanência do mesmo no organismo é baixa, tornando-se difícil sua monitorização apurada "in vivo". Desta forma, a produção de NO em cultura de células pode ser estimada através do acúmulo de nitrito, que é produto de conversão do NO, através do Método de Griess⁸.

O comportamento apresentado pelas células controle neste estudo, deve-se à fase (Intérfase) do ciclo celular em que estas células encontravam-se ao se realizar o

experimento. Houve aumento significativo na viabilidade celular de 24 para 48 horas em razão da alta proliferação apresentada pelas células J774. O menor índice de viabilidade detectado nas células controle após 72 horas sugere que houve morte celular devido a fatores inerentes aos processos de cultivos celulares, como falta de espaço e nutrientes às células.

As células que estavam em contato com as ligaduras elásticas Morelli prata apresentaram comportamento diferente ao do grupo controle. É possível observar algum atraso no processo de proliferação celular destas células, uma vez que houve diminuição significativa da viabilidade celular em 24 horas, seguida de certo aumento na proliferação em 48 horas, porém, ainda menor que as células controle. Todavia, em 72 horas, a média de viabilidade celular foi significativamente maior que as células controle, demonstrando proliferação progressiva neste tempo. Isto sugere que as ligaduras Morelli prata podem ter agido como uma substância capaz de induzir proliferação no tempo 72 horas. Ao mesmo tempo, houve produção de NO maior do que aquela exibida pelas células controle em todos os tempos, sendo significativa no tempo 24 horas. Estes dados sugerem que o NO modulou o crescimento das células em contato com as ligaduras Morelli prata, ou seja, interferiu no processo de proliferação celular. Sabe-se que o NO pode apresentar efeitos benéficos como a atividade microbicida, modulação da resposta imune e reparo tecidual¹⁴. A alta proliferação de macrófagos pode ser danosa quando a inflamação é desregulada ou o fator inicializador persiste¹⁴. Esta alta proliferação desencadeada por este tipo de ligadura precisa ser melhor investigada através de outros estudos “in vitro”.

As células em contato com as ligaduras Morelli transparente e GAC prata também apresentaram, em 48 horas, média de viabilidade celular menor que o grupo controle, porém, maior que no tempo 24 horas. Do mesmo modo, demonstraram uma viabilidade significativamente maior que o grupo controle no tempo 72 horas, sugerindo que estas ligaduras também podem ter agido como substâncias indutoras de proliferação.

Holmes et al (1993) não verificaram diferenças entre elásticos intra-orais de diferentes cores e transparentes. No entanto, ambos apresentaram efeitos citotóxicos sobre fibroblastos em condições experimentais “in vitro”¹². Os elásticos analisados por estes autores eram derivados de borracha natural, dessa forma, a citotoxicidade apresentada pode estar relacionada à composição destes elásticos e não ao corante utilizado. Além disso, tal fato não foi observado em condições “in vivo”.

Hanson e Lobner (2004) avaliaram a neurotoxicidade de elásticos ortodônticos intra-orais com e sem látex. Eles observaram que os elásticos com látex das marcas *American Orthodontics*, *Masel Orthodontics* e *GAC International*, causaram citotoxicidade. Entretanto, aqueles das mesmas marcas que não apresentavam látex em suas composições foram biocompatíveis. Os autores sugeriram que a toxicidade dos elásticos com látex possa ter sido mediada pela liberação de zinco¹¹.

Neste estudo, o grupo das ligaduras TP foi o que apresentou comportamento semelhante ao do grupo controle nos 3 tempos analisados, sugerindo que estas ligaduras não influenciaram sobremaneira o comportamento das células J774 em relação à viabilidade celular e produção de NO.

Na análise dos resultados em relação ao tempo, verifica-se que a viabilidade celular nos grupos de ligaduras foi maior no tempo 72 horas. Em relação à produção de NO, houve significativa produção desta molécula do tempo final (72 horas) quando comparado ao tempo inicial, exceto pela ligadura TP prata que, provavelmente, não exerceu indução às células J774 no decorrer do tempo.

Torna-se difícil conciliar a complexidade aparente das interações do NO com outras biomoléculas em seu duplo desempenho. A atuação precisa do NO como agente citotóxico e protetor não é totalmente entendida. Embora o NO seja importante modulador da função celular em condições de saúde e de doença, é também considerado danoso e tem sido envolvido na patogênese de ampla variedade de doenças inflamatórias¹⁴. Os efeitos prejudiciais do NO podem incluir danos aos tecidos e osso alveolar, vermelhidão

gingival, explicada pelo aumento da permeabilidade vascular, tendência de sangramento dos tecidos moles, e ainda, o aumento da reabsorção do osso alveolar, uma vez que age diretamente sobre as células clásticas¹⁴. Há poucos estudos sobre o efeito do NO nas doenças bucais. Desta forma, é fundamental que outros estudos científicos relacionados sejam realizados para que os profissionais tenham conhecimento sobre esta molécula e novas aplicações clínicas sejam viabilizadas.

CONCLUSÕES

- As ligaduras da marca *TP Orthodontics* (prata e transparente) não influenciaram de forma significativa a viabilidade celular e a produção de NO ao demonstrar um comportamento similar àquele apresentado pelas células controle, nos 3 tempos analisados;
- A viabilidade celular nos grupos de ligaduras foi maior no período final da avaliação em relação ao grupo controle. No entanto, 3 grupos de ligaduras (Morelli prata, Morelli transparente e GAC prata) exibiram aumento significativo, sugerindo que estas ligaduras podem ter agido como substâncias capazes de induzir proliferação. No entanto, outros estudos devem ser realizados para explorar este mecanismo observado;
- Embora a ligadura Morelli prata tenha estimulado as células J774 a realizarem uma maior produção de NO, os outros tipos de ligaduras nos diferentes tempos avaliados não apresentaram diferenças significativas na produção de óxido nítrico em relação às células controle;

REFERÊNCIAS

1. ANUSAVICE, K. J. **Phillips Materiais Dentários**. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
2. BAEK, H. S.; YOO, J. A.; RAH, D. K.; HAN, D-W.; LEE, D. H.; KWON, O. H.; PARK, J. C. Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. **Yonsei Med J**, Seoul, v.46, n.4, p. 579-583, Aug 2005.
3. CORRADIN, S.B., BUCHMULLER-ROVILLER, Y., MAUEL, J. Phagocytosis enhances murine macrophages activation by interferon- γ and tumor necrosis factor- α . **Eur. J. Immunol.**, v. 21, p.2553, 1991.
4. CRAIG, R.G. **Restorative dental materials**, 9th ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1993. p. 141-147.
5. DAVID, A., LOBNER, D. In vitro cytotoxicity of orthodontic archwires in cortical cell cultures. **Eur. J. Orthod. Soc.**, v.26, n.4, p. 421-426, 2004.
6. FERREIRA, A.P., TEIXEIRA, H.C. **Tópicos de Imunologia Básica**. 1ª. ed. Juiz de Fora: Do autor, 2005. 83 p.
7. GOPINATH, V.K., MUSA, M., SAMSUDIN, A.R., LALITHA, P., SOSROSENO, W., Role of nitric oxide in hydroxyapatite-induced phagocytosis by murine macrophage cell line (RAW 264.7). **Arch. of Oral Biol.**, in press, 2005
8. GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGWISKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and (^{15}N) nitrite in biological fluids. **Anal Biochem**, Orlando, v.126, n.1, p.131-138, Oct 1982.
9. GRIMSDOTTIR, M.R., HENSTEN-PETTERSEN, A., KULLMANN, A. Cytotoxicity effect of orthodontic appliances. **Eur J Orthod**, Oxford, v.14, n.1, p. 47-53, Feb 1992.
10. GRIMSDOTTIR, M.R., HENSTEN-PETTERSEN, A. Cytotoxicity and antibacterial effects of orthodontic appliances. **Scand. J. Dent. Res.**, v.101, n.4, p. 229-231, 1993.
11. HANSON, M., LOBNER, D. In vitro neuronal cytotoxicity of látex and nonlátex orthodontic elastics. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St Louis, v.126, n.2, p. 65-70, July 2004.

12. HOLMES, J., BARKER, M.K., TUNCAY, O.C. Cytotoxicity of orthodontics elastics. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v. 104, n.2, p. 188-191, Aug. 1993.
13. KORHOMEN, P., TALJA, M., RUUTU M., ANDERSON, L.C., ALFTHAN, O. Comparison of two different cell culture methods in evaluation of biocompatibility of latex urinary catheters. *Urol. Res.*, v. 19, p. 127-130, 1991.
14. KENDALL, H.K., MARSHALL, R.L; BARTOLD, P.M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, v.7, n.1, p. 2-10, Jan. 2001
15. KRONCKE, K., FEHSEL, K., KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotein – How, why, when, and where? **Nitric Oxide**, v.1, n.2, p.107-20, Jan. 1997.
16. LAPPIN, D.F., KJELDEN, M., SANDER, L., KIANE, D.F. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J. Periodont Res**, v. 35, n.6, p. 369-373, Dec. 2000.
17. MATEJKA, M., ULM, C., PARTYKA J. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J. Periodontal Res**, v. 33, n. 8, p. 517-8, Nov. 1998.
18. MORTON, M. **Rubber technology**. 3^a. ed. Londres: Chapman & Hall, 1995. 638 p.
19. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v.65 n.1-2, p.55-63, Dec 1983.
20. OHASHI, M.; IWASE, M.; NAGUMO, M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. **J. Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.28, n.8, p. 355-359, Sep 1999.
21. SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. **J Dent**, Bristol, v.2, n. (suppl) 22, S6-S11, Jun 1994.
22. STEVENSON, S.J., KUSY, P.R. Force application and decay characteristics of untreated and treated polyurethane elastomeric chains. **Angle Orthod.**, Appleton, v. 64, n.6, p.455-467, Apr. 1994.
23. STOIKA, R.; KASHCHAK, N.; LUTSIK-KORDOVSKY, M. L.; BOYKO, M.; BARSKA, M.; TSYRULNYK, A. In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. **Med Sci Monit**, Warsaw, v.7, n.4, p.652-658, Jul-Aug 2001.

24. TALOUMIS, J.L., SMITH, T.M., HONDRUM, S.O., LORTON, L. Force decay and deformation of orthodontic elastomeric ligatures. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v. 11, n.1, p. 1-11, Jan. 1997.
25. TOZUM, T.E., TURKYILMAZ, I., YAMALIK, N., TUMER, C., KILINE, A., KARABULUT, E., ERATAY, K. Analysis of the possible impact of inflammation severity and early and delayed loading on nitric oxide metabolism around dental implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.20, n.4, p. 547-556, Aug. 2005.
26. WATAHA, J. C. Principles of biocompatibility for dental practioners. **J Prosthet Dent**, St Louis, v.86, n.2, p.203-209, Aug 2001.
27. WEINBERG, J. B.; MISUKONIS, M. A.; SHAMI, P.J. et al. Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS protein, bioprotein, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **J. Am. Soc. Hematol**, v. 86, p. 1184-1195, 1995.
28. WILSON, 2000 In: Masters, J. R. W editor. *Animal Cell Culture*. New York: Oxford University Press; 2000, 3^a ed., p. 175-218.
29. WONG, A.K. Orthodontic elastic materials. **Angle Orthod**, v. 46, n. 2, p. 196-205, Apr. 1976.
30. YOUNG, J., SANDRIK, J.L. The influence of preloading on stress relaxation of orthodontic lastic polymers. **Angle Orthod.**, Appleton, v.49, n.2, p. 104-109, Apr. 1979.

2.3 – ARTIGO 3: SUBMETIDO

EFEITO DE LIGADURAS ELÁSTICAS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774 ESTIMULADAS PELO INTERFERON-GAMA (IFN- γ)

EFFECT OF ELASTOMERIC LIGATURES ON THE CELLULAR VIABILITY AND NITRIC OXIDE PRODUCTION OF GAMMA-INTERFERON STIMULATED J774 CELLS

ADRIANA ALVES SILVA
PÓS-GRADUANDA – MESTRADO EM SAÚDE BRASILEIRA/ NÚCLEO EM ORTODONTIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

MARIA APARECIDA DE SOUZA
MESTRE E DOUTORA EM IMUNOLOGIA
PROFESSORA VISITANTE – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ANA PAULA FERREIRA
MESTRE E DOUTORA EM IMUNOLOGIA
PROFESSORA ASSOCIADA – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ROBERT WILLER FARINAZZO VITRAL
MESTRE E DOUTOR EM ORTODONTIA
PROFESSOR ASSOCIADO – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

CORRESPONDÊNCIA: ADRIANA ALVES SILVA– alves_orto@yahoo.com.br/Tel:(32)3554–1659

R. OLEGÁRIO MACIEL, 676/301 –BAIRRO: SANTA HELENA - 36015-350 JUIZ DE FORA/MG

EFEITO DE LIGADURAS ELÁSTICAS SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774 ESTIMULADAS PELO INTERFERON-GAMA (IFN- γ)

RESUMO: Embora a toxicidade de muitos materiais odontológicos tenha sido relatada na literatura, a biocompatibilidade dos elastômeros sintéticos não se apresenta bem estabelecida. Este estudo teve como objetivo verificar se a presença de ligaduras elásticas de diferentes marcas e cores afetariam a viabilidade celular e a produção de óxido nítrico (NO) utilizando-se culturas de macrófagos murinos da linhagem J774 estimuladas pelo IFN- γ , que é uma citocina pró-inflamatória. Foram utilizadas ligaduras de 3 marcas diferentes (Morelli, GAC e TP) nas cores prata e transparente após esterilização com óxido de etileno. Os elos destas ligaduras foram mantidos nas culturas celulares juntamente com 10 μ l de IFN- γ (5 ng/ml) nos tempos: 24, 48 e 72 horas. As células foram submetidas à avaliação da viabilidade celular através da técnica do MTT [3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide] e os sobrenadantes foram coletados para a análise da produção de NO utilizando-se o método de Griess. Houve redução significativa da viabilidade celular no tempo 48 horas para o grupo das ligaduras Morelli e GAC. Entretanto, uma média de viabilidade superior ao apresentado pelas células controle foi observada em todos os grupos de ligaduras no tempo 72 horas, sendo significativa para o grupo das ligaduras GAC transparente. O grupo das ligaduras TP foi o que apresentou comportamento semelhante ao grupo controle, apesar das ligaduras TP prata terem apresentado menor viabilidade em 24 horas. A presença do IFN- γ proporcionou aumento significativo na produção de NO em todos os grupos no período final em relação ao inicial. Nenhum dos grupos de ligaduras propiciou uma produção de NO maior do que o grupo controle. As ligaduras Morelli transparente e GAC (prata e transparente) demonstraram a menor produção desta molécula nos 3 tempos analisados.

DESCRITORES: Elastômeros Sintéticos, Interferon-gama, Ortodontia, Óxido Nítrico e Viabilidade Celular.

EFFECT OF ELASTOMERIC LIGATURES ON THE CELLULAR VIABILITY AND NITRIC OXIDE PRODUCTION OF GAMMA-INTERFERON STIMULATED J774 CELLS

SUMMARY: Although the toxicity of many dental materials has been reported in the literature, the biocompatibility of elastomeric ligatures has not been extensively tested. We investigated the effect of elastomeric ligatures of different brands and colors on the cellular viability and NO production of gamma-interferon-stimulated J774 murine macrophages. After sterilization with ethylene oxide, silver and transparent elastic ligatures of 3 different brands (Morelli, GAC e TP) were used. The chains of the ligatures were kept in J774 cell cultures, along with 10 μ l of gamma-interferon (IFN- γ , 5 ng/ml), at 24, 48, and 72 hours. The MTT [3 – (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide] technique was used for cellular viability assessment, and the supernatants were collected for analysis of NO production with the Griess method. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used for analysis of the results. The Morelli and GAC ligatures led to a significant reduction of cellular viability after 48 hours. Yet, a viability mean higher than that seen in control cells was observed for all ligatures after 72 hours, with transparent GAC showing significant proliferation. Cells exposed to TP ligatures had the same behavior of controls, although silver TP ligatures led to lower viability at 24 hours. Nitric oxide production was significantly greater in all groups at the final time point in relation to the initial time point, in the presence of IFN- γ . None of the ligatures led to higher NO production than that seen in controls, with transparent Morelli and silver and transparent GAC showed the smallest NO production at the 3 study time points.

DESCRIPTORS: Elastomeric Ligatures; Cellular Viability, Interferon-gamma, Nitric Oxide, and Orthodontics.

INTRODUÇÃO

O campo dos materiais odontológicos compartilha, com outras esferas da biotecnologia, o problema da biocompatibilidade, isto é, a coexistência dos materiais manufaturados com tecidos corporais e fluidos que devem permanecer no organismo humano, por períodos de tempo variados, sem irritar os tecidos moles²¹. Diante da diversidade de materiais utilizados na Ortodontia, os elastômeros desempenham um papel importante na prática ortodôntica²⁹. Dentre os elastômeros, as borrachas sintéticas ou de poliuretanos mais utilizadas atualmente são as ligaduras elásticas e os elásticos em cadeia^{18, 24}.

As ligaduras elásticas foram introduzidas na Ortodontia como uma alternativa para promover a amarração do arco aos bráquetes. Atualmente, representam itens essenciais na prática ortodôntica, facilitando o trabalho do profissional por serem de rápida e fácil adaptação, bastante confortáveis para os pacientes e favorecendo sua motivação em relação ao tratamento ortodôntico por estarem disponíveis em uma variedade de cores²⁶. Apesar da composição exata das ligaduras elásticas não ser revelada pelos fabricantes, normalmente são feitas à base de poliuretanos poliésteres^{29, 30}. Estes poliuretanos não são polímeros diretos de uretanos, mas derivados de um processo de reações de poliésteres com di ou poliisocianetos para produzir uma estrutura complexa de ligações de uretano³⁰. Os poliuretanos industriais não são materiais inertes, decompõem-se sob contato prolongado com enzimas, umidade e água¹². Devido aos longos períodos em que as ligaduras elásticas permanecem na boca, torna-se necessário que sejam protegidas da hidrólise, da termo-oxidação, ataques microbiológicos, oxidação por raios ultravioletas e ozônio e dióxido de nitrogênio. Por isso, compostos químicos tais como antioxidantes, peróxidos orgânicos, corantes, desumidificadores, lubrificantes e outros podem ser adicionados^{18, 29, 30}.

Embora as reações adversas aos materiais odontológicos não sejam comuns, elas podem ser locais e sistêmicas e acontecer com todas as classes de materiais. Todavia o número de reações adversas nem sempre é totalmente relatado e apurado, sendo necessário um maior número de documentação e estudos¹⁰. Grimsdottir e Hensten-Pettersen (1993), ao analisarem o efeito citotóxico de aparelhos ortodônticos, sugeriram que este efeito, quando presente, pode contribuir para manifestação de gengivite localizada⁹.

Os modelos de estudos "in vitro" são uma alternativa imprescindível na pesquisa de citotoxicidade de materiais. Permitem uma rápida avaliação, melhoram os protocolos padronizados e produzem dados quantitativos e comparáveis². Os polimorfonucleares de sangue humano e macrófagos murinos mostraram ser modelos experimentais adequados para a estimativa quantitativa de atividade fagocítica sob a influência de diferentes agentes imunomoduladores. Os macrófagos são células importantes nos processos inflamatórios e defesa do organismo, além de induzirem a produção de moléculas pró-inflamatórias como o NO²⁵. A análise da produção de NO é uma outra alternativa de se determinar o potencial tóxico de determinado material. Recentemente, estudos têm relatado a presença do NO, uma molécula com potencial citotóxico, em tecidos dentais e seu envolvimento em doenças inflamatórias bucais^{17, 27}.

Desde 1987, o óxido nítrico (NO) tem sido reconhecido como uma molécula reguladora, produzido principalmente por macrófagos ativados, de extrema importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Esta molécula gasosa pode apresentar efeitos benéficos, tais como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune. Por outro lado, quando presente em altas concentrações, pode atuar como uma influente molécula citotóxica desencadeando prejuízos aos tecidos adjacentes, incluindo osso alveolar¹³.

O interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina que desempenha um importante papel tanto na imunidade inata quanto na imunidade adquirida, sendo caracterizado como

principal ativador de macrófagos. Dois tipos de sinais são muito importantes para a ativação de células fagocíticas: presença de antígenos-alvo e citocinas específicas²⁵. Citocinas são proteínas secretadas pelas células que participam da imunidade inata e resposta imune adquirida, sendo capazes de regular várias funções celulares, como a resposta inflamatória⁵.

O IFN- γ induz a produção de peróxido de nitrogênio, óxido nítrico e outras moléculas tóxicas responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos. O fator de necrose tumoral (TNF α e β) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) também promovem aumento da atividade dos macrófagos, assim como produtos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS) – um constituinte da membrana externa das bactérias Gram-negativas⁵.

O papel do NO na mucosa bucal normal ainda é desconhecido. 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 do nitrito quantificado na saliva foi encontrado em pacientes com recorrentes ulcerações orais aftosas. Observa-se um aumento do nível de iNOS gengival durante a inflamação periodontal, quando comparada com tecidos gengivais não inflamados²⁰.

As doenças periodontais representam um grupo predominante de condições inflamatórias crônicas. A prolongada produção de mediadores pró-inflamatórios pode resultar no aumento da produção de NO favorecendo o catabolismo tecidual. A resposta inflamatória é autolimitada. Entretanto, quando a inflamação é desregulada ou quando o fator inicializador persiste, como ocorre na doença periodontal, a inflamação pode conduzir a um excessivo prejuízo tecidual¹³.

Muitos estudos têm avaliado o comportamento das ligaduras elásticas em relação às suas propriedades físicas. No entanto, são escassos os trabalhos que avaliam as propriedades biológicas e os possíveis efeitos tóxicos deste material. O presente estudo

teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular de macrófagos murinos J774 e quantificar a produção do óxido nítrico (NO) gerado por estas células estimuladas pelo IFN- γ na presença de ligaduras elásticas de diferentes marcas e cores.

MATERIAL E MÉTODO

Material estudado

A amostra foi constituída de 6 elos de ligaduras elásticas ortodônticas do tipo modular nas cores prata e transparente de cada uma das seguintes marcas comerciais: GAC International (Islândia, NY), TP Orthodontics (LaPorte, USA) e Morelli (Sorocaba, SP) para cada tempo estudado (24, 48 e 72 horas). Os elásticos utilizados eram provenientes de um mesmo lote e foram obtidos diretamente dos fabricantes. Foram mantidos em suas embalagens plásticas originais sob refrigeração e ao abrigo da luz até o início do experimento, eliminando assim, eventuais alterações causadas por variações na temperatura e luminosidade.

Preparação e esterilização dos materiais

As ligaduras elásticas foram removidas dos módulos com o auxílio de uma tesoura, para eliminar a possibilidade de dano às estruturas das ligaduras elásticas durante o procedimento. A esterilização dos materiais foi realizada com óxido de etileno. Posteriormente, os elásticos foram manipulados no fluxo laminar a fim de se resguardar todas as condições de esterilidade.

Cultura Celular da linhagem de macrófagos murinos J774

Foram utilizadas células da linhagem murina J774 A.1 (ATCC n^o.TIB-67) mantidas em cultura no laboratório de Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Esta linhagem de macrófagos foi mantida em

garrafa plástica de cultura (NUNC) em meio suplementado, com 5% de soro fetal bovino (FCS - fetal calf serum), 50UI/ml de Penicilina, 1% de aminoácido não-essencial e 2% de L-Glutamina (Gibco/BRL). As células foram conservadas em incubadora com 5% de CO₂, numa temperatura de 37°C. Após 5 dias, as células foram transferidas para um recipiente adequado e foram lavadas através de centrifugação a 1200 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Para determinação da viabilidade e contagem celular foi utilizado o corante azul de Tripán, em uma proporção de 1/1 (corante/meio de cultura), em câmara de Neubauer²⁸.

Cultura de células na presença dos materiais

Em placas de cultura de 96 poços, foram cultivadas 2×10^4 células J774/poço resuspensas em um volume de 100µl de meio de cultura RPMI suplementado. Sobre as células foram colocados 10µl de interferon (IFN- γ) na concentração 5 ng/ml e os elos de cada tipo de ligaduras elásticas. As placas foram deixadas em cultura em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) à 37°C, com 5% de CO₂. Após o período de incubação, o sobrenadante foi coletado para posterior quantificação do óxido nítrico e as células foram submetidas à avaliação da viabilidade celular após a remoção do material. O Grupo controle foi constituído pelos macrófagos murinos e 10µl de IFN- γ , depositados nas placas de 96 poços, sem a presença dos materiais elásticos.

Teste de viabilidade (MTT – Thiazolyl Blue Test)

Após a retirada dos sobrenadantes, foi acrescentado 90µl de meio RPMI suplementado e 10µl da suspensão de MTT (50mg/ml) às células e ligaduras que permaneceram nos poços das placas. As placas foram incubadas por 4 horas à 37°C em estufa de CO₂. Após este período, a reação de MTT foi bloqueada com 100µl/poço de solução álcool-ácido. Em seguida, permaneceram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. As ligaduras elásticas foram removidas com o auxílio de uma

pinça estéril e a leitura foi realizada a 570nm utilizando-se um leitor de microplacas (Spectramax 190-MOLECULAR DEVICE)^{19, 28}.

Análise da produção do óxido nítrico

A produção do NO foi estimada através do acúmulo do nitrito (NO_2^-) que é o produto de conversão estável do óxido nítrico. A mensuração foi efetuada usando o método de Griess^{3, 6, 7}. Depois dos respectivos tempos, 100 μl do sobrenadante de cada poço da placa de cultura foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Foi acrescentado aos sobrenadantes, a mesma quantidade do reagente de Griess (1% sufamilamida, 0,1% N- (1-naftil) – etilina diamina hidrocloreto, 2,5% H_3PO_4)⁷. As concentrações de nitrito presente 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 diluição¹⁹. A absorbância foi determinada a 540nm, através do leitor de microplacas (Spectramax 190-MOLECULAR DEVICE).

Tratamento estatístico

A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes Kruskal-Wallis e Mann-Whitney comparando os valores obtidos de cada grupo de ligação com o grupo controle. Houve ainda a comparação entre os intervalos de tempo analisados (24-48 horas; 48-72 horas e 24-72 horas) para cada grupo testado. Os valores de “p” menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

O teste de Kruskal-Wallis demonstrou haver diferenças significativas entre os grupos nos períodos de 24 e 48 horas na presença do IFN- γ (tabela 1). Com o intuito de

se determinar qual o grupo que apresentava tal diferença foi realizado o teste Mann-Whitney (figura 1).

Em 24 horas, as células em contato com as ligaduras elásticas Morelli transparente e TP prata apresentaram diminuição significativa na viabilidade em relação ao controle. Em 48 horas, houve redução significativa da viabilidade celular nos grupos das ligaduras Morelli e GAC quando comparadas às células controle. Por outro lado, no período de 72 horas, a viabilidade apresentada por todos os grupos de ligaduras foi maior do que aquela apresentada pelas células controle, sendo significativa apenas para a ligadura GAC transparente (figura 1).

Ao comparar a viabilidade celular em relação ao tempo, nota-se que as células controle apresentaram aumento em 48 horas que foi significativo em relação ao período inicial (24 horas). Posteriormente, nota-se redução da viabilidade em 72 horas, também significativa. No entanto, ao se comparar o período de 72 com 24 horas não houve diferença significativa. Do mesmo modo, as ligaduras TP prata e transparente exibiram comportamento semelhante ao grupo controle. Não existiram diferenças significativas na viabilidade das células em contato com as ligaduras GAC prata e transparente e Morelli prata em quaisquer dos tempos. Por outro lado, a ligadura Morelli transparente apresentou diferenças significativas nos períodos de 48 a 72 horas e 24 a 72 horas (tabela 2 e figura 1).

Tabela 1 - Teste de Kruskal-Wallis para a análise da viabilidade celular em função do tempo.

Tempo	p valor
24 horas	0,030
48 horas	0,000
72 horas	n.s.

Tabela 2 - Teste de Kruskal-Wallis para a viabilidade celular no tempo para cada grupo de material e grupo controle na presença do interferon-gama ($p < 0,05$).

Material	Kruskal-Wallis p valor
Controle	0,013
Morelli prata	n.s.
Morelli transparente	0,020
GAC prata	n.s.
GAC transparente	n.s.
TP prata	0,043
TP transparente	0,018

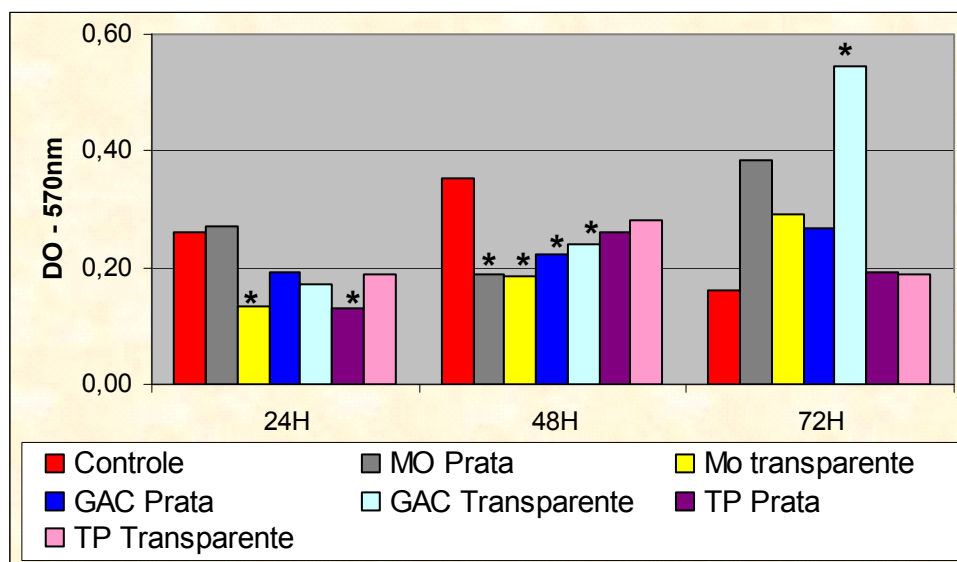


Figura 1 – Comparação entre as médias de viabilidade celular para cada grupo de ligadura em relação ao grupo controle nos três tempos analisados (Teste de Mann-Whitney – * $p < 0,05$).

A produção de óxido nítrico realizada pelas células controle e pelas células estimuladas pelas ligaduras elásticas em 24, 48 e 72 horas pode ser observada na figura 2. O teste Kruskal-Wallis (tabela 4) apresentou diferenças significativas entre as células controle e aquelas que estavam em contato com as ligaduras nos diferentes tempos.

Os resultados demonstraram aumento significativo na produção de NO em todos os grupos de ligaduras e grupo controle no período de 24 a 48 horas. Após este período, nota-se uma tendência de estabilização de 48 a 72 horas, uma vez que não existiram

diferenças significativas neste intervalo de tempo. As células que estavam em contato com as ligaduras Morelli transparente, GAC prata e GAC transparente apresentaram a menor produção de NO nos 3 tempos analisados. Tal diferença foi significativa ao ser comparada com a produção de NO demonstrada pelas células controle (tabela 4 e figura 2). Observa-se ainda que nenhum dos grupos analisados apresentou uma produção de NO maior do que aquela exibida pelas células controle na presença do IFN- γ .

A produção de NO pelo grupo controle e pelos grupos de elásticos analisados foi similar em relação ao tempo (tabela 5). Ao comparar o período de 48 horas em relação a 24 horas, nota-se que houve diferença significativa na produção de NO em todos os grupos, indicando uma intensa produção de NO em função do tempo, na presença do estímulo. Esta alta produção observada em 48 horas praticamente se manteve em 72 horas, uma vez que não existiram diferenças significativas no período de 48 para 72 horas. Do mesmo modo, no período de 24 para 72 horas, houve diferença significativa na produção de NO em todos os grupos de ligaduras e grupo controle.

Tabela 4 - Teste de Kruskal-Wallis para a análise dos níveis de óxido nítrico em função do tempo na presença do estímulo ($p < 0,05$).

Tempo	p valor
24 horas	0,001
48 horas	0,003
72 horas	0,003

Tabela 5 - Teste de Kruskal-Wallis para os níveis de óxido nítrico no tempo para cada grupo de material e grupo controle na presença do estímulo ($p < 0,05$).

Material	Kruskal-Wallis p valor
Controle	0,003
Morelli prata	0,003
Morelli transparente	0,003
GAC prata	0,003
GAC transparente	0,003
TP prata	0,003
TP transparente	0,003

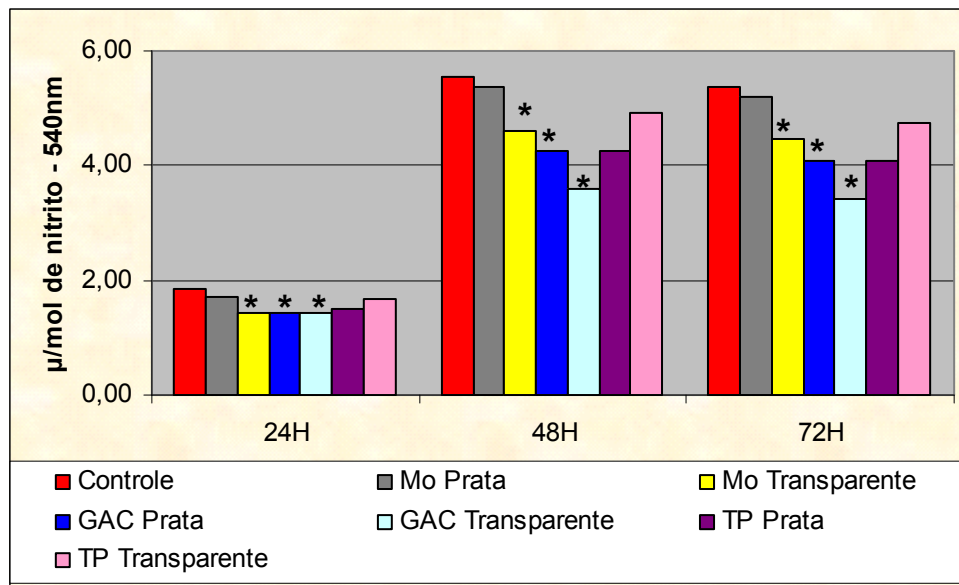


Figura 2 – Comparação entre os níveis de óxido nítrico para cada grupo de ligadura em relação ao grupo controle nos três tempos analisados (Teste de Mann-Whitney – * $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

Mosmann (1983) considerou o teste com MTT um significativo avanço sobre as técnicas tradicionais para a avaliação da proliferação e citotoxicidade. É um ensaio colorimétrico, que apresenta como vantagem principal a rapidez com que as amostras podem ser processadas. Ele detecta as células vivas, metabolicamente ativas, e o sinal é dependente do grau de ativação dessas células¹⁹. Os testes de citotoxicidade “in vitro” devem quantificar a viabilidade celular e o crescimento e serem correlacionados com experimentos em animais e estudos clínicos²².

O IFN- γ foi utilizado neste estudo com a finalidade de simular uma resposta inflamatória no organismo, uma vez que esta citocina apresenta relevante importância nos processos imunológicos e inflamatórios, além de ser a principal citocina ativadora de macrófagos²⁵.

Na presença do estímulo (IFN- γ), o comportamento apresentado pelas células controle neste estudo, deve-se à fase (Intérfase) do ciclo celular em que estas células

encontravam-se ao se realizar o experimento. Houve aumento significativo na viabilidade celular de 24 para 48 horas em razão da alta proliferação apresentada pelas células J774. Posteriormente, em 72 horas, nota-se que houve redução desta viabilidade, provavelmente, devido à falta de espaço e nutrientes necessários para a cultura celular.

Na análise dos resultados, nota-se uma menor viabilidade das células em contato com as ligaduras no período de 24 e 48 horas quando comparadas às células controle. Esta diminuição foi significativa para as células em contato com as ligaduras Morelli transparente e TP prata em 24 horas e para as ligaduras Morelli e GAC em 48 horas. Variações ocorrem na composição dos elásticos de diferentes marcas, o que poderia explicar as diferenças nos resultados obtidos. Paralelamente, houve uma elevada produção de NO pelas células J774 em todos os grupos de ligaduras do tempo 24 para 48 horas, sugerindo que a associação de ligaduras e NO possa ter influenciado a viabilidade celular no tempo 48 horas.

Todavia, uma viabilidade superior àquela apresentada pelas células controle pode ser observada por todos os grupos de ligaduras em 72 horas. Provavelmente, as células remanescentes, em 48 horas, continuaram a proliferar apesar da produção de NO permanecer elevada. Segundo Grimsdottir, Hensten-Pettersen e Kullmann (1992) o efeito citotóxico é causado por um irritante primário, quando este está presente em uma concentração e tempo suficientes para desencadeá-lo. As reações podem variar de um eritema a necroses, dependendo da toxicidade do irritante primário, da sua concentração e do tempo de exposição⁸.

O grupo das ligaduras TP foi o que apresentou comportamento similar ao grupo das células controle, apesar das ligaduras TP prata terem propiciado uma menor viabilidade celular em 24 horas.

As células em contato com as ligaduras GAC transparente demonstraram uma significativa proliferação em 72 horas quando comparadas às células controle. Por outro lado, foi o grupo que apresentou a menor produção de NO, indicando que a associação

deste tipo de ligadura com o IFN- γ propiciou inibição da síntese de NO. Estes dados sugerem que a ligadura GAC transparente, na presença do IFN- γ , pode ter sido um estímulo para a proliferação das células J774, ao mesmo tempo em que alterou a via de metabolismo do NO, inibindo sua síntese.

As ligaduras Morelli transparente e GAC prata também apresentaram a menor produção de NO nos 3 tempos analisados. Novamente, isto sugere que a associação destas ligaduras com o IFN- γ aumentaram o potencial de resposta imune ao propiciarem inibição da síntese de NO.

Em relação ao tempo, houve evidente produção de NO no tempo 48 horas, que permaneceu elevada no tempo 72 horas, porém de forma não significativa no intervalo de 48 para 72 horas. Tal fato pode estar associado à falta de estímulo às células a partir do tempo 48 horas. Ao se comparar a produção de NO de um estudo prévio²³ sem a presença do IFN- γ , com os resultados deste trabalho nota-se que houve um aumento expressivo na produção de NO em todos os grupos de ligaduras e no grupo controle. Isto pode ser explicado pelo fato do IFN- γ , uma citocina pró-inflamatória, ser um importante ativador de macrófagos^{5, 13}. Houve assim, em função desta maior produção de NO, uma redução da viabilidade celular quando comparado com os dados do estudo sem a presença do estímulo²³. Nota-se, portanto, que a presença do IFN- γ na cultura celular determinou diferenças nas respostas dos grupos de ligaduras testadas.

Recentemente, muitos estudos têm relatado que macrófagos ativados podem produzir alta quantidade de NO e exercer sua toxicidade de maneira NO-dependente²⁵. Lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas, TNF- α , IL-1 e IFN- γ têm demonstrado serem estimuladores importantes da produção de NO em uma variedade de células humanas e animais^{13, 16}. Apesar dos resultados deste estudo demonstrar concordância com a literatura em relação ao aumento na dosagem de NO, nenhum dos grupos de ligaduras elásticas associado ao IFN- γ atingiu o patamar alcançado pelo grupo controle. Ao contrário, a associação das ligaduras com o IFN- γ , em 3 grupos de ligaduras

(Morelli transparente, GAC prata e GAC transparente), proporcionou níveis de NO significativamente menores do que o grupo controle nos 3 tempos analisados. A produção de NO pode ser considerada como resultante da fisiologia normal dos macrófagos e pode, ainda, estar sujeita à ação de substâncias imunomoduladoras que podem aumentar ou diminuir a produção destas moléculas¹.

Há poucos estudos sobre o efeito do NO nas doenças orais e embora tenha havido poucas publicações concernentes a essa área, o interesse sobre essa molécula tem se expandido rapidamente³. Experimentos em animais e estudos clínicos demonstram um fenômeno, mas não o mecanismo envolvido. Os sistemas “in vitro” são capazes de elucidá-los, pois diferentes aspectos do complexo sistema “in vivo” podem ser investigados separadamente “in vitro”²². Assim sendo, estes resultados tornam-se importantes para se ter um conhecimento inicial sobre a ativação de macrófagos e o potencial citotóxico de diferentes materiais utilizados em Odontologia, além dos mecanismos envolvidos na resposta imune relacionada à cavidade bucal.

CONCLUSÕES

- As células que estavam em contato com as ligaduras TP apresentaram comportamento semelhante ao das células controle, apesar do grupo das ligaduras TP prata ter apresentado menor viabilidade celular em 24 horas;
- Embora tenha sido verificada menor viabilidade celular no tempo 48 horas para o grupo das ligaduras Morelli e GAC em relação ao grupo controle, nota-se uma viabilidade superior em todos os grupos de ligaduras no tempo 72 horas quando comparada às células controle, sendo significativa para o grupo das ligaduras GAC transparente;

- Em relação ao tempo, a presença do IFN- γ proporcionou aumento evidente na produção de NO pelas células J774 em contato com todos os tipos de ligaduras e células controle no período de 24 a 48 horas. Não houve diferenças significativas no período de 48 a 72 horas.

- Nenhum dos grupos de ligaduras propiciou produção de NO maior do que aquela exibida pelas células controle, sendo que o grupo das ligaduras Morelli transparente e GAC (prata e transparente) demonstraram a menor produção desta molécula na presença do IFN- γ ;

REFERÊNCIAS

1. ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. Cellular and molecular Immunology, USA: Elsevier, 6th Edition, 572p, 2007.
2. BAEK, H. S.; YOO, J. A.; RAH, D. K.; HAN, D-W.; LEE, D. H.; KWON, O. H.; PARK, J. C. Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. **Yonsei Med J**, Seoul, v.46, n.4, p. 579-583, Aug 2005.
3. BRENNAN, P.A.; THOMAS, G.J.; LANGDON, J.D. The role of nitric oxide in oral diseases. **Arch. of Oral Biol.** v. 48, p. 93-100, 2003;
4. CORRADIN, S.B., BUCHMULLER-ROVILLER, Y., MAUEL, J. Phagocytosis enhances murine macrophages activation by interferon- γ and tumor necrosis factor- α . **Eur. J. Immunol.**, v. 21, p.2553, 1991.
5. FERREIRA, A.P., TEIXEIRA, H.C. **Tópicos de Imunologia Básica**. 1^a. ed. Juiz de Fora: Do autor, 2005. 83 p.
6. GOPINATH, V.K., MUSA, M., SAMSUDIN, A.R., LALITHA, P., SOSROSENO, W., Role of nitric oxide in hydroxyapatite-induced phagocytosis by murine macrophage cell line (RAW 264.7). **Arch. of Oral Biol.**, in press, 2005
7. GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGWISKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite and (¹⁵N) nitrite in biological fluids. **Anal Biochem**, Orlando, v.126, n.1, p.131-138, Oct 1983.
8. GRIMSDOTTIR, M.R., HENSTEN-PETTERSEN, A., KULLMANN, A. Cytotoxicity effect of orthodontic appliances. **Eur J Orthod**, Oxford, v.14, n.1, p. 47-53, Feb 1992.
9. GRIMSDOTTIR, M.R., HENSTEN-PETTERSEN, A. Cytotoxicity and antibacterial effects of orthodontic appliances. **Scand. J. Dent. Res.**, v.101, n.4, p. 229-231, 1993.
10. HENSTEN-PETTERSEN, A. Skin and mucosal reactions associated with dental materials. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.106, n.2 PT 2, p.707-712, Apr 1998.

11. HOLMES, J., BARKER, M.K., TUNCAY, O.C. Cytotoxicity of orthodontics elastics. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v. 104, n.2, p. 188-191, Aug. 1993.
12. HUGET, E. F.; PATRICK, K. S. Observations on the elastic behavior of a synthetic orthodontic elastomer. **J. Dent. Res.**, v. 69, n. 2, p. 496-501, Nov. 1990.
13. KENDALL, H.K., MARSHALL, R.L; BARTOLD, P.M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Dis.**, v.7, n.1, p. 2-10, Jan. 2001
14. KRONCKE, K., FEHSEL, K., KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotein – How, why, when, and where? **Nitric Oxide**, v.1, n.2, p.107-20, Jan. 1997.
15. LAPPIN, D.F., KJELDSSEN, M., SANDER, L., KIANE, D.F. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J. Periodont Res**, v. 35, n.6, p. 369-373, Dec. 2000.
16. LOHINAI, Z.M., SZABO, C. Role of nitric oxide physiology and patophysiology of periodontal tissues. **Med. Sci. Monit.**, v.4, n.6, p. 1089-1095, 1998.
17. MATEJKA, M., ULM, C., PARTYKA J. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J. Periodontal Res**, v. 33, n. 8, p. 517-8, Nov. 1998.
18. MORTON, M. **Rubber technology**. 3^a. ed. Londres: Chapman & Hall, 1995. 638 p.
19. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, Amsterdam, v.65 n.1-2, p.55-63, Dec 1983.
20. OHASHI, M.; IWASE, M.; NAGUMO, M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. **J. Oral Pathol Med**, Copenhagen, v.28, n.8, p. 355-359, Sep 1999.
21. PACHECO, M.C.T.; WIGG, M.D.; CHEVITARESE, O. Biocompatibilidade das soldagens ortodônticas. **Rev. SBO**, v. 2, n.8, p. 233-238, 1995.
22. SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. **J Dent**, Bristol, v.2, n. (suppl) 22, S6-S11, Jun 1994.
23. SILVA, A.A.; FERREIRA, A. P.; SOUZA, M.A.; VITRAL, J.C.A. Efeito das ligaduras elásticas sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células J774; artigo submetido à avaliação pela revista Dental Press (protocolo nº 01508).

24. STEVENSON, S.J., KUSY, P.R. Force application and decay characteristics of untreated and treated polyurethane elastomeric chains. **Angle Orthod.**, Appleton, v. 64, n.6, p.455-467, Apr. 1994.
25. STOIKA, R.; KASHCHAK, N.; LUTSIK-KORDOVSKY, M. L.; BOYKO, M.; BARSKA, M.; TSYRULNYK, A. In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. **Med Sci Monit**, Warsaw, v.7, n.4, p.652-658, Jul-Aug 2001.
26. TALOUMIS, J.L., SMITH, T.M., HONDRUM, S.O., LORTON, L. Force decay and deformation of orthodontic elastomeric ligatures. **Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.**, St. Louis, v. 11, n.1, p. 1-11, Jan. 1997.
27. TOZUM, T.E., TURKYILMAZ, I., YAMALIK, N., TUMER, C., KILINE, A., KARABULUT, E., ERATAY, K. Analysis of the possible impact of inflammation severity and early and delayed loading on nitric oxide metabolism around dental implants. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.20, n.4, p. 547-556, Aug. 2005.
28. WILSON, 2000 In: Masters, J. R. W editor. *Animal Cell Culture*. New York: Oxford University Press; 2000, 3^a ed., p. 175-218.
29. WONG, A.K. Orthodontic elastic materials. **Angle Orthod**, v. 46, n. 2, p. 196-205, Apr. 1976.
30. YOUNG, J., SANDRIK, J.L. The influence of preloading on stress relaxation of orthodontic lastic polymers. **Angle Orthod.**, Appleton, v.49, n.2, p. 104-109, Apr. 1979.

3 - ANEXOS:

3.1 – Anexo A – Artigo 1: Carta de aceite

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS ODONTOLÓGICOS ATRAVÉS DO MÉTODO DE MTT E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO: DESCRIÇÃO DE UMA TÉCNICA

(CYTOTOXICITY ASSESSMENT OF DENTAL MATERIALS WITH THE MTT AND NITRIC OXIDE PRODUCTION METHOD – DESCRIPTION OF A TECHNIQUE)

JULIA CRISTINA DE ANDRADE VITRAL
PÓS-GRADUANDA – MESTRADO EM SAÚDE BRASILEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ADRIANA ALVES SILVA
PÓS-GRADUANDA – MESTRADO EM SAÚDE BRASILEIRA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

MARIA APARECIDA DE SOUZA
MESTRE E DOUTORA EM IMUNOLOGIA
PROFESSORA VISITANTE – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ANA PAULA FERREIRA
MESTRE E DOUTORA EM IMUNOLOGIA
PROFESSORA ASSOCIADA – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ROBERT WILLER FARINAZZO VITRAL
MESTRE E DOUTOR EM ORTODONTIA
PROFESSOR ASSOCIADO – UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

CORRESPONDÊNCIA: JULIA CRISTINA DE ANDRADE VITRAL – javitral@acessa.com

AV. BARÃO DO RIO BRANCO, 2595/1604 – 36010 907– (32)32323596 -JUIZ DE FORA/MG

Carta de Aceite - pboci



Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada

----- Forwarded message -----

From: **robert willer farinazzo vitral**
Date: 27/03/2008 13:05
Subject: declaração artigo original PBOCI

--- Mensagem Original ---

Data: 3/27/2008
De: "apesb"
Assunto: PBOCI para Robert Vitral

Prof. Robert Vitral,

Os editores concordaram com as modificações realizadas pelos autores no artigo "Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de óxido nítrico: descrição de uma técnica", tendo sido o artigo enquadrado na categoria "Artigo Original".

Aproveito a oportunidade para comunicar que o trabalho será publicado na volume 8, número 3, referente aos meses de setembro a dezembro de 2008.

Continuo a disposição para esclarecimentos.

Cordialmente,

Ana Maria