

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**  
**NÚCLEO DE PESQUISA EM ORTODONTIA E ODONTOPEDIATRIA**

**JULIA CRISTINA DE ANDRADE VITRAL**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BRÁQUETES, CERÂMICOS E  
PLÁSTICOS, 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 a obtenção do título de Mestre em Saúde Brasileira.

**Orientador: Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira**

**JUIZ DE FORA**  
**FEVEREIRO – 2008**

Vitral, Julia Cristina de Andrade.

Avaliação do efeito de bráquetes, cerâmicos e plásticos, sobre a viabilidade celular e produção de óxido nítrico em células J774 / Julia Cristina de Andrade Vitral ; orientador: Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral ; co-orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ferreira. - - 2008.

137f.

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

Bráquetes ortodônticos. 2. Materiais dentários. 3. Viabilidade celular

I. Vitral, Robert Willer Farinazzo. II. Ferreira, Ana Paula. III. Título.

CDU 616.314

**Julia Cristina de Andrade Vitral**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BRÁQUETES, CERÂMICOS E PLÁSTICOS, 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 a obtenção do título de Mestre em Saúde. Aprovada em 19 de fevereiro de 2008.

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Cátia Cardoso Abdo Quintão – Doutora em Ortodontia - UERJ

---

Profa. Dra. Ana Paula Ferreira – Doutora em Imunologia - UFJF

---

Profa. Dra. Rosangela Almeida Ribeiro – Doutora em Odontopediatria - UFJF

Suplentes

---

Prof. Dr. Evandro Toledo Lourenço Junior – Doutor em Periodontia - UFJF

---

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

JUIZ DE FORA  
2008

A Robert, meu marido,  
por sua compreensão e apoio às  
minhas escolhas e possibilidades.  
Por seu amor,  
afeto e incentivo em  
todos os momentos.  
Aos nossos filhos,  
Ramon e Juliana,  
pelo generoso amor que nos oferecem  
e por tornarem nossa vida tão plena  
e instigante.

Aos meus pais, Umberto e Cecília,  
a minha homenagem carinhosa.

DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador e coordenador do Núcleo de Pesquisa em Ortodontia e Odontopediatria do PPgS/UFJF Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral, pela confiança, segurança, imparcialidade, determinação e incentivo em minha formação profissional, assim como na de todos aqueles que têm o privilégio de tê-lo como mestre.

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

À querida Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza, professora visitante do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia por sua delicadeza, atenção, disponibilidade e conhecimento ímpar no trabalho dentro do Laboratório de Imunologia/ICB – UFJF.

Ao professor Dr. Luiz Cláudio Ribeiro, do Departamento de Estatística, da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo tratamento estatístico e pela atenção disponibilizada no decorrer do trabalho.

À amiga Adriana Alves Silva, pelo apoio, pelo exemplo de competência nos estudos e pela solidariedade e troca de experiências no desenvolvimento das pesquisas e artigo.

Aos professores e amigos Marcelo Reis Fraga, pela versão do artigo para o inglês, e Roberto Sotto-Maior Fortes de Oliveira, pelo auxílio na formatação dos gráficos.

À Dra. Marília de Pádua Dornelas Corrêa, pelo apoio e disponibilização dos serviços da Clínica Plastic Center para a esterilização dos materiais.

Ao colega Caio Cezar de Souza Alves cuja ajuda pontual foi essencial em momentos específicos da execução do ensaio *in vitro*.

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

Aos ex-alunos Clotilde, Hélder, Lívian, Márcio, Paulo Henrique e Simone e alunos Acir, Carlos, Grazielle, Hélio, Renata e Vanessa, pelo acolhimento nos Seminários e nas aulas de Bioética.

MUITO OBRIGADA!

*“Isso de querer  
ser exatamente aquilo  
que a gente é  
ainda vai  
nos levar além”*

*Paulo Leminsk*

## RESUMO

Estudos apontam para o fato de os bráquetes cerâmicos serem quimicamente inertes no meio bucal, enquanto os bráquetes de policarbonato podem degradar-se liberando bisfenol-A (BPA) e os bráquetes de polioximetileno, o formaldeído. Juntamente com os testes de citotoxicidade tradicionais, o estudo da produção celular de Óxido Nítrico (NO) estimulado por determinado material é um método capaz de avaliar seu potencial citotóxico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade celular (citotoxicidade) destes três grupos de bráquetes sobre cultura celular da linhagem de macrófagos murinos J774 pelo método MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide} e o estímulo dos bráquetes à produção de óxido nítrico pelos macrófagos. A avaliação das culturas celulares foi realizada em três intervalos de tempo: 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular em todos os grupos foi maior no período final da avaliação (72 horas) em relação ao período inicial (24 horas), aumento este significativo nos grupos controle e bráquetes cerâmicos. As médias finais nos grupos de bráquetes não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. A produção de NO foi significativamente maior em todos os grupos no período final em relação ao período inicial. Não houve diferença significativa entre as médias finais dos grupos de bráquetes e do grupo controle, embora os bráquetes de polioximetileno tenham apresentado médias significativamente maiores nos períodos de 24 e 48 horas. Numa segunda etapa do trabalho os macrófagos foram ativados com interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) procurando simular uma condição comum no organismo humano no qual estas citocinas são produzidas e liberadas frente à presença de antígenos. A viabilidade celular em todos os grupos foi

significativamente maior no período final da avaliação em relação ao período inicial. As médias finais da viabilidade celular nos grupos de bráquetes não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. A produção de NO foi significativamente maior em todos os grupos no período final da avaliação em relação ao período 24 horas. Todavia não houve uma maior produção de óxido nítrico relacionado à presença dos bráquetes associada ao estímulo com Interferon- $\gamma$ .

**Palavras-chave:**

1 - Bráquetes

3 - Óxido Nítrico

2 – Citotoxicidade

4 – Viabilidade

5 – Interferon-gama

## SUMMARY

Studies point to the fact that ceramic brackets are chemically inert to the oral cavity, whereas polycarbonate and polyoxymethylene brackets may degrade releasing bisphenol-A and formaldehyde, respectively. In addition to the traditional cytotoxicity tests, the study of nitric oxide cellular production stimulated by a specific material has shown to be a reliable tool for evaluating its cytotoxic potential. The present study was aimed at assessing cellular viability by MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide} assay in a murine macrophage cell line J774 in the presence of esthetic brackets, and quantify nitric oxide production by these macrophages. Evaluation of cell culture was undertaken in three time intervals: 24, 48, and 72 hours. Cellular viability in all groups was higher at the final time interval (72 hours) in relation to the initial time (24 hours). This increase was significant in the control and ceramic bracket groups. Final means in the bracket groups did not show significant differences when compared to the control group. Nitric oxide production was significantly greater in all groups at the final time interval in relation to the initial time. There was no significant difference between the final means of the bracket groups and the control group, although polyoxymethylene brackets have shown significantly greater means at times 24 and 48 hours. In a second step of the study, macrophages were activated with gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) in order to simulate a common condition of the human body in which these cytokines are produced and released with the presence of antigens. Cellular viability in all groups was higher at the final time interval (72 hours) in relation to the initial time. Final means in the bracket groups did not show

significant differences when compared to the control group. Nitric oxide production was significantly greater in all groups at the final time interval in relation to the initial time. However, there was not an increase of nitric oxide production in relation to the presence of brackets associated with the Interferon- $\gamma$  stimulus.

## **KEY WORDS**

1- Brackets

3- Nitric Oxide

2- Cytotoxicity

4 – Viability

5 – Interferon-gama

## LISTA DE ABREVIATURAS

**BPA** – Bisfenol A

**C** – Cerâmica (o)

**EDRF** – Fator de relaxamento derivado do endotélio

**eNOS** – Óxido nítrico sintase endotelial

**FCS** – Soro fetal bovino

**GC** – Grupo Controle

**GBCE** – Grupo de bráquetes de cerâmica

**GBPC** – Grupo de bráquetes de policarbonato

**GBPOM** – Grupo de bráquetes de polioximetileno

**IFN- $\gamma$**  – Interferon-gama

**IL-1** – Interleucina 1

**iNOS** – Óxido nítrico sintase induzida

**LPS** – Lipopolissacarídeo

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

**nM** – nanomolar

**NO** – Óxido Nítrico

**NOS** – Óxido nítrico sintase

**nNOS** – Óxido nítrico sintase neuronal

**PC** – Policarbonato

**PMNs** – Polimorfonucleares

**POM** – Polioximetileno

**TNF** – Fator de Necrose Tumoral

**$\mu$ M** – micromol

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

EPIGRAFE

RESUMO

SUMMARY

ABREVIATURAS

### **1 - QUALIFICAÇÃO**

TERMO DE APROVAÇÃO

RESUMO

<b>1.1 – INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1.1 – Revisão bibliográfica.....	20
1.1.1.1 – Bráquetes de cerâmica.....	20
1.1.1.2 – Policarbonato e polioximetileno.....	26
1.1.1.2.1 – Bráquetes de policarbonato.....	30
1.1.1.2.2 – Bráquetes de polioximetileno.....	33
1.1.1.3 – Óxido Nítrico: propriedades gerais.....	36
1.1.1.4 – Óxido Nítrico: citotoxicidade e ativação celular.....	41
1.1.1.5 – Óxido Nítrico e Odontologia.....	44
1.1.2 – Objetivos.....	47
<b>1.2 – MATERIAL E MÉTODO</b> .....	48

1.2.1 – Material .....	48
1.2.2 – Método.....	48
1.2.2.1 – Cultura celular da linhagem de macrófagos murinos J774.....	48
1.2.2.2 – Cultura de células na presença dos materiais.....	49
1.2.2.2.1 – Cultura de células na presença dos materiais sem a presença de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) .....	49
1.2.2.2.2 – Cultura de células na presença dos materiais com a presença de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) .....	50
1.2.2.3 – Teste de viabilidade (MTT assay).....	51
1.2.2.4 – Produção de óxido nítrico.....	51
1.2.2.5 – Análise estatística.....	52
<b>1.3 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
<b>2. ARTIGOS.....</b>	<b>63</b>
<b>2.1 – ARTIGO 1 - Avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método de MTT e produção de óxido nítrico: descrição de uma técnica.....</b>	<b>64</b>
2.1.1 – Artigo 1 - Resumo .....	65
<b>2.2 .– ARTIGO 2 - Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 na presença de bráquetes cerâmicos, de policarbonato e de polioximetileno. (Parte 1).....</b>	<b>67</b>
2.2.1 – Artigo 2 – Resumo.....	68
<b>2.3 - ARTIGO 3 - Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 estimulados com interferon-gama (IFN-<math>\gamma</math>) na presença de bráquetes cerâmicos, de policarbonato e de polioximetileno. (PARTE II).....</b>	<b>86</b>

<b>3 – ANEXO(S)</b> .....	102
<b>3.1 – ANEXO A</b> .....	103
3.1.1 – Artigo 1 –.....	103
3.1.2 - <b>Artigo 2</b> - Carta de aceite – PBOCI.....	104
<b>3.2 – ANEXO B</b> .....	105
3.2.1 – Artigo 2 - .....	105
3.2.2 – Artigo 2 – Carta de aceite – AJODO.....	107

# **1 - QUALIFICAÇÃO**

## TERMO DE APROVAÇÃO

JULIA CRISTINA DE ANDRADE VITRAL

### AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BRÁQUETES, CERÂMICOS E PLÁSTICOS, SOBRE A CITOTOXICIDADE E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS J774

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

**Orientador:** Prof. Dr. Robert Willer Farinazzo Vitral  
Mestre e Doutor em Ortodontia, UFRJ/RJ  
Departamento de Odontologia Social e Infantil, UFJF/MG

**Examinador** Profa. Dra. Ana Paula Ferreira  
**Interno:** Mestre e Doutora em Imunologia, USP/SP  
Departamento de Imunologia, Microbiologia e Parasitologia  
UFJF/MG

**Examinador** Profa. Dra. Cátia Cardoso Abdo Quintão  
**Externo:** Mestre e Doutora em Ortodontia, UFRJ/RJ  
Departamento de Odontologia Preventiva e Comunitária  
UERJ/RJ

Juiz de Fora  
26 de junho de 2006

## RESUMO

Desenvolver e selecionar materiais biocompatíveis têm sido um dos grandes desafios na área de saúde. Reações tóxicas, inflamatórias, alérgicas ou mutagênicas são possíveis respostas biológicas aos materiais e a toxicidade é um dos principais parâmetros para a avaliação biológica. A Ortodontia, com o objetivo de promover movimentações dentárias, utiliza um conjunto de materiais e, dentre eles, os bráquetes. Estes acessórios, disponíveis nas formas metálicas, plásticas ou cerâmicas, estão fixados à superfície dos dentes e em contato direto com os tecidos e com o meio bucal, um ambiente úmido que pode modificar as propriedades dos mesmos. Alterações nas propriedades dos materiais no meio bucal podem ter efeitos nocivos nos tecidos adjacentes, levando ao desenvolvimento de processos inflamatórios. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a citotoxicidade dos bráquetes estéticos em células da linhagem de macrófagos murinos J744 através da técnica do MTT (Thiazolyl Blue Test), para averiguação da viabilidade celular, assim como a produção de óxido nítrico determinada pela ativação dos macrófagos.

### Palavras-chave:

1 - Bráquetes

3 - Óxido Nítrico

2 – Citotoxicidade

4 – Viabilidade

5- MTT

## 1.1 - INTRODUÇÃO

A Odontologia tem como meta principal manter ou melhorar a qualidade de vida do paciente seja pela prevenção de doenças, pelo alívio da dor, pela melhoria da eficiência mastigatória, pelo aprimoramento da fonética e/ou pela melhora da aparência. Muitos desses objetivos pedem a reposição ou a alteração da estrutura dentária existente, assim como a alteração do posicionamento dos dentes. Desenvolver e selecionar materiais biocompatíveis têm sido um dos principais desafios. Metais, cerâmicas, polímeros e resinas compostas são os quatro grupos de materiais empregados em Odontologia. Até meados do século passado, pouca informação científica a respeito desses materiais estava disponível. Reações tóxicas, inflamatórias, alérgicas ou mutagênicas são possíveis respostas biológicas aos materiais. A toxicidade é um dos principais parâmetros para a avaliação de resposta biológica e do potencial relacionado com a dose do material para causar a morte de células ou tecidos sendo hoje o primeiro teste de triagem usado para quase todos os materiais (ANUSAVICE, 2005).

A Ortodontia usa diversos tipos de materiais classificados como materiais restauradores provisórios (fios, bandas, bráquetes, resinas acrílicas, cerâmicas entre outros) que são destinados à aplicação por um período médio ou longo. O aparelho ortodôntico é constituído por um conjunto desses materiais. Acentuados esforços têm sido feitos para tornar o aparelho fixo mais estético pela eliminação de sua aparência metálica, seja através da fixação dos bráquetes na superfície lingual dos dentes ou pela produção desses acessórios da mesma cor dos dentes. Os bráquetes estão disponíveis no mercado nas formas metálicas, plásticas ou cerâmicas e são submetidos a um ambiente

bucal úmido que pode modificar as suas propriedades (PROFFIT, 1995; MOCKERS, DEROZE e CAMPS, 2002).

Qualquer um desses materiais na boca cria uma interface dinâmica com interações que podem alterar um ou outro, determinando tanto uma resposta biológica ativa ao material, a biocompatibilidade, quanto uma capacidade de o material sobreviver, resistir à degradação ou sofrer corrosão no corpo. A biocompatibilidade é dependente da liberação de elementos desses materiais. Além disso, a composição, o pré-tratamento e o manuseio desses aparatos influenciam a liberação de tais elementos (SJÖGREN, SFETTEN e DAHL, 2000; ANUSAVICE, 2005).

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

Sob tais circunstâncias, é de fundamental importância a avaliação da citotoxicidade dos bráquetes estéticos, usados atualmente na clínica ortodôntica, a fim de detectar possíveis efeitos nocivos desses aparatos ao meio bucal.

## 1.1.1 – Revisão bibliográfica

### 1.1.1.1 – Bráquetes de cerâmica

O aumento do número de pacientes adultos na prática ortodôntica levou a uma maior atenção ao projeto estético dos acessórios utilizados. Vários novos tipos de bráquetes cerâmicos, que incluem os de cristal simples  $Al_2O_3$  ou os policristalinos  $Al_2O_3$  ou  $Al_2O_3/SiO_2$  em sua composição foram introduzidos no mercado. (ELIADES *et al.*, 1994)

Cerâmica é uma larga classe de materiais que inclui pedras preciosas, vidros, esmaltes, mistura de compostos cerâmicos e óxidos metálicos. Essencialmente, uma cerâmica não é nem metálica nem polimérica. É um material renomado por sua dureza, sua resistência a altas temperaturas, assim como à degradação química. A estrutura atômica que proporciona essas vantagens, também é responsável por seu mais evidente problema: a fragilidade (SWARTZ, 1988).

Alguns tipos especiais de cerâmicas são usados em Medicina para substituição ou reconstrução de partes afetadas ou destruídas do sistema esquelético, são as biocerâmicas. Estas podem ser reabsorvíveis (tricalciofosfato), bioativas (hidroxiapatita, vidro bioativa e cerâmica vitrificada bioativa) e materiais bioinertes como o óxido de alumínio sinterizado ( $Al_2O_3$ ). Cerâmicas bioinertes são usadas exclusivamente para a substituição de ossos, articulações de quadril e implantes dentários que por sua vez são materiais que devem satisfazer exigências estritas em relação às propriedades de corrosão, pureza química e biocompatibilidade (KUNES *et al.*, 2000).

Os bráquetes cerâmicos foram introduzidos na especialidade ortodôntica numa tentativa de atender a uma crescente demanda de pacientes adultos nos consultórios e pelo conseqüente apelo por dispositivos esteticamente agradáveis (BRITTON *et al.*, 1990; ELIADES *et al.*, 1994; FELDNER *et al.*, 1994; MEGURO *et al.*, 2006). Desenvolvidos no final dos anos 80, até certo ponto, eles superaram as limitações estéticas dos bráquetes plásticos suportando a força de torque, mostrando-se mais duráveis e mais resistentes a manchas e descolorações (FELDNER *et al.*, 1994; PROFFIT, 1995; BAZAKIDOU *et al.*, 1997; FERNANDEZ, CANUT, 1999;), além de serem quimicamente inertes a fluidos orais (MEGURO *et al.*, 2006).

Amplamente utilizados, Graber e Vanarsdall(1996) relatam que, teoricamente, os bráquetes cerâmicos (feitos de óxido de alumínio) podem combinar a estética do plástico e a confiabilidade do bráquetes metálico e, somados a isso, segundo Proffit (1995), estes dispositivos possuem outras características que os favorecem como a possibilidade de serem modelados individualmente, para cada dente, garantindo uma boa estabilidade dimensional.

Todos os bráquetes cerâmicos são compostos de alumina (SHWARTZ, 1988). A alumina existe na natureza como um cristal simples ou como unidades de policristais e, devido a isso, são chamados de monocristalinos ou policristalinos, respectivamente (SHWARTZ, 1988; MEGURO *et al.*, 2006;).

Os bráquetes policristalinos são sinterizados ou fundidos a partir de partículas de óxido de alumínio, de aproximadamente 3 microns. Essas partículas são misturadas a um aglutinante até que tomem um tamanho próximo a 30 microns. Após esse procedimento, elas são levadas a um molde

e este, por sua vez, a altas temperaturas (1800°C). O passo seguinte é o corte com ferramentas diamantadas para que a peça tome as dimensões adequadas. Realizadas as finalizações, tratamentos térmicos são aplicados para que haja equilíbrio nas propriedades físicas. Imperfeições estruturais visualmente desprezíveis, ou traços de impurezas de no mínimo 0,01% podem servir como foco para a propagação de quebras sob estresse. A produção de bráquetes policristalinos é menos complexa e, conseqüentemente, esses bráquetes cerâmicos são mais prontamente disponíveis no mercado (SWARTZ, 1988).

A vantagem primária dos bráquetes monocristalinos manufaturados é a eliminação do possível estresse induzido por impurezas ou imperfeições, visto que esses são confeccionados por um processo inteiramente diferente. Grandes peças de cristais simples de safira são moídas em formas e dimensões variadas. Moldes, com o formato desejado do bráquete, são preenchidos com a massa de óxido de alumínio e, em seguida, são levados a temperaturas superiores a 2100°C. Essa massa é vagarosamente esfriada permitindo uma cristalização cuidadosamente controlada. O cristal resultante é mais puro que sua contraparte natural. A desvantagem desse tipo de bráquete cerâmico é a dificuldade de fabricação, somada à despesa de moagem do material conhecido como o 3º mais duro da natureza. Isso envolve o desenvolvimento de tecnologias com seus inerentes novos problemas (SWARTZ, 1988).

Carter (1989) afirmou que em 1986, 85% de seus pacientes iniciaram o tratamento usando bráquetes de safira monocristalina e os usaram exclusivamente em caninos e incisivos maxilares. A recomendação para o uso

desses bráquetes apenas nos dentes superiores anteriores, devido à dificuldade de remoção, ao custo do material, às possíveis fraturas e desgastes dentários, foi também corroborada por, Proffit (1995), Ogaard, Rolla e Arends (1988), Ghafari (1992).

O uso incorreto dos bráquetes cerâmicos ou as indicações equivocadas podem abrir margem a problemas variados, tais como, o alto coeficiente de fricção entre bráquetes e arco, o que pode interferir no tratamento ortodôntico. Por serem mais volumosos, os bráquetes cerâmicos têm maior superfície de contato com a mucosa bucal, causam maior desconforto ao paciente e por sua vez, há um aumento na força friccional, demonstradamente com os maiores valores estatisticamente significantes. A superfície mais áspera desses acessórios, devido à dificuldade de acabamento e de polimento, em contato com o fio ortodôntico, afeta o deslizamento mecânico, causa corrosão e coloca em perigo a estética e a biocompatibilidade (NISHIO, MOTTA, ELIAS, MUCHA, 2004).

A interação química entre o fio ortodôntico e o material do bráquete, cuja superfície pode produzir abrasão em fios suaves, faz com que pequenos pedaços de fio sejam desprendidos e fiquem aderidos ao corpo do bráquete. (PROFFIT, 1995)

Além de maior dureza do material cerâmico (propícia ao desgaste dos dentes antagonistas), da resistência friccional fio/bráquete cerâmico (que é maior e menos previsível do que aquela existente entre fio/bráquete metálico, o que dificulta a determinação do nível de força mais adequado) e o controle de ancoragem dos dentes, Graber e Vanarsdall (1996) ressaltam outras desvantagens dos bráquetes cerâmicos: a superfície áspera e porosa que

favorece o aparecimento da placa bacteriana e de manchas ao redor do esmalte, a maior fragilidade em relação aos bráquetes metálicos e a dificuldade de remoção desses acessórios ao final do tratamento.

Quanto à superfície áspera, Karamouzos, Athanasiou e Papadoulos, (1997) afirmam que determinadas dietas alimentares (bebidas excessivas, cafeína etc.), práticas higiênicas incorretas ou aplicações de *baton*, podem alterar os resultados estéticos dos bráquetes cerâmicos. Em se tratando da presença de poros, de interferências de fabricação e da propagação de linhas de fratura, há um comprometimento dos bráquetes cerâmicos em qualquer momento de uso clínico.

Os bráquetes monocristalinos possuem uma superfície mais lisa. Teoricamente isso significa maior resistência à fratura. Mas, uma pequena superfície desses bráquetes, quando arranhada ou recortada, tende a se estender reduzindo a resistência. Como no tratamento ortodôntico há movimentos de torque com momentos de força entre 2000 e 3000g/mm, na análise técnica ou nos testes clínicos, tensões dessa magnitude levam naturalmente a fraturas (PROFFIT, 1995).

O material cerâmico é de extrema dureza e possui ligações atômicas direcionais, altamente localizadas com um entrelaçamento que não permite flexibilidade com trocas de ligações e conseqüente redistribuição do estresse. Quando as tensões do referido estresse alcançam um nível crítico, as ligações interatômicas quebram e ocorrem as falhas do material. Isso é chamado de fracasso da fragilidade e ocorre devido à susceptibilidade do material (SWARTZ, 1988).

A ocorrência de problemas na descolagem dependerá da interface bráquete/adensivo. As bases de tais acessórios com ranhuras permitem uma engrenagem mecânica ao adesivo. A configuração de bases com superfícies lisas confere uma camada química que aumenta a força de ligadura, sendo, nesse caso, a força mais crítica porque eleva a capacidade de adesão a níveis suficientemente altos para causar danos à superfície do esmalte do dente (SWARTZ, 1988; BRITTON, *et al.*, 1990; FERNANDEZ, CANUT, 1999).

Devido à dificuldade de remoção dos bráquetes cerâmicos ao final do tratamento, os pacientes devem ser avisados, inclusive com alusão a esse detalhe quando o tratamento ortodôntico é iniciado (BRITTON *et al.*, 1990; CARTER, 1989). Os bráquetes cerâmicos mecanicamente aderidos ao dente não apresentaram problemas na descolagem (SWARTZ, 1988).

Crítica e cientificamente, pesquisas de revisão de novos produtos devem preceder a sua comercialização e o seu uso. Colaborações entre mercado, entidades de classe e a comunidade científica, devem ser buscadas para que diretrizes para o uso de bráquetes cerâmicos sejam estabelecidas seguindo experimentos controlados (GHAFARI, 1992).

Recentemente, um novo tipo de bráquete cerâmico de fosfato de cálcio, com excelente biocompatibilidade, baixas propriedades de fricção e compatibilidade em dureza com o esmalte dentário foi introduzido no mercado, o *Hyaline* (Tomy International Inc., Tokyo, Japan) (MEGURO, HAYAKANA, KAWASAKI, KASAI, 2006).

A partir do momento em que novos modelos de bráquetes cerâmicos vão sendo criados, as diferenças e os problemas estruturais tendem a diminuir em favor de uma ótima configuração, pureza e ausência de falhas de

manutenção. Propriedades óticas excelentes são promessas de apelo estético adicional sem comprometer de forma significativa o aspecto funcional (SWARTZ, 1988; KARAMOUZOS, ATHANASIOU e PAPADOULOS, 1997).

Os ortodontistas descobriram as desvantagens dos bráquetes cerâmicos, e assumiram a responsabilidade de melhorar seus produtos. Em um período de tempo relativamente curto, novos bráquetes cerâmicos foram introduzidos no mercado e estão em uso. A cooperação, na formulação e na internacionalização de padrões aceitáveis evitará que valiosas pesquisas sejam desperdiçadas. O desenvolvimento de padrões nacionais/internacionais será útil tanto para fabricantes quanto para clínicos, o que propiciará conseqüentes melhorias para os pacientes.

#### **1.1.1.2 – Policarbonato e polioximetileno**

Policarbonato e polioximetileno são materiais poliméricos utilizados em diversos materiais com aplicações nas mais diversas áreas. A matéria é formada por pequenas moléculas denominadas de monômeros ou por moléculas gigantes denominadas de polímeros. Estes são produzidos por reações reversíveis ou não, espontâneas ou provocadas (por calor ou reagentes) em que os monômeros combinam-se quimicamente para formar moléculas longas, mais ou menos ramificadas, com a mesma composição centesimal. As reações acontecem em cadeia ou através de poliadição ou policondensação. As configurações e a formação dos polímeros são praticamente sem limites sendo que as propriedades dos materiais poliméricos são caracterizadas fundamentalmente por aspectos tais como o comprimento,

a extensão das ramificações e das ligações cruzadas, bem como a organização das cadeias. Uma reação intermolecular de repetição com capacidade indefinida de progressão é denominada de polimerização e um composto químico é uma macromolécula que possui peso molecular maior que 5 000 (ANUSAVICE, 2005).

Sempre existiram polímeros naturais, como as resinas fósseis (âmbar), o casco de tartaruga e os chifres animais que se comportam de maneira similar aos plásticos, polímeros manufaturados. Em 1862, Alexander Parker introduziu o primeiro plástico feito pelo homem, na Segunda Grande Exposição Internacional, em Londres. Numa tentativa de imitar o marfim, misturou-se nitro-celulose com cânfora na presença de álcool para fazer o Parkesine, um dos plásticos mais antigos, efetivamente criados (MATASA, 2004; USP/FAU/DEPTECNOLOGIA, 2006).

Em outro momento, Einhorn e Bischoff descobriram o policarbonato e este material passou a ser desenvolvido em 1950. Foi quando Baekeland sintetizou resinas de formaldeído emergindo assim o primeiro plástico totalmente sintético. Entre 1920 e 1950 surgiram os polímeros modernos e durante a década de 60 foi a vez dos plásticos de engenharia (WIKIPÉDIA, 2006).

Anusavice (2005) descreve as propriedades físicas dos polímeros, mostrando que, em relação à capacidade de deformação e recuperação, as forças aplicadas nos mesmos podem causar deformação elástica, plástica, ou viscoelástica (que combina as deformações plásticas e elásticas). Na deformação elástica há uma reversibilidade na deformação, isto é, as cadeias aleatoriamente enroladas se endireitam e se retraem como molas, retornando à

sua localização original, quando for eliminada a tensão. A deformação plástica que ocorre quando cadeias de polímeros deslizam umas sobre as outras e se realocam no interior do material é irreversível e o resultado é uma nova forma permanente. A deformação viscoelástica é uma combinação das duas formas anteriores, mas tem a recuperação apenas da forma elástica que acontece à medida que a tensão vai sendo diminuída, ou seja, não é uma deformação instantânea.

Em se tratando da propriedade de solvatação, os polímeros, de um modo geral, são dissolvidos lentamente. Essas moléculas têm maior tendência a absorver um solvente, a inchar e a amolecer, do que a dissolver e, essa dissolução, acontece mais lentamente quanto mais longa for a cadeia (maior o peso molecular). Aqueles polímeros que possuem grande quantidade de ligações cruzadas não podem ser dissolvidos, pois estas impedem a completa separação da cadeia e retardam a dissolução. As propriedades térmicas de um polímero os classificam em termoplásticos e termorrígidos. Geralmente essas propriedades são influenciadas por mudanças na temperatura e no ambiente, e pela estrutura, composição e peso molecular do polímero. Os polímeros termoplásticos são melhores em se tratando de impacto e flexão e podem ser moldados e modelados assumindo a forma final quando resfriados. São, ainda, materiais que podem ser reaquecidos e remodelados repetidamente. Os polímeros termorrígidos sofrem mudança química irreversível, são insolúveis, não são fundíveis e geralmente apresentam estabilidade dimensional e resistência à abrasão superior quando comparados aos termoplásticos (ANUSAVICE, 2005).

Ferracane (2006) observou que muitas redes de polímeros, embora sejam estruturas em grande parte insolúveis, com estabilidade química e térmica relativamente alta, absorvem água e produtos químicos do ambiente em que se encontram. Conseqüentemente, estas redes também poderiam liberar componentes para suas adjacências. O autor discutiu que o fenômeno de absorção e de solubilidade poderia servir como um precursor para uma variedade de processos químicos e físicos, com atividades biológicas, assim como a produção de efeitos deletérios na estrutura e na função do material polimérico.

O policarbonato é relatado pela indústria como um produto estável e não reativo sob condições recomendadas de armazenamento, manuseio e uso pretendido, mas que por combustão ou decomposição térmica libera dióxido ou monóxido de carbono, traços de hidrocarbonetos, aldeídos, ácidos, fenóis, e seus derivados. O produto em sua forma de uso adequado não é considerado carcinogênico, mutagênico, teratogênico e nem tóxico para reprodução. Não é inflamável, ou corrosivo e pode causar irritação mecânica (MORELLI, 2005).

Tradicionalmente, os polímeros confeccionados para suprir necessidades profissionais também têm sido usados na Medicina e na Odontologia, há mais de quarenta anos através de lentes, membros e córneas artificiais, implantes cocleares e oftálmicos, enxertos vasculares, próteses, implantes faciais de bochechas, queixo, lábios, dorso do nariz, produtos médicos tais como luvas, seringas descartáveis, catéteres e inumeráveis produtos plásticos. Os polímeros usados nos materiais ortodônticos podem ser divididos em três classes com características distintas: (1) artefatos prontos para serem utilizados com sua forma final dada por fabricantes industriais; (2)

polímeros reformáveis usados como armação para uma variedade de artefatos removíveis ou funcionais e; (3) materiais poliméricos de impressão, adesivos e selantes. Os bráquetes ortodônticos plásticos estéticos enquadram-se na primeira categoria de polímeros manufaturados com grande demanda de uso. Como os policarbonatos têm alto módulo de força mostraram-se com pouca deformação elástica sob tensão e com resistência ao escoamento a frio. Entretanto, esses são materiais quimicamente não resistentes quando atacados por solventes. Policarbonatos, cujo monômero é o bisfenol-A (BPA), expostos a altas temperaturas favorecem a migração desse monômero para fora dos produtos de origem (HOWDESHELL,2003; MATASA, 2004).

Bráquetes de plástico transparente lançados no início dos anos 80, e arcos cobertos por plástico foram as primeiras tentativas de tornar o aparelho ortodôntico menos visível. A pouca durabilidade desses acessórios, a descoloração, as manchas e as quebras foram os maiores problemas encontrados. Além disso, arcos cobertos para melhorar ainda mais a aparência estética apresentavam pioras em suas propriedades, soltando a sua cobertura e os arcos descobertos, por sua vez, não deslizavam livremente através das canaletas dos bráquetes de plástico. Outras características a serem consideradas em relação aos bráquetes constituídos de plástico puro dizem respeito à resistência, absorção de água, descoloração e à compatibilidade com as resinas de colagem (PROFFIT, 1995; GRABER e VANARSDALL, 1996).

#### **1.1.1.2.1 – Bráquetes de policarbonato**

Embora os policarbonatos sejam poliésteres e derivem do teoricamente inofensivo ácido hialurônico, são considerados muito mais potencialmente perigosos do que a sua composição sugere e a razão para isso está relacionada ao bisfenol-A (BPA). Conhecido quimicamente como 4,4'-isopropilidenodifenol e com a fórmula química  $C_{15}H_{16}O_2$ , o BPA é correntemente usado na manufatura do policarbonato, de resinas e de fungicidas. Há setenta anos reconhecido por seu efeito estrogênico, seus derivados utilizados em áreas relacionadas à saúde são controversos. Alegações têm sido feitas com relação ao efeito gatilho à puberdade precoce em meninas (e, possivelmente, câncer) e às influências em relação à fertilidade masculina (MATASA, 2004).

Policarbonatos usados em dentística, sob determinadas condições térmicas durante a manufatura de restaurações, podem causar a decomposição do polímero resultando na liberação de BPA. Foi claramente demonstrado que tensões de estresses aceleram visivelmente a hidrólise desses materiais. Entre as causas desses efeitos de estresses, a química (efeito direto do estresse na hidrólise ou efeito indireto através de uma mudança na conformação) pode ser vista como provável (GHORBEL *et al.* 1995; SUZUKI *et al.*, 2000).

A mudança no BPA contido nos bráquetes ortodônticos de policarbonato e suas características de lixiviação foram estudadas pela imersão dos bráquetes na água, uma vez que o BPA foi assunto de controvérsias em Dentística devido ao seu potencial estrogênico. Os resultados sugeriram que a liberação de BPA na cavidade bucal tinha dependência direta com o tempo que os bráquetes aí permaneciam. Entretanto, foi avaliado que pouco ou nenhum

efeito estrogênico, devido à liberação de BPA, é esperado no corpo humano (WATANABE, HASE e IMAI, 2001).

Schafer *et al.* (1999) relataram não ser conhecido o acúmulo de BPA no corpo humano ou como este é metabolizado. Afirmaram também serem controversos os níveis de exposição da população a esse componente, quais seriam exatamente as condições que poderiam causar efeitos *in vivo* e se os xenoestrogênios têm efeitos adicionais.

Watanabe, Hase e Imai (2004) estudaram *in vivo* e *in vitro*, a degradação do polycarbonato e a formação de BPA em bráquetes de polycarbonato deixados na cavidade oral entre 18-40 meses assim como bráquetes deixados na água a 37 graus Celsius durante 34 meses. Através de cromatografia líquida, foram examinadas mudanças no polycarbonato, em relação ao conteúdo e ao peso molecular. O BPA pareceu ser liberado mais que o esperado na saliva que *in vitro*.

A prática de autoclavar meios de cultura, ou água destilada para preparar esses meios, em frascos de polycarbonato é um procedimento comum em laboratórios. Krishnan *et al.* (1993) avaliando frascos manufaturados com esse plástico, preenchidos com água destilada e autoclavados posteriormente concluíram que o uso de polycarbonato ou de plásticos semelhantes pode requerer exame cuidadoso para se determinar se produtos constituídos desses materiais contribuem significativamente para o rol das substâncias estrogênicas dispersas no meio ambiente, que são de difícil identificação e, que podem ser causadoras de doenças em pessoas e em animais.

Segundo Graber e Vanarsdall (1996), bráquetes de plástico puro precisam resistir também à distorção, à quebra e ao desgaste da canaleta, o que leva à perda do controle da movimentação do dente.

A ocorrência de efeitos deletérios na estrutura e na função do material polimérico inclui mudanças volumétricas como expansão, mudanças físicas como plasticização e amolecimento e mudanças químicas como oxidação e hidrólise. As propriedades das redes de polímeros podem ser permanentemente modificadas por essas alterações do mesmo modo que o desempenho dessas redes pode ser também comprometido (FERRACANE, 2006).

Durante a terapia ortodôntica, vários sistemas de força são empregados, há uma resposta biológica tecidual e o movimento dentário ocorre. Tudo isso acontece somente quando forças aplicadas superam a fricção da interface bráquete e arco. Quando falhas, quebras e fraturas de bráquetes ocorrem, há interrupção na continuidade do tratamento e uma conseqüente alteração da resposta biológica. Os bráquetes de policarbonato são reconhecidos por exibirem deformações permanentes (AIRD e DURNING, 1987; DOWNING, McCABE e GORDON, 1994; FELDNER, SARKAR, SHERIDAN e LANCASTER, 1994; ALKIRE, BAGBY, GLADWIN e KIM, 1997).

#### **1.1.1.2.2 – Bráquetes de polioximetileno**

Um outro tipo de bráquete plástico usado em Ortodontia é aquele composto de polioximetileno (POM) também conhecido como resina acetálica, poliacetal ou poliformaldeído. O POM possui grande instabilidade térmica,

apesar de ter propriedades mecânicas superiores às de outros plásticos e foi obtido pela primeira vez pelo químico Hermann Staudinger (MORENO, 2006).

Desde a sua comercialização em 1960, o POM é usado em automóveis, construção civil, *hardware*, eletrônicos e indústrias de bens de consumo. Esse é um termoplástico de engenharia com propriedades semelhantes às de um metal. O POM é manufaturado por grandes indústrias de plásticos e, há mais de dez tipos de artefatos diferentes fabricados em cada companhia sendo que cada um deles possui características químicas e físicas específicas, de acordo com suas aplicações (ZILBERMAN, 2005).

O POM é descrito como um polímero usado em Engenharia, com características físicas e estruturais favoráveis: é altamente cristalino e mais resistente ao arranhamento do que o nylon; possui uma excelente resistência à abrasão e tem boa resistência aos solventes, com exceção dos fenóis. Quando queimado tem baixa emissão de fumaça, suas superfícies são altamente lustrosas e possui uma menor absorção de umidade do que o *nylon*. Como desvantagens, são relatadas: uma pobre resistência a raios UV, a ácidos e a álcalis (particularmente homopolímeros) e a queima fácil (MORELLI, 2005).

O POM tem sido utilizado na Odontologia mundial como um substituto para resinas acrílicas e metais, nas mais diversas aplicações bucais, como próteses parciais removíveis, matrizes de moldagem, núcleos e bráquetes. Após esse tempo, milhares de bráquetes POM foram empregados em tratamentos ortodônticos e não houve estudos publicados de toxicidade ou de reações alérgicas devido a aldeídos liberados na cavidade bucal (ZILBERMAN, 2005).

Em 1997, uma patente alemã apresentou um acetopolímero, o bráquete POM, de polioximetileno anunciando que esses bráquetes permitiam um melhor deslizamento mecânico que os bráquetes convencionais de metal. Esses seriam tão fortes que não haveria desgaste de suas asas devido à interferência oclusal oposta ou nas superfícies oclusais dos dentes antagonistas. A remoção do bráquete da superfície dentária foi relatada como simples e sem estresse, e ainda que os bráquetes POM não manchariam ou sofreriam descoloração em quaisquer circunstâncias (KUSY e WHITLEY, 2005).

Apesar das vantagens, sob determinadas circunstâncias, o POM está propenso a despolimerizar com o formaldeído ( $\text{CH}_2\text{O}$ ). Isso pode acontecer termicamente (ex. calor excessivo), quimicamente (ex. álcoois, oxigênio, enzimas), mecanicamente (ex. sob abrasão, desgaste, arranhadura, corrosão ou estrago), ou por *radiolysis* (ex. sob radiação gama, raios x *scan* ou bombardeamento de raios de elétrons). Vapores de formaldeído são sabidamente irritantes para membranas mucosas e podem causar dermatites quando combinados com água e ingeridos. Podem ainda causar severas dores abdominais, alterações sangüíneas e finalmente morte. Devido ao fato de o formaldeído penetrar e fixar rapidamente nos tecidos, soluções aquosas, formaldeído e metanol são eleitos líquidos de embalsamamento. Kusy e Whitley (2005) afirmaram que se os bráquetes ortodônticos POM podem decompor, tanto por aquecimento quanto por abrasão mecânica, liberando o gás tóxico formaldeído, conseqüentemente, não podem ser usados dentro da cavidade bucal. Calor, ácidos, álcalis, oxigênio, abrasão, enzimas e radiações, são mecanismos que conduzem à decomposição química do POM sendo

então, excludente o seu benefício ao corpo humano e contra-indicado o emprego de coroas dentárias para dentes decíduos, aparatos protéticos ou bráquetes ortodônticos, visto que até mesmo uma radiografia poderia promover a sua degradação (KUSY e WHITLEY, 2005).

Segundo Zilberman (2005), estudos de toxicidade e de reatividade intracutânea de POM foram realizados e os resultados não mostraram quaisquer evidências de citotoxicidade ou de reações alérgicas. Uma conclusão sobre o potencial de toxicidade de produtos à base de POM deve ser baseada em estudos científicos confiáveis e por novos estudos clínicos (ZILBERMAN, 2005).

#### **1.1.1.3 – Óxido Nítrico: propriedades gerais**

O óxido nítrico (NO) é um gás diatômico hidrofóbico que é sintetizado por distintas células do organismo e detém um papel crucial como molécula de sinalização celular (AGULLÓ, 2005).

Além de ser um radical gasoso, o NO é um metabólito reativo e multifuncional que pode agir como neurotransmissor e como um vasodilatador, sendo uma molécula importante na defesa imunológica contra células tumorais e patógenos em geral (CHI *et al.*, 2003).

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

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

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

Na fisiologia dos mamíferos, o NO exerce papel modulador do tônus vascular para regular o fluxo e a pressão sanguínea e, como é também um neurotransmissor periférico, está envolvido nos mecanismos de defesa do hospedeiro, agindo na imunidade inata (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991; MONCADA, MARTIN, 1993).

Até fins dos anos 80, quando foi descoberto que o NO era responsável pelo relaxamento vascular da musculatura lisa, não era esperado o que uma molécula simples pudesse significar na fisiologia dos mamíferos. Sendo uma molécula sem carga, é capaz de passar livremente entre as células e por dentro delas atravessando as membranas celulares (KENDALL, MARSHALL, BARTOLD, 2001).

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

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

Atualmente, o NO é tido como sendo essencial em uma vasta área de acontecimentos intracelulares e extracelulares, em uma ampla variedade de tecidos. Também é uma molécula efetora comum para a destruição fisiológica e filogenética em diversas patogenias inflamatórias, autoimunes e tem implicações nas doenças periodontais (GREEN, NACY e MELTZER, 1991; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

O conhecimento do NO como mediador químico do processo inflamatório, tem relevância cada vez maior em mecanismos complexos de hemodinâmica, hemostasia e inflamação. Por ser um potente vasodilatador, o NO regula a resposta vascular inicial da reação inflamatória aguda e as funções de outras células envolvidas nesse processo. Sua ação perpassa pela função hemostática, incluindo vasodilatação; pela neurotransmissão; pela inibição da adesão e da agregação plaquetária; pela ação de defesa contra agentes infecciosos tais como bactérias, fungos e parasita e ele age também

como destruidor de células tumorais (LIEW, COX, 1991; LIEW, e SEVERN, 1991; NASSLER, BILLIAR, 1993; MARTIN, KLESCHYOV e KLEIN, 1997; RUIZ, CALZADILLA, GOMEZ e CHACÓN, 1997; KENDALL, MARSHALL e BARTOLD, 2001).

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

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

As enzimas óxido nítrico sintases (NOS) foram identificadas e descritas em 1981 e as três principais isoformas (eNOS, nNOS e iNOS) foram clonadas e purificadas. Posteriormente, mais de 16000 estudos sobre as NOS, muitos deles sobre sua estrutura, funções e atividade, foram publicados (ALDERTON, COOPER e KNOWLES, 2001).

As enzimas NOS são produzidas, cada uma delas por genes distintos e denominadas em ordem de descoberta como NOS<sub>1</sub>, NOS<sub>2</sub> e NOS<sub>3</sub>. A primeira delas, NOS<sub>1</sub>, a ser purificada e clonada de tecido neuronal, é também chamada de nNOS. A isoforma encontrada em células endoteliais é conhecida como eNOS ou NOS<sub>3</sub>. Essas duas isoformas são também denominadas de constitutivas visto que se manifestam continuamente em neurônios e células epiteliais, respectivamente. Essas proteínas também são dependentes de uma elevação na concentração de cálcio para sua atividade e, portanto, produzem

baixas concentrações de óxido nítrico. Por outro lado, a segunda isoforma, a NOS<sub>2</sub>, é induzível, independente do cálcio e é também chamada de iNOS (DRAPIER, 1991).

As NOS são codificadas em genes separados em cromossomos distintos, localizados no cromossomo 07 (eNOS), no cromossomo 12 (nNOS) e no cromossomo 17 (nNOS). A isoforma endotelial é encontrada em endotélio vascular, plaquetas e no coração (endocárdio e miocárdio) e a isoforma neuronal é encontrada em neurônios centrais e periféricos. Estas duas isoformas são constitutivas normais das células, essencialmente expressadas e funcionalmente reguladas ou modeladas. A iNOS pode ser manifestada em muitos tipos celulares incluindo aqueles de musculatura lisa, músculo do coração, intestino, células imunes e hepatócitos. Esta isoforma se expressa somente depois da ativação de células com produtos gerados por uma infecção, incluindo as endotoxinas bacterianas ou exotoxinas, ou certos mediadores inflamatórios, como as citocinas (TNF $\gamma$  ou IL-1) e lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos (VALLANCE e COLLIER, 1994; MARIOTTO, MENEGAZZI e SUZUKI, 2004).

A molécula sinal nitrito (NO<sup>2</sup>) é sintetizada sob demanda após a ativação enzimática, pela NOS, por curtos períodos de tempo. A molécula de NO, é sintetizada através de iNOS que, uma vez que se manifesta, induz a liberação de NO por longos períodos de tempo (KRÖNCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997).

Uma vez sintetizado, o NO difunde-se para fora da célula e pode agir localmente afetando as células próximas. A sua ação é restrita a cada local do evento porque ele é um gás extremamente instável e com uma meia vida de

poucos segundos. Devido a isso, o NO se apresenta em nosso organismo em baixas concentrações sendo difícil uma monitorização desse gás *in vivo* (COOPER e HAUSMAN, 2004; YAO, VLESSIDIS e EVMIRIDS, 2004 ).

Um novo padrão não enzimático de produção de NO foi descrito envolvendo redução química de nitrato inorgânico. Este padrão foi demonstrado em vários sistemas principalmente no trato gastrintestinal. A bactéria oral comensal reduz na dieta nitrato para nitrito, o qual mais adiante é reduzido para NO. A acidificação de nitrito salivar engolido gera óxido nítrico no estômago com subseqüentes propriedades antimicrobianas. Estas interações entre hospedeiro e bactéria podem complementar o sistema de defesa contra patógenos na boca e no intestino (DUNCAN, DOUGALL e JOHNSTON, 1995; WEITZBERG e LUNDBERG, 1998).

#### **1.1.1.4 – Óxido Nítrico: citotoxicidade e ativação celular**

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

Macrófagos ou células endoteliais, situadas em determinado local, produzem NO nas proximidades das células alvo. As células produtoras de NO, por sua vez, são ativadas, induzindo a sua produção em toda parte. Provavelmente, grande parte de NO oxida-se antes que chegue a atingir seus alvos. Por essa razão é impossível afirmar qual é a concentração de NO que leva à toxicidade das células. Além disso, através de sua função citoprotetora o NO age diretamente na diminuição da produção de radicais livres ou interferindo na resposta imune. A produção de radical livre pela interação do NO com o superóxido tem os dois efeitos: de proteção (matando bactérias e neutralizando  $O_2$ ) e efeito tóxico pela formação de radicais de peroxinitrito e de hidroxil. Em macrófagos, condrócitos, timócitos, células da musculatura lisa e em células dendríticas, a ativação destas induziu à síntese de NO mediando a morte das mesmas (MILES, BOHLE e GLASSBRENNER, 1996; KRÖNCKE, FEHSEL e KOLB-BACHOFEN, 1997).

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

Os macrófagos desempenham um papel crucial tanto na imunidade natural quanto na imunidade adquirida. Essas células fagocitam desde tecidos

próprios que estejam lesados ou mortos, como eritrócitos, até partículas estranhas, como macromoléculas e inclusive, antígenos. Uma outra função diz respeito à secreção de enzimas, espécies de oxigênio reativo, NO e mediadores lipoderivados (ex. prostaglandinas) os quais são utilizados para matar patógenos, controlar a propagação de infecções, assim como podem lesar tecidos normais nas proximidades da inflamação (FERREIRA e TEIXEIRA, 2005).

Quando um fagócito encontra um microrganismo, este é envolvido pela porção da membrana fagocítica, que então se invagina, formando um discreto fagossomo. Este processo conduz a um proeminente aumento de consumo de O<sub>2</sub> pelo fagócito iniciando um complexo sistema de sinalização que é especificamente representado pelo superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e óxido nítrico. Os polimorfonucleares de sangue humano e macrófagos murinos, mostraram ser modelos experimentais adequados para a estimativa quantitativa de atividade fagocítica sob a influência de diferentes agentes imunomoduladores. Foi observado que macrófagos murinos, da linhagem J774.2, não sofrem alteração na produção de NO pela ação de diferentes agentes imunomoduladores com exceção de lipopolissacarídeos (STOIKA *et al.*, 2001).

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

A atividade antimicrobiana de macrófagos ativados está correlacionada com a iniciação da oxidação de nitrogênio da L-arginina e, outros estudos

sugerem que dois sinais são necessários para a indução de mecanismos bioquímicos levando a uma atividade efetora (GREEN *et al.*, 1990).

O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina que desempenha um importante papel tanto na imunidade inata quanto na imunidade adaptativa e é a principal citocina ativadora de macrófagos. Macrófagos ativados são importantes células efetoras nos processos inflamatórios e na defesa do hospedeiro contra microorganismos. Ele induz a produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e outras moléculas responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos (REIS, SOUZA, MINEO, ESPÍNDOLA, 2001; STÖIKA *et al.*, 2001). A ativação consiste em alterações quantitativas na expressão de várias proteínas que conferem aos macrófagos ativados a capacidade de exercer algumas funções que não podem ser executadas por monócitos em repouso. Um macrófago é considerado ativado se ele desempenha uma determinada função medida em um ensaio específico como, por exemplo, morte microbiana (ABBAS, LICHTMAN, 2005).

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

#### **1.1.1.5 – Óxido Nítrico e Odontologia**

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 de nitrito quantificado na saliva foi encontrado em pacientes com recorrentes ulcerações orais aftosas. (OHASHI, IWASE e NAGUMO, 1999).

Há poucos estudos sobre o efeito do NO nas doenças orais e embora tenha havido poucas publicações concernentes a essa área anatômica, o interesse sobre essa molécula expandiu-se rapidamente e é quase certo que ele tenha importantes e danosas ações no desenvolvimento da doença periodontal e para o câncer (BRENNAN, THOMAS e LANGDON, 2003).

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

Na periodontite, altas quantidades de NO podem ser geradas, principalmente por macrófagos, PMNs, linfócitos e fibroblastos, seguidas pela produção de citocinas induzidas principalmente por LPS. Foi observado que bactérias periodontopáticas são capazes de induzir a produção de substrato de

NOS à L-arginina e o produto final L-citrulina, em inflamação gengival humana (BLIX e HELGELAND, 1998; MALEJKA *et al.*, 1998).

Nas periodontites, os efeitos benéficos da manifestação de iNOS podem incluir atividade antimicrobiana, modulação imunológica, inibição de trombose microvascular, e perfusão tecidual. Por outro lado, os efeitos prejudiciais do NO podem incluir uma ação citotóxica para tecidos e osso alveolar, vermelhidão gengival, explicada pelo aumento da permeabilidade vascular, tendência de aumento do sangramento dos tecidos moles e, ainda, o aumento da reabsorção do osso alveolar (LOHINAI e SZABÓ, 1998).

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

O NO é um importante regulador na formação e reabsorção óssea. Examinando o papel desta molécula no movimento dentário ortodôntico com inibidores específicos de NOS, Keigo *et al.* (2002) sugerem que o NO seja um

importante mediador bioquímico na resposta do tecido periodontal em relação à força ortodôntica. Movimentos dentários ortodônticos resultam da resposta do tecido periodontal à força ortodôntica que guia a modelação e a remodelação do osso alveolar adjacente. Precusores não-tóxicos de NO podem ser usados para reduzir o tempo de tratamento ortodôntico visto que diferentes fatores têm o poder de influenciar a relação de movimento dentário ortodôntico por meio de vários biomedadores, dentre os quais o NO. Considera-se que estas respostas ocorram devido à ativação de sinais padrões específicos e a identificação desses padrões pode guiar a uma intervenção farmacológica para controlar a taxa de movimento ortodôntico dentário. É fundamental que estudos científicos sejam efetuados para que uma avaliação mais detalhada permita aplicações clínicas (KEIGO *et al.*, 2002; AKIN, GURION e OLMEZ, 2004).

### **1.1.2 – Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar *in vitro* a citotoxicidade de bráquetes estéticos (plásticos ou cerâmicos), usados atualmente na clínica ortodôntica.

E teve, como objetivos específicos, avaliar, *in vitro*, a viabilidade celular (MTT assay) de bráquetes cerâmicos, de policarbonato e de polioximetileno sobre a linhagem de macrófagos murinos J774 não ativados e, posteriormente, ativados com interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e, também, o efeitos destes bráquetes na produção de óxido nítrico (NO) nesta linhagem de macrófagos, com e sem ativação de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ).

## **1.2 – MATERIAL E MÉTODO**

### **1.2.1 – Material**

A amostra do estudo foi constituída de seis bráquetes cerâmicos (Dentaurum), seis bráquetes de policarbonato (Roth Morelli Composite) e seis bráquetes de polioximetileno (Forestadent Brillant), para cada tempo (24h, 48h e 72h), em um total de 18 bráquetes de cada material, no experimento sem estímulo de IFN- $\gamma$ . As mesmas quantidades foram utilizadas, para cada tempo (24h, 48h e 72h), em um total de 18 bráquetes de cada material, no experimento com estímulo de IFN- $\gamma$ . Os bráquetes foram utilizados inteiros e mantidos em suas embalagens originais até o início do experimento. Para a esterilização dos bráquetes foi utilizado o óxido de etileno.

### **1.2.2 – Método**

#### **1.2.2.1 – Cultura celular da linhagem de macrófagos murinos J774**

No presente estudo utilizou-se a linhagem celular murina J774 A.1 (ATCC n°.TIB-67) cultivada em garrafa plástica (NUNC) com meio de cultura suplementado (5% de soro fetal bovino (FCS), 50UI/ml de Penicilina, 1% de aminoácido não-essencial e 2% de L-Glutamina (Gibco/BRL), mantidas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, numa temperatura de 37°C. Após serem

transferidas para um recipiente adequado, as células foram lavadas através de centrifugação a 1200rpm, durante 10 minutos, a 4°C.

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

### **1.2.2.2 – Cultura de células na presença dos materiais**

#### **1.2.2.2.1 – Cultura de células na presença dos materiais sem estímulo de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )**

Foram utilizadas placas de 96 poços divididas em duas metades. Na primeira metade, em cada poço utilizado, foram cultivadas  $2 \times 10^4$  células J774, em um volume de 100 $\mu$ l, ressuspensas em meio de cultura RPMI-suplementado. Na fileira “A” (de A1 a A6), da primeira metade da placa, foram mantidas apenas as células do grupo controle. Nas demais fileiras, “B” (B1-B6 - bráquetes cerâmicos), “C” (C1-C6 - bráquetes de policarbonato) e “D” (D1-D6 - bráquetes de polioximetileno) os materiais foram distribuídos, individualmente, sobre as células mantidas em cultura. Foram montadas 3 placas com diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) que permaneceram em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após cada período de incubação o sobrenadante foi coletado para posterior quantificação do NO e transferido para outra placa similar, onde foi mantida a mesma ordenação anterior. As células que restaram nos poços foram submetidas à avaliação de citotoxicidade após a

remoção dos bráquetes. O grupo controle negativo foi constituído de macrófagos murinos da linhagem J774, cultivados em placas de 96 poços, sem a presença dos materiais a serem testados.

#### **1.2.2.2.2 – Cultura de células na presença dos materiais com estímulo de Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )**

Na segunda metade das placas de 96 poços, foram cultivadas  $2 \times 10^4$  células J774/poço, em um volume de 100 $\mu$ l, de RPMI-suplementado. Adicionalmente, foram acrescentados 10 $\mu$ l de interferon-gama (IFN- $\gamma$ )/poço.

Na fileira “A” (de A7 a A12), da segunda metade da placa, foram mantidas apenas as células do grupo controle. Nas demais fileiras, “B” (B7-B12 - bráquetes cerâmicos), “C” (C7-C12 - bráquetes de policarbonato) e “D” (D7-D12 - bráquetes de polioximetileno) os materiais foram distribuídos, individualmente, sobre as células mantidas em cultura e ativadas com o IFN- $\gamma$ . Foram montadas 3 placas com diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) que permaneceram em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após cada período de incubação o sobrenadante foi coletado para posterior quantificação do NO e transferido para outra placa similar, onde foi mantida a mesma ordenação anterior. As células que restaram nos poços foram submetidas à avaliação de citotoxicidade após a remoção dos bráquetes. O grupo controle negativo foi constituído de macrófagos murinos da linhagem J774, cultivados em placas de 96 poços, sem a presença dos materiais a serem testados.

### 1.2.2.3 – Teste de viabilidade (MTT assay)

Após a retirada dos sobrenadantes, os bráquetes foram removidos com uma pinça estéril. Às células que permaneceram nos poços da placa foram acrescentados 90µl de meio RPMI suplementado e 10µl da suspensão de MTT (50mg/ml). As células foram incubadas por 4 horas, à temperatura de 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. Após esse período, a reação de MTT foi bloqueada com 100µl/poço de solução álcool-ácido, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e a leitura foi feita a 570nm utilizando-se um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device) (MOSMANN, 1983; WILSON, 2000).

### 1.2.2.4 – Produção do óxido nítrico

Para a avaliação do NO, 100µl de sobrenadante, de cada poço da placa de cultura, foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Foi acrescentado aos sobrenadantes, a mesma quantidade de reagente de Griess (1% sufamilamida, 0,1% N- (1-naftil) – etilina diamina hidrocloreto, 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) (GREEN *et al.*, 1962; YAO, VLESSIDIS e EVMIRIDIS, 2004). As concentrações de nitrito presentes nos sobrenadantes foram obtidas através da análise de regressão linear a partir da curva padrão, empregando-se diluições duplas seriadas de nitrito de sódio a partir de 200µM até a 11<sup>a</sup>. diluição. A absorbância foi determinada a 540nm, através do leitor de microplacas (Spectramax 190-Molecular Device).

### 1.2.2.5 – Análise estatística

#### -Viabilidade celular:

Foi empregado o teste de Kruskal-Wallis para verificar em cada tempo, separadamente, a presença de diferença significativa na viabilidade celular entre os grupos (controle, bráquetes cerâmicos, de PC e de POM) e também para verificar a presença de diferença significativa na viabilidade celular nos três tempos de análise, para cada material separadamente.

Foi aplicado o teste de Mann-Whitney para verificar se houve diferença significativa na viabilidade celular entre cada um dos materiais, individualmente, e o grupo controle em cada tempo estudado e para a avaliação do comportamento individual de cada grupo de material, procurando determinar diferenças significativas entre a viabilidade celular nos tempos estudados (24/48 horas, 48/72 horas e 24/72 horas)

#### -Produção de Óxido Nítrico:

Foi empregado o teste de Kruskal-Wallis para verificar em cada tempo, separadamente, a presença de diferença significativa na produção de NO entre os materiais ( controle, brackets cerâmicos, brackets PC e brackets POM) e também para verificar a presença de diferença significativa na produção de NO nos três tempos de análise, para cada material separadamente.

Foi aplicado o teste de Mann-Whitney para verificar se houve diferença significativa na produção de NO entre cada um dos materiais, individualmente, e o grupo controle em cada tempo estudado e para a avaliação do comportamento individual de cada grupo de material, procurando determinar

diferenças significativas entre a produção de NO os tempos estudados (24/48 horas, 48/72 horas e 24/72 horas)

### 1.3 - REFERÊNCIAS

AGULLÓ, L. Introducción al óxido nítrico. Atualização: 22-07- 2005.

Blauplanet.com <http://cgmp.blauplanet.com/es-intno.html>

AIRD, J.C.; DURNING, P. Fracture of polycarbonate Edgewise brackets: a clinical and SEM study. **Br J Orthod**, v.14, p. 191-195, 1987.

AKIN, E.; GURTON, A. U.; ÖLMEZ, H. Effects of nitric oxide in orthodontics tooth movement in rats. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.126, p. 608-614, 2004.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases, function and inhibition. **Biochem J**, v.357, p. 593-615, 2001.

ALKIRE, R.G.; BAGBY, D. B.; GLADWIN, M. A.; KIM, H. Torsional creep of polycarbonate orthodontic brackets. **Dent Mater**, v.13, p. 2-6, 1997.

ANHOURY, P.; NATHANSON, D.; HUGHES, C. V.; SOCRANSKY, S.; FERES, M.; CHOU, L. L. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. **Angle Orthod**, v.72, p. 338-343, 2002.

ANUSAVICE, K. J. Phillips, Materiais Dentários. 11<sup>a</sup>. Edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005.

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

BAZAKIDOU, E.; NANDA, R. S.; DUCANSON, M.G.; SINHA, P. Evaluation of frictional resistance in esthetic brackets. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.112, p. 138-144, 1997.

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

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.

BRITTON, J. C.; McINNES, P.; WEINBERG, R.; LEDOUX, W. R. ; RETIEF, D. H. Shear bond strength of ceramic brackets to enamel. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.98, p. 348-353, 1990.

CARTER, R. Clinical Management of ceramic brackets. **J Clin Orthod**, v.23, n.12, p. 807-809, 1989.

CHI, D. S.; QUI, M.; KRISHNASWAMY, G.; LI, C.; STONE, W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide**, v.8, p. 127-132, 2003.

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

CORRADIN, S. B.; BUCHIMÜLLER-ROUILLER, Y.; MAUËL, J. Phagocytosis enhances murine macrophage activation by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . **Eur J Immunol**, v.21, p. 2553-2558, 1991.

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, 1993.

DAGHIGI, F.; BORGHAEI, R.; THORNTON, R. D.; BEE, J. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. **J Periodontol**, v.73, p. 392-400, 2002.

DRAPIER, J. C. L-arginine-derived nitric oxide and the cell-mediated immune response. **Res Immunol**, v.142, p. 553-602, 1991.

DOWNING, A.; MCCABE, J.; GORDON, P. A study of frictional forces between orthodontic brackets and archwires. **Br J Orthod**, v. 21, p-349-357, 1994.

DUNCAN, C.; DOUGALL, H.; JOHNSTON P. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. **Nat. Med.**, v.1, p. 546-551, 1995.

ELIADES, T.; LEKKA, M.; ELIADES, G.; BRANTLEY, W. Surface characterization of ceramic brackets: A multitechnique approach. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.105, p. 10-18, 1994.

FELDNER, J. C.; SARKAR, N. K.; SHERIDAN, J.J.; LANCASTER, D. In vitro torque-deformation characteristics of orthodontic polycarbonate brackets. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.106, p. 265-272. Sep., 1994.

FERNANDEZ, L.; CANUT, J.A. In vitro comparasion of the retention capacity of new aesthetic brackets. **Eur J Orthod**, v.21, p. 71-77, 1999.

FERRACANE, J. L. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. **Dental Materials**, v.22, p. 211-222, 2006.

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

FREEMAN, B. Free radical chemistry of nitric oxide: looking at the dark side. **Chest**, v.105 (suppl), p. 79S-84S, 1994.

GHAFARI, J. Problems associated with ceramic brackets suggest limiting use to selected teeth. **Angle Orthod**, v.62, p.145-152, 1992.

GOPINATH, V. K.; MUSA, M.; LALITHA, P.; SOSROSENO, W. Role of nitric oxide in hydroxyapatite-induced phagocytosis by murine macrophage cell line (RAW264.7). **Arch Oral Biol**, v.51, p. 339-344, 2006.

GHORBEL, I.; AKELE, N.; THOMINETE, F.; SPITERI, P.; VERDU, J. Hydrolytic aging of polycarbonate. II. Hydrolysis kinetics, effect of static stresses. **J Appl Polymer Sci**. v.55, p. 173-179, 1995.

GRABER, T. M.; VANARSDALL, R. L. Ortodontia. Princípios e técnicas atuais. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2<sup>a</sup> ed., 1996.

GREEN, J.S.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S.; NACY, C.A. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- $\gamma$  stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- $\alpha$ . **J Immunol**, v.145, p. 4290-4297, 1990.

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

GREEN, L.C.; WAGNER, D. A.; GLOGWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J. S.; TANNBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and (<sup>15</sup>N) nitrite in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, p. 131-138, 1982.

GRIMSDOTTIR, M. R; HENSTER-PETERSEN, A. Cytotoxicity and antibacterial effects of orthodontic appliances. **Scand J Dent Rest**, v.101, n.4, p. 229-231, 1993.

HOWDESHELL, L. K. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature- Research. **Enviromental Health Perspectives**, jul 2003.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R. E. Endothelium-derived factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.34, p. 9265-9269, 1987.

KARAMOUZOS, A.; ATHANASIOU, A. E.; PAPADOULOS, M., A. Clinical characteristics of ceramic brackets: a comprehensive review. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v. 112, p. 34-40, 1997.

KEIGO, H.; KAORU, I.; KOTARO, M.; HISASHI, S.; HIDEO, M. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.122, p. 306-309, 2002.

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

KRISHNAN, A. V.; STATHIS, P.; PERMUTH, S. F.; TOKES, L.; FELDMAN, D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. **Endocrinology**, v. 132, p. 2279-2286, 1993.

KRÖNCKE, K-D; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when and where? **NO Biol Chem**, v.1, p. 107-120, 1997.

KUNES, K.; HAVRDA, J.; HRONIKOVA, K.; GREGOROVA, E.; PABST, W. Stabilization of bioceramic suspensions prepared from alumina-containing zirconia powders. **Ceramics- Silikaty**, v.44, p.1-8, 2000.

KUSY R; WHITLEY J. Degradation of plastic polyoxymethylene brackets and the subsequent release of toxic formaldehyde. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.127, p. 420-427, 2005.

LANGREHR, J.M.; HOFFMAN, R..A.; LANCASTER, J.R. et al. Nitric oxide: a new endogenous immunomodulator. **Transplantation**, v.55, p. 1205-1212, 1993.

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

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

LOHINAI, Z. M.; SZABÓ, C. Role of nitric oxide in physiology and pathophysiology of periodontal tissues. **Med Sci Monit**, v.4, p. 1089-1095, 1998.

MALEJKA, M.; PARTYKA, J.; ULM, C.; SOLAR, P.; SINZINGER, H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J Periodontol**, v.33, p. 517-518, 1998.

MARIOTTO, S.; MENEGAZZI, M.; SUZUKI, H. Biochemical aspects of nitric oxide. **Current Pharmaceutical Design**, v.10, p. 1627-1645, 2004.

MARTIN, V.; KLESCHYOV, A.; KLEIN, J. P. et al. Induction of nitric oxide production by polysaccharides from the cell walls of streptococcus mutans OMZ 175, a gram-positive bacterium, in the rat aorta. **Infect Immunol**, v.65 p. 2074-2079, 1997.

MATASA, C. Polymers in orthodontics: a present danger? In: GRABER, T. M.; ELIADES, T.; ATHANASIOU, A. E. Risk management in orthodontics: Experts' guide to malpractice: USA, Quintessence Publishing Co, Inc, 2004.

MEGURO, D.; HAYAKAWA, T.; KAWASAKI, M.; KASAI, K. Shear bond strength of calcium phosphate ceramic brackets to human enamel. **Angle Orthod**, v.76, p. 301-305, 2006.

MILLES, A. M.; BOHLE, D.S.; GLASSBRENNER, P.A. et al. Modulation of superoxide dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. **J Biol Chem**, v.271, p. 40-47, 1996.

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

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

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

MORELLI, Dental. Folha de Segurança, p.1-4. [www.morelli.com.br](http://www.morelli.com.br)

MORENO, J. J. Principales polímeros. [on line]. Arqhys Architects site. República Dominicana. Disponível em: <http://arqhys.com/arquitectura/polimeros.html>

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

NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; SOUZA, M. A. et al. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian cerrado. **J Ethno-Pharm**, v.99, p. 37-41, 2005.

NASSLER, A. K.; BILLIAR, T.R. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide. Synthase. **J Leuk Biol**, v.54, p.171-178, 1993.

NISHIO, D.; MOTTA, A. F. J.; ELIAS, C. N.; MUCHA, J.N. In vitro forces evaluation of frictional forces between archwires and ceramic brackets. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.125, p. 56-64, 2004.

OGAARD, B.; ROLLA, G.; ARENDS, J. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.94, p. 123-128, 1988.

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

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

PROFFIT, W. R. Ortodontia Contemporânea. Rio de Janeiro: Editora Guanabra Koogan, 2<sup>a</sup>.edição, 1995.

REIS, D. S.; SOUZA, M. A.; ESPÍNDOLA, F.S. Myosin V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- $\gamma$ . **Brazil J Med Biol Res**, v.34, p. 221-226, 2001.

RUIZ, A. P.; CALZADILLA, A. R.; GÓMEZ, V.S.; CHACÓN, R. P. El papel de óxido nítrico em la hemodinámica, hemostasia e inflamación. **Ev Cub Estomatol**, v.34, p. 84-86, 1997.

SCHAFFER, T. E.; LAPP, C. A.; HANES, C. M.; LEWIS, J.B.; WATAHA, J.C.; SCHUSTER, G.S. Estrogenicity of bisphenol-A and bisphenol A dimethacrylate *in vitro*. **J Biomed Mater Res**, v. 45, p. 192-187, 1999.

SESSA, W. C. The nitric oxide synthase family of proteins. **J Vasc Res**, v.31, p. 131-143, 1994.

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

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

SUZUKI, K; ISHIKAWA K; SUGIYAMA K; FURUTA H; NISHIMUR F. Content and release of BPA from polycarbonate dental products. **Dent Mater**, v.19, p.389-95, 2000.

SWARTZ, M. L. Ceramic brackets. **J Clin Orthod**, v.22, p. 82-88, 1988.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Arquitetura e Urbanismo. Departamento de Tecnologia: História dos plásticos translúcidos. [on line] Disponível na internet: <http://www.usp.br/fau/deptecnologia/docs/bancosvidros/plast.htm>

VALLANCE, P.; COLLIER, J. Fortnightly review biology and clinical relevance of nitric oxide. **BMJ**, v.309, p. 453-457, 1994.

WATANABE, M; HASE, T; IMAI, Y. Change in the bisphenol A content in a polycarbonate orthodontic bracket and its leaching characteristics in water. **Dent Mater Journal**, v.20, p. 353-358, 2001.

\_\_\_\_\_ Degradation and formation of bisphenol A in polycarbonate used in dentistry. **J Med Dent Sci**, v.51, p.1-6, 2004.

WEINBERG, J. B.; MISUKONIS, M. A.; SHAMI, P.J. et al. Human mononuclear phagocyte inducible Nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS protein,

biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. **J Am Soc Hematol**, v.86, p.1184-1195, 1995.

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

WIKIPEDIA. Polímero. [ on line]. Disponível em:

<http://pt.wikipedia/wiki/Pol%C3%ADmero>

WILSON, 2000 In: Masters, JRW editor. Animal Cell Culture. 3rd ed New York: Oxford University Press; 2000. p. 175-219.

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

ZILBERMAN U. Formaldehyde from POM brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 12: 147-148, 2005.

## **2 - ARTIGOS**

**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)**

**ACEITO PARA PUBLICAÇÃO Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica**

**Integrada**

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](mailto:javitral@acessa.com)

AV. BARÃO DO RIO BRANCO, 2595/1603-1604 – 36010 907 – (32)32323596 - JUIZ DE FORA – MG

### 2.1.1 – Artigo 1 – Resumo - 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 2 - Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 na presença de bráquetes cerâmicos, de policarbonato e de polioximetileno.**

**(Parte I)**

**ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**

**AJODO - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**

**AUTORES**

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

MARCELO REIS FRAGA  
MESTRE EM ORTODONTIA  
PROFESSOR DA ESPECIALIZAÇÃO EM ORTODONTIA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

MARIA APARECIDA DE SOUZA  
DOUTORA EM IMUNOLOGIA  
PROFESSORA VISITANTE – DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA,  
MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ANA PAULA FERREIRA  
DOUTORA EM IMUNOLOGIA  
PROFESSORA ASSOCIADA – DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA,  
MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ROBERT WILLER FARINAZZO VITRAL  
DOUTOR EM ORTODONTIA  
PROFESSOR ASSOCIADO – DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA SOCIAL E  
INFANTIL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

AUTOR CORRESPONDENTE: JULIA CRISTINA DE ANDRADE VITRAL  
AVENIDA BARÃO DO RIO BRANCO, 2595/1603-1604  
36010 907 – JUIZ DE FORA – MG  
(32)32323596  
[javitral@acessa.com](mailto:javitral@acessa.com)

### **2.2.1 - Artigo 2 – Resumo – Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 na presença de bráquetes cerâmicos, de policarbonato e de polioximetileno. (Parte I)**

#### **Resumo:**

Estudos apontam para o fato de os bráquetes cerâmicos serem quimicamente inertes no meio bucal, enquanto os bráquetes de policarbonato podem degradar-se liberando bisfenol-A e os bráquetes de polioximetileno, o formaldeído. Juntamente com os testes de citotoxicidade tradicionais, o estudo da produção celular de óxido nítrico estimulado por determinado material é um método capaz de avaliar seu potencial citotóxico. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade celular (citotoxicidade) destes três grupos de bráquetes sobre cultura celular da linhagem de macrófagos murinos J774 pelo método MTT e o estímulo dos bráquetes à produção de óxido nítrico pelos macrófagos. A avaliação das culturas celulares foi realizada em três intervalos de tempo: 24, 48 e 72 horas. A viabilidade celular em todos os grupos foi maior no período final da avaliação (72 horas) em relação ao período inicial (24 horas), aumento este significativo nos grupos controle e bráquetes cerâmicos. As médias finais nos grupos de bráquetes não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. A produção de óxido nítrico foi significativamente maior em todos os grupos no período final em relação ao período inicial. Não houve diferença significativa entre as médias finais dos grupos de bráquetes e do grupo controle, embora os bráquetes de polioximetileno tenham apresentado médias significativamente maiores nos períodos de 24 e 48 horas.

## 1-INTRODUÇÃO

Para a realização dos tratamentos ortodônticos são utilizados materiais odontológicos classificados como materiais provisórios, destinados à aplicação por um período de tempo médio ou longo. O esforço para tornar o aparelho ortodôntico fixo mais estético, com a eliminação de sua aparência metálica resultou no desenvolvimento dos bráquetes denominados estéticos, como os cerâmicos e os plásticos <sup>1,2</sup>.

Como qualquer material odontológico, os bráquetes estéticos criam no meio bucal uma interface na qual tanto um quanto o outro podem ser alterados. Esta interface determina uma resposta biológica ativa ao material, a biocompatibilidade, e está relacionada à capacidade de o material resistir à degradação ou sofrer corrosão no organismo. Este comportamento está intimamente associado à composição do material, ao pré-tratamento e ao manuseio aos quais são submetidos <sup>3,4</sup>.

Os bráquetes cerâmicos são compostos de alumina <sup>5</sup>, que existe na natureza nas formas monocristalina e policristalina <sup>5,6</sup>. A vantagem primária dos bráquetes monocristalinos manufaturados é a eliminação do possível estresse induzido por impurezas ou imperfeições no processo de fabricação <sup>5</sup>. Os bráquetes cerâmicos são quimicamente inertes aos fluidos bucais com decrescente reatividade com o ambiente bucal <sup>6,7</sup>. Nishio *et al.* <sup>8</sup> afirmam, entretanto, que os bráquetes cerâmicos por serem mais volumosos apresentam uma maior superfície de contato com a mucosa bucal e que a superfície mais áspera destes acessórios, devido à dificuldade de acabamento e de polimento,

em contato com o fio ortodôntico pode comprometer a estética e a biocompatibilidade.

No grupo dos bráquetes plásticos, os bráquetes de policarbonato são derivados do teoricamente inofensivo ácido hialurônico. São considerados muito mais potencialmente perigosos do que a sua composição sugere e a razão para isto é o bisfenol-A (BPA), utilizado na manufatura do policarbonato, de resinas e fungicidas. Há setenta anos reconhecido por seu efeito estrogênico, o comportamento dos seus derivados utilizados em áreas relacionadas à saúde são controversos. Alegações têm sido feitas com relação ao efeito gatilho à puberdade precoce em meninas e à influência na fertilidade masculina<sup>9,10</sup>. Watanabe *et al.*<sup>11, 12</sup> estudaram *in vivo* e *in vitro* a degradação dos bráquetes de policarbonato e a formação do bisfenol-A. Os bráquetes foram deixados na cavidade bucal entre 18 e 40 meses e também em água a 37° Celsius durante 34 meses. Através da cromatografia líquida foram examinadas as mudanças no policarbonato. O bisfenol-A pareceu estar liberado mais que o esperado na saliva quando comparado com a liberação *in vitro*.

Um terceiro tipo de bráquete estético é o bráquete plástico composto de polioximetileno (POM) também conhecido como resina acetálica, poliacetal ou formaldeído<sup>13</sup>. Kusy e Whitley<sup>14</sup> estudando os bráquetes de polioximetileno de uma patente alemã afirmaram que apesar da vantagem mecânica, o material estaria propenso a despolimerizar liberando formaldeído (CH<sub>2</sub>O). Esta despolimerização poderia acontecer termicamente (calor excessivo), quimicamente (álcoois, oxigênio ou enzimas) ou por *radiolysis* (sob radiação gama, raios X *scan* ou bombardeamento de raios de elétrons). Devido aos

riscos para o organismo humano, resultante desta liberação de formaldeído, eles afirmam ser contra-indicado o uso do polioximetileno em coroas dentárias para dentes decíduos, aparatos protéticos e bráquetes ortodônticos, visto que uma simples radiografia poderia promover a degradação do material.

Zilberman <sup>13</sup> e Eliades <sup>7</sup> dizem não haver estudos publicados com relatos de toxicidade ou de reações alérgicas devido aos aldeídos liberados na cavidade bucal. Afirmam, ainda, que as conclusões de Kusy e Whitley <sup>14</sup> deveriam ser baseadas em estudos mais confiáveis que os descritos e por estudos clínicos do potencial de citotoxicidade dos produtos de POM comparados com metais contendo níquel.

A *International Organization Standardization (ISO)* e o *Concil on Dental Materials Instruments and Equipment of the American Dental Association* recomendam o uso de uma bateria de testes *in vivo* e *in vitro* para estudar a biocompatibilidade dos materiais e, de acordo com as normatizações, a principal categoria de testes com este objetivo é a dos testes de biocompatibilidade. Dentre estes testes o protocolo MTT assay é um dos mais utilizados para se determinar a citotoxicidade de materiais de diversas naturezas sobre células em cultura <sup>15</sup>.

A citotoxicidade pode também estar relacionada às moléculas que, ao serem liberadas a partir de um determinado estímulo podem ocasionar danos aos tecidos. Estudos têm relatado a presença de uma molécula com potencial citotóxico, o óxido nítrico, em tecidos da cavidade bucal e seu envolvimento em doenças inflamatórias <sup>16,17,18</sup>. São moléculas reguladoras, produzidas principalmente por macrófagos ativados, e possuem extrema importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose.

Podem apresentar efeitos benéficos, como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune. Por outro lado, quando presentes em altas concentrações podem atuar como uma potente molécula citotóxica, desencadeando danos aos tecidos adjacentes, incluindo o osso alveolar quando isto acontece na cavidade bucal <sup>19, 20, 21</sup>.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade (MTT assay) de bráquetes cerâmicos, de policarbonato e de polioximetileno sobre a linhagem de macrófagos murinos J774 e, também, o efeito destes bráquetes na produção de óxido nítrico (NO) por esta linhagem de macrófagos.

## **2- MATERIAL E MÉTODO**

### **2.1- MATERIAL**

A amostra do estudo foi constituída de seis bráquetes cerâmicos, seis bráquetes de policarbonato e seis bráquetes de polioximetileno, inteiros, para cada tempo, totalizando 18 bráquetes de cada material estudado, que foram mantidos em suas embalagens originais até o início do experimento. Para a esterilização dos bráquetes foi utilizado o óxido de etileno.

### **2.2 - MÉTODO**

#### **2.2.1 - Cultura celular da linhagem de macrófagos murinos J774**

No presente estudo utilizou-se a linhagem celular murina J774 A.1 (ATCC n°.TIB-67) conservada em garrafa plástica (NUNC) com meio de cultura suplementado (5% de soro fetal bovino (FCS), 50UI/ml de Penicilina, 1% de aminoácido não-essencial e 2% de L-Glutamina (Gibco/BRL), mantidas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, numa temperatura de 37°C. Após serem transferidas para um recipiente adequado as células foram lavadas através de centrifugação a 1200 rpm, durante 10 minutos, a 4°C.

Para determinação da viabilidade e contagem celular utilizou-se o corante vital azul de Tripán, em uma proporção de 1/1 (corante/meio de cultura) em câmara de Neubauer<sup>22</sup>.

### **2.2.2- Cultura de células na presença dos materiais**

Em placas de 96 poços, foram cultivadas  $2 \times 10^4$  células J774/poço, em um volume de 100µl, ressuspensas em meio de cultura RPMI-suplementado. Adicionalmente, foram acrescentados 10µl de interferon-gama (IFN-γ)/poço.

Na fileira “A” (de A1 a A6) foram mantidas apenas as células do grupo controle. Nas demais fileiras, “B” (B1-B6 - bráquetes cerâmicos), “C” (C1-C6 - bráquetes de policarbonato) e “D” (D1-D6 -bráquetes de polioximetileno) os materiais foram distribuídos, individualmente, sobre as células mantidas em cultura em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após cada período de incubação o sobrenadante foi coletado para posterior quantificação do NO e transferido para outra placa similar, onde foi mantida a mesma ordenação anterior. As células que restaram nos poços

foram submetidas à avaliação de citotoxicidade após a remoção dos bráquetes. O grupo controle negativo foi constituído de macrófagos murinos da linhagem J774, cultivados em placas de 96 poços, sem a presença dos materiais a serem testados.

### **2.2.3- Teste de viabilidade (MTT assay)**

Após a retirada dos sobrenadantes, os bráquetes foram removidos com uma pinça estéril. Às células que permaneceram nos poços da placa foram acrescentados 90µl de meio RPMI suplementado e 10µl da suspensão de MTT (50mg/ml). As células foram incubadas por 4 horas, à temperatura de 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. Após esse período, a reação de MTT foi bloqueada com 100µl/poço de solução álcool-ácido, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e a leitura foi feita a 570nm utilizando-se um leitor de microplacas (Spectramax 190 – Molecular Device)<sup>22,23</sup>.

### **2.2.4– Produção do óxido nítrico**

Para a avaliação do NO, 100µl de sobrenadante, de cada poço da placa de cultura, foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Foi acrescentado aos sobrenadantes, a mesma quantidade de reagente de Griess (1% sufanilamida, 0,1% N- (1-naftil) – etilina diamina hidrocloreto, 2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)<sup>24, 25</sup>. As concentrações de nitrito presentes nos sobrenadantes foram obtidas através da análise de regressão linear a partir da curva padrão, empregando-se

diluições duplas seriadas de nitrito de sódio a partir de 200 $\mu$ M até a 11<sup>a</sup>. diluição <sup>20</sup>. A absorbância foi determinada a 540nm, através do leitor de microplacas (Spectramax 190-Molecular Device).

### **2.2.5 - Análise estatística**

A partir dos resultados foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, comparando os valores obtidos para cada grupo de bráquetes com o grupo controle. Para cada material houve também a comparação dos resultados encontrados nos tempos 24 horas/48 horas, 48 horas/72 horas e 24 horas/72 horas

## **3- RESULTADOS**

### **3.1 - Viabilidade celular**

A Tabela 1 apresenta os *p*-valores do teste de Kruskal-Wallis para a viabilidade celular em função do tempo (*p*<.05, para 48 horas) e do tipo de material (*p*<.05, para o grupo controle e bráquetes cerâmicos).

O gráfico 1 expressa a comparação entre os grupos de materiais e o grupo controle.

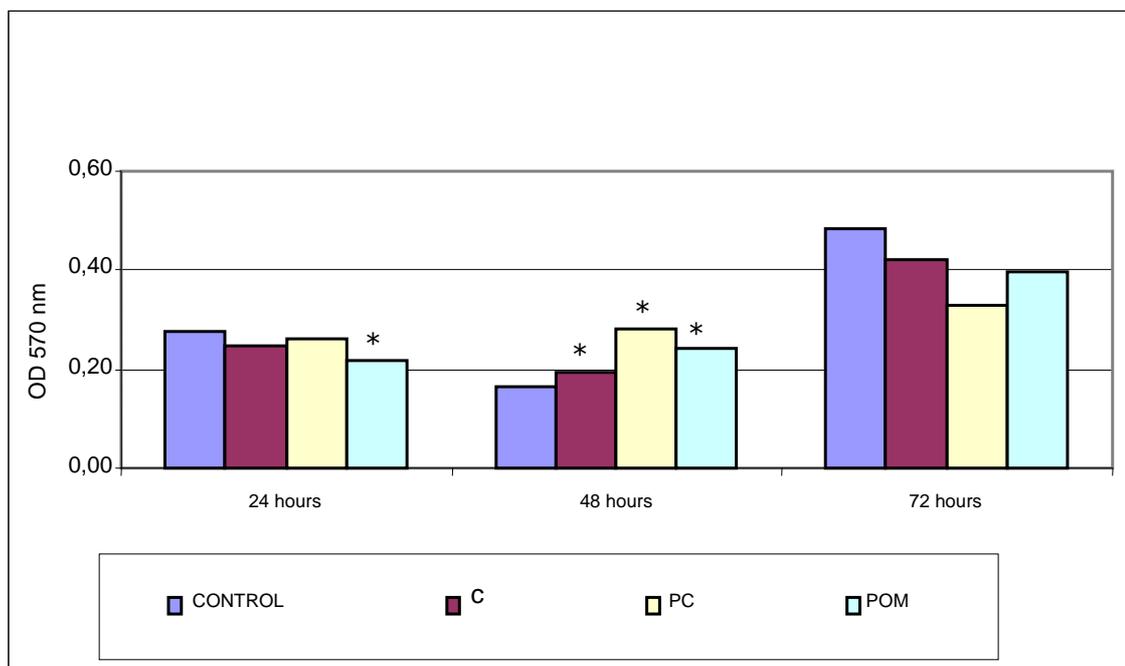
Na análise da diferença entre os tempos para cada material, o grupo controle e o grupo de bráquetes cerâmicos apresentaram *p*<.05 nos três intervalos de tempo estudados. Os bráquetes de policarbonato e de polioximetileno não

apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos intervalos de tempo.

**TABELA 1 –**

a- TEMPO	(p valor)	b- MATERIAL	(p valor)
		Grupo Controle	0,001
24h	ns	Bráquetes Cerâmicos	0,001
48h	0,001	Bráquetes de Policarbonato	ns
72h	ns	Bráquetes de Polioximetileno	ns

(p valor < 0,05– Teste de Kruskal-Wallis para a Viabilidade Celular em função (a) do Tempo e (b) do tipo de Material.  
(ns= não significativo)



**GRÁFICO 1 - Viabilidade Celular – Comparação entre os grupos de material e o Controle - Teste de Mann-Whitney - \* p valor < 0,05**

### 3.2 - Produção de óxido nítrico

A Tabela 2 apresenta os  $p$ -valores do teste de Kruskal-Wallis para a produção de óxido nítrico em função do tempo ( $p < 0,05$  para 24 horas) e do tipo de material ( $p < 0,05$  para todos os grupos estudados).

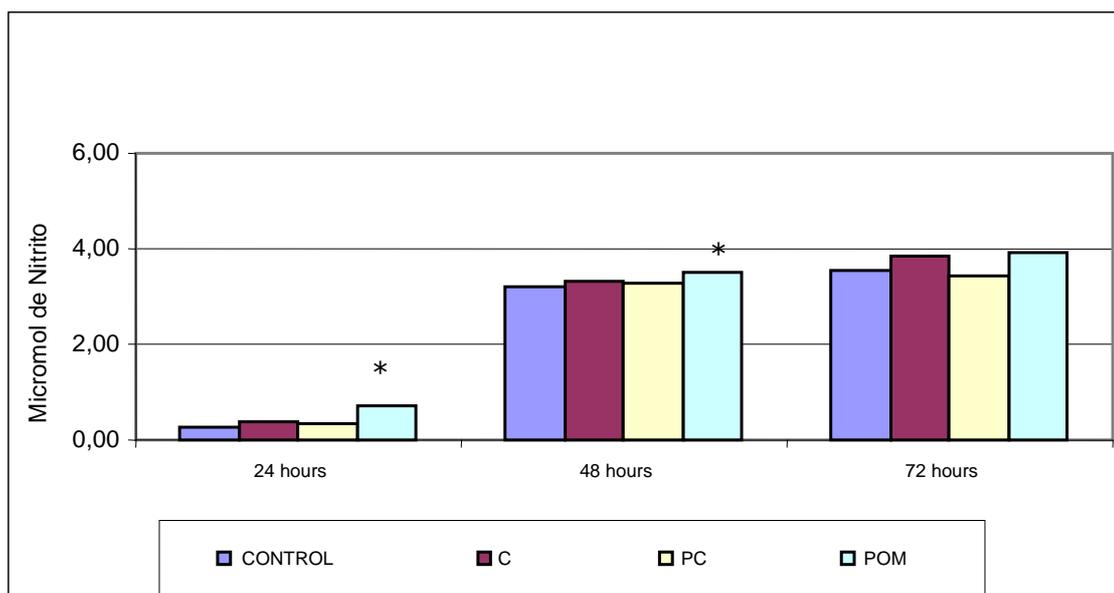
O gráfico 2 expressa a comparação entre os grupos de materiais e o grupo controle.

Na análise da diferença entre os tempos para cada material, o grupo controle e o grupo de bráquetes de polioximetileno apresentaram  $p < 0,05$  nos três intervalos de tempo estudados. Os bráquetes de policarbonato e de polioximetileno tiveram diferenças estatisticamente significativas nos intervalos de tempo 24-48 horas e 24-72 horas.

**TABELA 2**

<b>a- TEMPO</b>	<b>(p -valor)</b>	<b>b- MATERIAL</b>	<b>(p valor)</b>
		<b>Grupo Controle</b>	0 ,001
<b>24h</b>	0,045	<b>Bráquetes Cerâmicos</b>	0 ,002
<b>48h</b>	ns	<b>Bráquetes de Policarbonato</b>	0 ,003
<b>72h</b>	ns	<b>Bráquetes de Polioximetileno</b>	0 ,001

{{\*p valor<0,05 – Teste de Kruskal-Wallis para a concentração de óxido Nítrico em função (a) do Tempo e (b) do tipo de Material). (ns não significativo}}.



**GRÁFICO 2 - PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO** - Comparação entre os grupos de materiais e o grupo controle (Teste de Mann-Whitney) - \*  $p < 0,05$

#### 4. DISCUSSÃO

Um aumento significativo do estudo da biocompatibilidade dos materiais odontológicos é uma realidade para pesquisadores das diversas especialidades. Vários materiais e acessórios podem causar efeitos adversos na utilização clínica e os mecanismos pelos quais muitas reações são observadas não estão totalmente elucidados. O conhecimento direcionado à composição dos materiais, suas propriedades alergênicas e irritantes e sua toxicidade são essenciais na avaliação das etiologias de determinados sintomas clínicos <sup>26</sup>.

Além dos testes de citotoxicidade tradicionais, o estudo da produção de óxido nítrico associado a um determinado material é uma maneira de determinar o potencial de toxicidade deste material, já que a citotoxicidade pode, também estar relacionada à moléculas que, ao serem liberadas a partir de um determinado estímulo, podem ocasionar danos aos tecidos <sup>18</sup>.

Na análise da viabilidade celular o comportamento apresentado pelo grupo controle foi o esperado neste tipo de experimento. Houve de 24 para 48 horas diminuição significativa da viabilidade celular, provavelmente devido à adaptação das células às condições de cultura<sup>27</sup>. Todavia, de 48 para 72 horas houve um aumento da multiplicação celular, resultando numa diferença estatisticamente significativa entre estes tempos. A viabilidade no tempo final, 72 horas, foi também significativamente maior que no tempo inicial, 24 horas.

A viabilidade celular no grupo de bráquetes cerâmicos apresentou comportamento semelhante à do grupo controle. Uma diminuição do número de células de 24 para 48 horas, aumento de 48 para 72 horas e aumento entre os tempos 24 e 72 horas. Quando as médias de cada tempo foram comparadas ao grupo controle, houve diferença estatisticamente significativa somente no tempo 48 horas, sendo o número de células maior no grupo de bráquetes cerâmicos. A presença do bráquete na cultura de células de resposta imunológica pode ter sido o estímulo para a proliferação dos macrófagos. Este resultado revela concordância com as afirmações de Sjögren *et al.*<sup>3</sup> de não haver evidência de citotoxicidade nas cerâmicas utilizadas em Odontologia, indicando boa biocompatibilidade detectada nos testes *in vitro*.

Os resultados revelaram comportamento diferente dos bráquetes de policarbonato e polioximetileno e o grupo controle, com relação à viabilidade celular. As diferenças entre as médias nos tempos 24/48 horas, 48/72 horas e 24/72 horas não foram estatisticamente significativas dentro de cada grupo de bráquetes. A característica típica do grupo controle, de viabilidade no tempo 72 horas significativamente maior que no tempo 24 horas, não ocorreu. Ao

contrário do grupo controle no qual se verificou diminuição significativa da viabilidade celular de 24 para 48 horas, nos bráquetes policarbonato e polioximetileno, apesar de não significativo, houve aumento no valor das médias. Da mesma maneira que no grupo de bráquetes cerâmicos a presença do material pode ter sido o estímulo à proliferação dos macrófagos.

No tempo 24 horas a média do número de células foi significativamente menor para o grupo de polioximetileno, quando comparado ao controle. A comparação entre o grupo policarbonato e o controle não revelou diferença estatisticamente significativa. Houve diferença estatisticamente significativa no tempo 48 horas em relação ao controle, para o grupo policarbonato e polioximetileno, com aumento do número de células nos dois grupos. Novamente, o estímulo do material à proliferação dos macrófagos pode explicar esta diferença. No tempo 72 horas não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle.

A viabilidade celular em todos os grupos foi maior no período final da avaliação (72 horas) em relação ao período 24 horas, aumento este estatisticamente significativo somente nos grupos controle e bráquetes cerâmicos. As médias finais (72 horas) em todos os grupos foram numericamente menores que o controle, mas a diferença entre elas não foi estatisticamente significativa.

A produção de óxido nítrico pode ser considerada como resultante da fisiologia normal de células como os macrófagos e pode, ainda, estar sujeita à ação de substâncias imunomoduladoras que podem aumentar ou diminuir a produção destas moléculas<sup>28</sup>. Desde que o óxido nítrico foi reconhecido como importante modulador da função celular na saúde e na doença, pesquisas sugerem,

paradoxalmente, que esta molécula pode apresentar efeitos tanto citotóxicos como citoprotetores <sup>29</sup>.

No tempo 24 horas a dosagem de NO foi maior para todos os grupos de bráquetes em relação ao grupo controle. Todavia, somente no grupo de bráquetes de polioximetileno esta diferença foi estatisticamente significativa. A presença dos materiais em contato com a célula pode ser o estímulo para esta maior produção de NO, uma vez que os macrófagos ativados são os principais produtores desta molécula de grande importância nos processos de resposta imune e inflamação <sup>21</sup>.

No tempo 48 horas verifica-se um aumento estatisticamente significativo da dosagem do NO, em relação ao tempo 24 horas, em todos os grupos. Em relação ao grupo controle, somente o grupo dos bráquetes de polioximetileno apresentou diferença estatisticamente significativa neste tempo.

No tempo 72 horas novamente verifica-se diferença estatisticamente significativa entre os bráquetes de polioximetileno e o grupo controle, enquanto que para os demais bráquetes não houve diferença estatisticamente significativa.

Na análise dos resultados verifica-se que tanto a viabilidade celular quanto a produção de óxido nítrico aumentaram no tempo final da análise em relação ao tempo inicial. Este aumento aconteceu no grupo controle e nos grupos de bráquetes estudados. Apesar da menor taxa de viabilidade do grupo de bráquetes de polioximetileno no tempo 24 horas e da maior taxa de viabilidade nos grupos de bráquetes de policarbonato e polioximetileno no tempos 48 horas, as médias finais (72 horas) dos grupos de bráquetes não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

Para os bráquetes cerâmicos os resultados corroboram as informações existentes na literatura sobre a biocompatibilidade detectada nos teste *in vitro*. Os resultados dos testes de viabilidade celular demonstraram que a ação citotóxica relacionada à provável liberação de formaldeído pelos bráquetes de polioximetileno e de bisfenol-A pelos bráquetes de policarbonato não foi observada neste estudo.

Os níveis de óxido nítrico medidos revelaram que houve uma maior produção desta substância para os grupos de bráquetes de polioximetileno nos tempos 24 e 48 horas. Todavia não foi constatada influência, por parte dos bráquetes, na produção do óxido nítrico pelos macrófagos no tempo final (72 horas).

## **5- CONCLUSÃO**

1- A viabilidade celular no grupo de bráquetes cerâmicos apresentou comportamento semelhante ao apresentado pelo grupo controle. A viabilidade celular em todos os grupos foi maior no período final da avaliação em relação ao período inicial. As médias finais (72 horas) nos grupos de bráquetes não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

2- A produção de óxido nítrico foi significativamente maior em todos os grupos no período final da avaliação (72 horas) em relação ao período 24 horas. Não houve diferença significativa entre as médias finais dos grupos de bráquetes e do grupo controle, embora os bráquetes de polioximetileno tenham apresentado médias significativamente maiores nos períodos de 24 e 48 horas.

## REFERÊNCIAS

- 1- PROFFIT WR, FIELDS HW, SARVER DM. Contemporary Orthodontics. 4th ed St Louis: Mosby; 2006.
- 2- MOCKERS O, DEROZE D, CAMPS J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. Dent Mater J 2002; 18: 311-317.
- 3- SJÖGREN G, SLETTEN G, DAHL JE Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. J Prosthet Dent 2000; 84:229-236.
- 4- ANUSAVICE, K. J. Phillips' science of dental materials 11th ed. Philadelphia: Saunders, 2003.
- 5- SWARTZ, M. L. Ceramic brackets. J Clin Orthod 1988;22:82-88.
- 6- MEGURO D, HAYAKAWA T, KAWASAKI M, KASAI K. Shear bond strength of calcium phosphate ceramic brackets to human enamel. Angle Orthod 2006; 76:301-305.
- 7- ELIADES, T. Orthodontic materials research and applications: Part 2- Current status and projected future developments in materials and biocompatibility. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2007;131:253-262.
- 8- NISHIO C, MOTTA AFJ, ELIAS CN, MUCHA JN. In vitro evaluation of frictional forces between archwires and ceramic brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004;125: 56-64.
- 9- SUZUKI K, ISHIKAWA K, SUGIYAMA K, FURUTA H, NISHIMURA F. Content and release of BPA from polycarbonate dental products. Dent Mater J 2000;19:389-395.

- 10- MATASA, C. Polymers in orthodontics: a present danger? In: Graber, TM, Eliades, T; ATHANASIOU, AE. Risk management in orthodontics: Experts' guide to malpractice. Berlin Quintessence Publishing Co, Inc; 2004. p. 113-129.
- 11- WATANABE M, HASE T, IMAI Y. Change in the bisphenol A content in a polycarbonate orthodontic bracket and its leaching characteristics in water. Dent Mater J 2001;20:353-358.
- 12- WATANABE M; HASE T; IMAI Y. Degradation and formation of bisphenol A in polycarbonate used in dentistry. J Med Dent Sci 2004;51:1-6.
- 13- ZILBERMAN U. Formaldehyde from POM brackets. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2005;12: 147-148.
- 14- KUSY R, WHITLEY J. Degradation of plastic polyoxymethylene brackets and the subsequent release of toxic formaldehyde. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2005;127:420-427.
- 15- HANKS CT, WATAHA CJ, SUN, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater J 1996;12:186-193.
- 16- LOHINAI ZM, SZABÓ C. Role of nitric oxide in physiology and pathophysiology of periodontal tissues. Med Sci Monit 1998;4:1089-1095.
- 17- MATEJKA, M, PARTYKA J, ULM C, SOLAR P, SINZINGER H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. J Periodontol 1998;33:517-518.
- 18- BATISTA AC, SILVA TA, CHUN JH, LARA VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. Oral Diseases 2002;8:254-260.
- 19- MONCADA S, PALMER RMJ, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 1991;43:109-142.

- 20- KRÖNCKE K-D, FEHSEL K, KOLB-BACHOFEN V. Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when and where? *Nitric Oxide* 1997;1: 107-120.
- 21- KENDALL HK, MARSHALL RI, BARTOLD PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Diseases* 2001;7: 2-10.
- 22- WILSON, 2000 In: Masters, JRW editor. *Animal Cell Culture*. 3rd ed New York: Oxford University Press; 2000. p. 175-219.
- 23- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- 24-GREEN LC, WAGNER DA, GLOGWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 1982;126:132-38.
- 25-YAO D, VLESSIDIS AG, EVMIRIDIS NP. Determination of nitric oxide in biological samples. *Microchim Acta* 2004; 147:1-20.
- 26- GRIMSDOTTIR MR, HENSTER-PETERSEN A. Cytotoxicity and antibacterial effects of orthodontic appliances. *Scand J Dent Res* 1993;101:229-231
- 27- SCHMALZ, G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. *J Dent* 1994; 2: S6-S11.
- 28- ABBAS, AK, LICHTMAN, AH, PILLAI, S. *Cellular and Molecular Immunology* 6th ed Philadelphia: Saunders; 2007.
- 29- WILEY JW. The many faces of Nitric Oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. *Neurogastroenterol Motil* 2007;19: 541-544.

**2.3 – Artigo 3 - Viabilidade Celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 estimulados com interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) na presença de bráquetes cerâmicos, policarbonato e de polioximetileno.**

**(Parte II)**

**ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO**  
**AJODO - American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**

AUTORES

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

MARIA APARECIDA DE SOUZA  
DOUTORA EM IMUNOLOGIA  
PROFESSORA VISITANTE – DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA,  
MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ANA PAULA FERREIRA  
DOUTORA EM IMUNOLOGIA  
PROFESSORA ASSOCIADA – DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA,  
MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

ROBERT WILLER FARINAZZO VITRAL  
DOUTOR EM ORTODONTIA  
PROFESSOR ASSOCIADO – DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA SOCIAL E  
INFANTIL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

AUTOR CORRESPONDENTE: JULIA CRISTINA DE ANDRADE VITRAL  
AVENIDA BARÃO DO RIO BRANCO, 2595/1603-1604  
36010 907 – JUIZ DE FORA – MG  
(32)32323596  
[javitral@acessa.com](mailto:javitral@acessa.com)

## **Viabilidade celular e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774 estimulados com interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) na presença de bráquetes cerâmicos, de policarbonato e de polioximetileno. (Parte II)**

### **1- Introdução**

Um estudo prévio <sup>1</sup> avaliou a viabilidade celular e a produção de óxido nítrico por macrófagos J774 na presença de bráquetes ortodônticos estéticos (cerâmicos, de policarbonato e de polioximetileno). A análise dos resultados revelou que a resposta das células na presença dos bráquetes cerâmicos foi a mais semelhante à das células do grupo controle.

Estudos realizados com estes tipos de bráquetes apontam para o fato de os bráquetes cerâmicos serem quimicamente inertes aos fluidos bucais <sup>2</sup> enquanto existem preocupações com a degradação dos bráquetes de policarbonato em bisfenol-A <sup>3,4,5,6</sup> e da liberação de formaldeído pelos bráquetes de polioximetileno <sup>7</sup>. Verifica-se, ainda, a recomendação da realização de testes mais confiáveis sobre o potencial de toxicidade destes materiais<sup>8,9</sup>.

Além dos testes de citotoxicidade tradicionais o estudo da produção de óxido nítrico associado a determinado material é uma maneira de determinar o potencial de toxicidade deste material, já que a citotoxicidade pode, também estar relacionada a moléculas que, ao serem liberadas a partir de um determinado estímulo, podem ocasionar danos aos tecidos. O envolvimento do

óxido nítrico em doenças inflamatórias bucais tem sido detectado e é listado como um fator que afeta o processo de remodelação óssea<sup>10, 11,12</sup>.

O papel do óxido nítrico na cavidade bucal normal ainda é desconhecido. Estudos sugerem que concentração excessiva de NO na saliva exerce um papel de regulador patofisiológico nas doenças da mucosa bucal. Observa-se aumento do nível do nível de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) gengival durante a inflamação periodontal, em comparação com tecidos gengivais saudáveis<sup>13</sup>. O NO é um regulador dos processos de formação e reabsorção óssea, sendo um importante mediador bioquímico na resposta dos tecidos periodontais às forças ortodônticas<sup>14,15,16</sup>.

Apesar deste papel regulador de extrema importância nos processos de resposta imune, processos inflamatórios, metabolismo ósseo e apoptose, o NO em altas concentrações pode atuar como molécula citotóxica aos tecidos<sup>17, 18,19</sup>.

Macrófagos ativados são importantes células efetoras nos processos inflamatórios e na defesa do hospedeiro contra microrganismos. Ele induz a produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e outras moléculas responsáveis pela atividade microbicida dos macrófagos<sup>20,21</sup>. A ativação consiste em alterações quantitativas na expressão de várias proteínas que conferem aos macrófagos ativados a capacidade de exercer algumas funções que não podem ser executadas por monócitos em repouso. Macrófagos são considerados ativados se desempenham uma determinada função medida em um ensaio específico como, por exemplo, morte microbiana<sup>22</sup>. O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina que desempenha importante papel tanto na

imunidade inata quanto na imunidade adaptativa e é a principal citocina ativadora de macrófagos.<sup>20, 21</sup>

O presente trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* viabilidade celular (MTT assay) de uma linhagem de macrófagos murinos J774 ativados com interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) na presença de bráquetes estéticos de cerâmica, de policarbonato e de polioximetileno assim como o efeito destes bráquetes na produção de óxido nítrico (NO) por estas células.

### **2.2.5 - Análise estatística**

A partir dos resultados foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

-Viabilidade celular:

O teste de Kruskal-Wallis foi empregado para verificar em cada tempo, separadamente, a presença de diferença significativa na viabilidade celular entre os materiais ( controle, brackets cerâmicos, brackets PC e brackets POM) e também para verificar a presença de diferença significativa na viabilidade celular nos três tempos de análise, para cada material separadamente.

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para verificar se houve diferença significativa na viabilidade celular entre cada um dos materiais, individualmente, e o grupo controle em cada tempo estudado e para a avaliação do comportamento individual de cada grupo de material, procurando determinar diferenças significativas entre a viabilidade celular nos tempos estudados (24/48 horas, 48/72 horas e 24/72 horas)

-Produção de Óxido Nítrico:

O teste de Kruskal-Wallis foi empregado para verificar em cada tempo, separadamente, a presença de diferença significativa na produção de NO entre os materiais ( controle, brackets cerâmicos, brackets PC e brackets POM) e também para verificar a presença de diferença significativa na produção de NO nos três tempos de análise, para cada material separadamente.

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para verificar se houve diferença significativa na produção de NO entre cada um dos materiais, individualmente, e o grupo controle em cada tempo estudado e para a avaliação do comportamento individual de cada grupo de material, procurando determinar diferenças significativas entre a produção de NO os tempos estudados (24/48 horas, 48/72 horas e 24/72 horas)

### **3- RESULTADOS**

#### **3.1 - Viabilidade celular**

A Tabela 1 apresenta os  $p$ -valores do teste de Kruskal-Wallis para a viabilidade celular em função do tempo ( $p < 0,05$  para 24 e 48 horas) e do tipo de material ( $p < 0,05$  para todos os grupos)

A figura 1 expressa a comparação entre os grupos de materiais e o grupo controle.

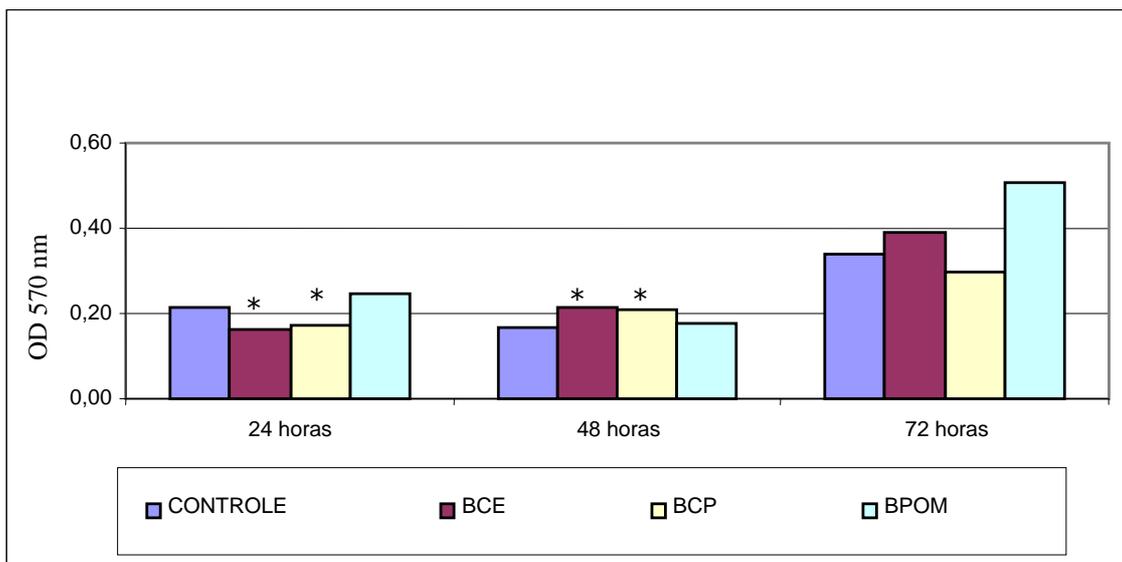
Na análise da diferença entre os tempos para cada material, o grupo controle e os grupos de bráquetes cerâmicos e de policarbonato apresentaram  $p < 0,05$

nos três intervalos de tempo estudados. Os bráquetes de polioximetileno apresentaram  $p < 0,05$  nos tempos 48 e 72 horas.

**TABELA 1** - Análise estatística da viabilidade celular em função do tempo e do tipo de material

a- TEMPO		b- MATERIAL	
		Grupo Controle	0,001*
24h	0,006*	Bráquetes Cerâmicos	0,001*
48h	0,004*	Bráquetes de Policarbonato	0,001*
72h	ns	Bráquetes de Polioximetileno	0,004*

\*p valor < 0,05 - Teste de Kruskal-Wallis para a Viabilidade Celular em função (a) do Tempo e (b) do tipo de material.



**FIGURA 1** - Viabilidade celular na presença de Interferon-gama. Comparação entre as médias da contagem de células de cada material com o grupo controle nos três tempos analisados – \* p valor < 0,05

### 3.2 - Produção de óxido nítrico

A Tabela 2 apresenta os  $p$ -valores do teste de Kruskal-Wallis para a produção de óxido nítrico em função do tempo ( $p < 0,05$  para 48 e 72 horas) e do tipo de material ( $p < 0,05$  para todos os grupos estudados)

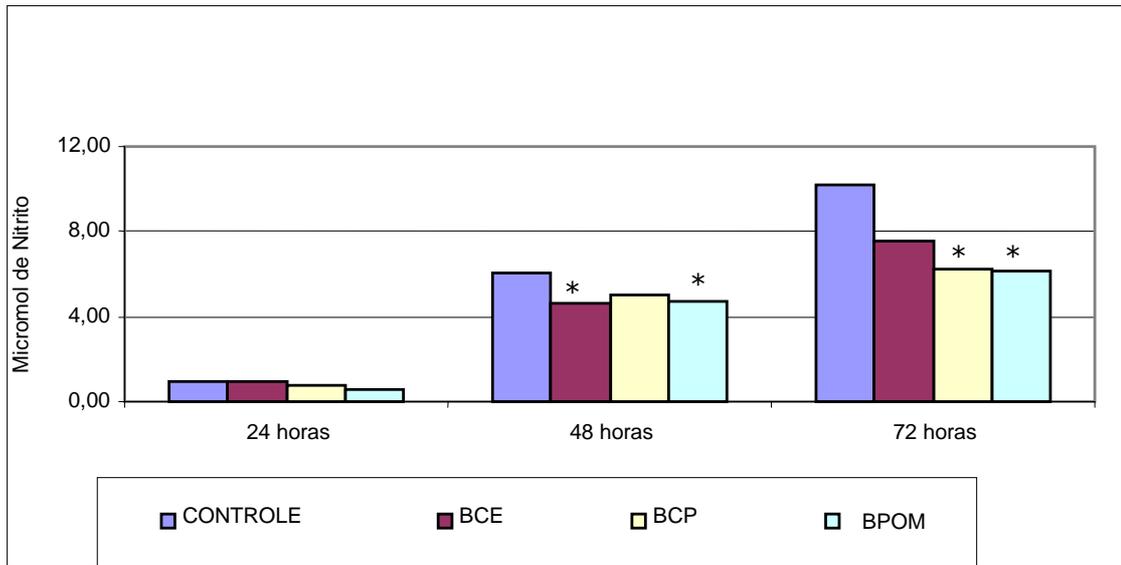
A figura 2 expressa a comparação entre os grupos de materiais e o grupo controle.

Na análise da diferença entre os tempos para cada material, todos os grupos apresentaram  $p < 0,05$  nos três intervalos de tempo estudados.

**TABELA 2** - Análise estatística da produção de NO em função do tempo e do tipo de material

a- TEMPO		b- MATERIAL	
		Grupo Controle	0,001
24h	ns	Bráquetes Cerâmicos	0,003
48h	0,011	Bráquetes de Policarbonato	0,002
72h	0,012	Bráquetes de Polioximetileno	0,001

p valor – Teste de Kruskal-Wallis para a produção de óxido nítrico em função (a) do Tempo e (b) do tipo de Material.



**FIGURA 2** - Óxido Nítrico na presença de Interferon-gama. Comparação entre as médias da concentração de óxido nítrico de cada material com o grupo controle nos três tempos analisados na presença de estímulo - \*  $p$  valor < 0,05

#### 4- DISCUSSÃO

O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina com importante papel nos processos imunológicos, sendo a principal citocina ativadora de macrófagos<sup>20,21</sup>. A utilização do interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) no presente estudo procurou simular uma condição comum no organismo humano no qual estas citocinas são produzidas por células do microambiente na presença de antígenos.

Ao se comparar os resultados encontrados com um estudo prévio<sup>1</sup>, no qual não houve a ativação dos macrófagos com interferon-gama verificou-se que o comportamento do grupo controle em relação à viabilidade celular foi semelhante. De 24 horas para 48 horas houve uma significativa diminuição da média da viabilidade; um aumento significativo na média da viabilidade se fez presente de 48 para 72 horas. A viabilidade no tempo final, 72 horas, foi também significativamente maior que no tempo inicial, 24 horas.

Na presença do estímulo com interferon-gama as células em contato com os bráquetes polioximetileno apresentaram comportamento semelhante às do grupo controle, todavia a redução da viabilidade apresentada de 24 para 48 horas não foi estatisticamente significativa. Esta redução pode estar associada, tanto no grupo controle como neste grupo de bráquetes, à adaptação dos macrófagos ao meio de cultura. No tempo 72 horas constata-se que a média da viabilidade celular aumenta significativamente em relação aos demais tempos e apresenta o maior valor dentre todos os grupos estudados. A presença do interferon-gama associado ao bráquete POM pode ter constituído o estímulo para a maior proliferação dos macrófagos. Em nenhum dos tempos avaliados houve diferença estatisticamente significativa quando as médias da viabilidade celular do grupo de bráquetes de polioximetileno foram comparadas com as médias dos tempos correspondentes no grupo controle.

Na análise da viabilidade celular constata-se um comportamento semelhante entre o grupo de bráquetes cerâmicos e o grupo de bráquetes de policarbonato. No tempo 24 horas os dois grupos apresentaram médias significativamente menores que o controle. Verifica-se, assim, que, a adaptação celular ao meio, associada à presença do material e do estímulo com interferon pode ter levado a uma redução da viabilidade neste tempo. No tempo 48 horas, diferentemente do controle, houve um aumento nas médias de viabilidade. Este aumento foi estatisticamente significativo em relação ao tempo 24 horas. Em relação ao grupo controle as médias foram, também, significativamente maiores. No tempo 72 horas novamente as médias aumentaram nos dois grupos de bráquetes. Este aumento foi estatisticamente

significativo em relação aos tempos 48 horas e 24 horas, mas em relação a media apresentada pelo grupo controle não houve diferença significativa.

Comparando estes resultados com aqueles da primeira parte do estudo <sup>1</sup>, no qual não houve estímulo com interferon-gama, verifica-se haver diferenças na resposta celular na presença dos diferentes bráquetes. Uma possível ação sobre a viabilidade celular associada à liberação de formaldeído pelos bráquetes de polioximetileno não foi observada neste experimento. O grupo de bráquetes de polioximetileno foi o que aqui apresentou comportamento mais semelhante ao grupo controle. As células em contato com os bráquetes cerâmicos e de policarbonato, apesar de apresentarem uma menor viabilidade que o controle no tempo 24 horas, mostraram uma viabilidade significativamente maior que o controle no tempo 48 horas e ausência de diferença significativa em 72 horas. Da mesma maneira que nos testes sem estímulo com interferon-gama a viabilidade celular em todos os grupos foi significativamente maior no período final da avaliação (72 horas) em relação ao período inicial (24 horas) e as médias finais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle.

Na avaliação da síntese de NO pelos macrófagos, o grupo controle teve um comportamento semelhante ao que apresentou quando não houve estímulo com interferon-gama <sup>1</sup>. O aumento da produção do NO foi estatisticamente significativo em todos os tempos estudados. Verifica-se, também, que as médias foram maiores na presença do estímulo com interferon-gama.

Nos três grupos de bráquetes avaliados a dosagem do NO também aumentou com o aumento do tempo. Este aumento só não foi estatisticamente significativo entre os tempos 48 horas e 72 horas para os bráquetes cerâmicos

e bráquetes policarbonato. Na comparação com o grupo controle as médias finais (72 horas) de dosagem de NO foram significativamente menores para o grupo de bráquetes de policarbonato e polioximetileno.

Desde que o NO despontou como um importante modulador da função celular em condições de saúde e de doença, os trabalhos têm mostrado, paradoxalmente, que esta molécula pode ter tanto efeito citotóxico como citoprotetor<sup>28</sup>. A produção de óxido nítrico pode ser considerada como resultante da fisiologia normal de células como os macrófagos e pode, ainda, estar sujeita à ação de substâncias imunomoduladoras que podem aumentar ou diminuir a produção destas moléculas<sup>22</sup>. Todas as médias da dosagem de NO apresentadas pelos grupos de bráquetes foram menores que aquelas apresentadas pelo grupo controle, com exceção do grupo de bráquetes cerâmicos no tempo 24 horas. Isto mostra que a associação do estímulo com interferon-gama aos bráquetes não teve a capacidade de elevar a produção de NO na mesma intensidade que no controle, onde os bráquetes não estavam presentes. Porque a associação interferon-gama/bráquetes determinou este tipo de resposta celular é, ainda uma questão a ser respondida.

Comparando os resultados com o da primeira parte do estudo<sup>1</sup>, sem o estímulo com interferon-gama, constata-se haver uma variabilidade nas respostas associadas aos grupos de bráquetes quando as condições do experimento são alteradas. Enquanto que na avaliação da viabilidade celular sem estímulo com interferon-gama o grupo de bráquetes polioximetileno apresentou maiores diferenças em relação ao controle, na avaliação em que os macrófagos são ativados com interferon-gama o grupo de bráquetes POM foi

que apresentou comportamento mais semelhante ao controle. Com o grupo de bráquetes cerâmicos aconteceu o contrário.

Em duas condições distintas de teste os diferentes grupos de bráquetes apresentaram efeitos diversos nas culturas celulares, podendo-se afirmar que nenhum deles foi totalmente inerte do ponto de vista de resposta celular. Protocolos para estudos *in vivo* devem ser desenvolvidos. Em seres humanos o número de variáveis se multiplica e aí reside, talvez, a maior dificuldade na realização dos experimentos e interpretação dos resultados.

## **5- CONCLUSÃO**

1- A viabilidade celular em todos os grupos foi significativamente maior no período final da avaliação (72 horas) em relação ao período inicial (24 horas).

2- As médias finais da viabilidade celular nos grupos de bráquetes não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Houve diferença significativa em relação ao controle nos tempos 24 (redução da viabilidade) e 48 horas (aumento da viabilidade) para os bráquetes cerâmicos e de policarbonato.

3- A produção de NO foi significativamente maior em todos os grupos no período final da avaliação (72 horas) em relação ao período 24 horas. Todavia a presença dos bráquetes associada ao estímulo com interferon  $\gamma$  nos meios de cultura não resultou numa maior produção de NO em relação a apresentada pelas células do grupo controle.

## REFERÊNCIAS

- 1- VITRAL, JCA; FRAGA, MR; FERREIRA, AP; SOUZA, MA; VITRAL, RWF. An *in vitro* study of the viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of ceramic, polycarbonate and polyoxymethylene brackets. Submitted: Am J Orthod Dentofacial Orthop (AJODO -D-07-00709).
- 2 - MEGURO, D.; HAYAKAWA, T.; KAWASAKI, M.; KASAI, K. Shear bond strength of calcium phosphate ceramic brackets to human enamel. *The Angle Orthod*, v.76, n.2, p. 301-305, 2006.
- 3- SUZUKI, K; ISHIKAWA K; SUGIYAMA K; FURUTA H; NISHIMUR F. Content and release of BPA from polycarbonate dental products. **Dent Material Journal**, v.19, n.4, p.389-95, Dec. 2000.
- 4- WATANABE, M; HASE, T; IMAI, Y. Change in the bisfenol A content in a Polycarbonate orthodontic bracket and its leaching characteristics in water. **Dent Material Journal**, 20(4): 353-8, Dec. 2001.
- 5- MATASA, C. Polymers in orthodontics: a present danger? In: GRABER, T. M.; ELIADES, T.; ATHANASIOU, A. E. Risk management in orthodontics: Experts' guide to malpractice: USA, Quintessence Publishing Co, Inc, 2004.
- 6- WATANABE, M; HASE, T; IMAI, Y. Degradation and formation of bisphenol A in polycarbonate used in dentistry. **J Med Dent Sci**, v.51, n.1, p.1-6, Dec. 2004.
- 7- KUSY R; WHITLEY J. Degradation of plastic polyoxymethylene brackets and the subsequent release of toxic formaldeyde. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.127, p. 420-427, April, 2005.

- 8- ZILBERMAN, U. Formaldehyde from POM brackets. **Am J Orthod Dentofacial Orthoped**, v. 12, n.2, AUG 2005, p. 147-148.
- 9- ELIADES, T. Orthodontic materials research and applications: Part 2- Current status and projected future developments in materials and biocompatibility. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, n.131, p. 253-262, 2007.
- 10- MATEJKA, M.; PARTYKA, J.; ULM, C.; SOLAR, P.; SINZINGER, H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. **J Periodontol**, Chicago, v.33, n.8, p. 517-518, Nov, 1998.
- 11- BATISTA, A.C., SILVA, T.A., CHUN, J.H., LARA, V.S. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. **Oral Dis**, Copenhagen, v.8, n.5, p. 254-260, Sept, 2002.
- 12- KRISHNAN, V; DAVIDOVITCH, Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v.129, n.4, p.460.e1-469.e32, April, 2006.
- 13- 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, Sept, 1999.
- 14- LOHINAI, Z. M.; SZABÓ, C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. **Med. Sci. Monit.**, v.4, n.6, p. 1089-1095, 1998.
- 15- DAGHIGI, F.; BORGHAEI, R.; THORNTON, R. D.; BEE, J. Human gingival fibroblasts produce nitric oxide in response to proinflammatory cytokines. **J Periodontol**, v.73, n.4, p. 392-400, 2002.

- 16- KEIGO, H.; KAORU, I.; KOTARO, M.; HISASHI, S.; HIDEO, M. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. **Am J Orthop**, Belle Meade, v.122, n.3, p. 306-309, Sept, 2002.
- 17- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and Pharmacology. **Pharmacol Rev**, v.43, p. 109-142, 1991.
- 18- KRÖNCKE, K-D; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when and where? **NO Biol Chemistry**, v.1, n.2, p. 107-120, April, 1997.
- 19- KENDALL, H. K.; MARSHALL, R. I.; BARTOLD, P. M. Nitric oxide and tissue destruction. **Oral Diseases**, v.7, p. 2-10, 2001.
- 20- 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- $\gamma$ . **Braz J of Med Biol Res**, São Paulo, v. 34, n.2, p. 221-226, Fev. 2001.
- 21- STOIKA, R.; KASHCHAK, N.; 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.
- 22- ABBAS, A K.; LICHTMAN, A H; PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology, USA: Elsevier, 6<sup>th</sup> Edition, 572p, 2007.
- 23- HAY R. J.; MIRANDA-CLELAND M.; DURKIN, S.; REID Y.A. in: MASTERS, J. R. W editor. Animal Cell Culture. 3rd ed New York: Oxford University Press; 2000, 3<sup>a</sup>. Ed., p. 69-103.
- 24- WILSON, 2000 In: Masters, J. R. W editor. Animal Cell Culture. New York: Oxford University Press; 2000, 3<sup>a</sup>. Ed., p. 175-218.

- 25- 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.
- 26- GREEN, L.C.; WAGNER, D. A.; GLOGWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J. S.; TANNBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrite in biological fluids. **Anal Biochem**, v.126, p. 131-138, 1982.
- 27- YAO, D.; VLESSIDIS, A, G.; EVMIRIDIS, N. P. Determination of nitric oxide in biological samples. **Microchim Acta**, v.147, p. 1-20, 2004.
- 28- WILEY, J.W. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective or both. **Neurogastroenterol Motil**, v.19, p. 541–544, 2007.

### **3 – ANEXO(S)**

### 3.1 – ANEXO A

#### 3.1.1 - 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)

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](mailto:javitral@acessa.com)

AV. BARÃO DO RIO BRANCO, 2595/1603-1604 – 36010 907 – (32)32323596 - JUIZ DE FORA – MG

### 3.1.2 – Artigo 2 - 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

## 3.2 – ANEXO B

### 3.2.1 – Artigo 2 - An *in vitro* study of the cellular viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets. (Part I)

Elsevier Editorial System(tm) for American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics  
Manuscript Draft

Manuscript Number: AJODO-D-07-00709

Title: An *in vitro* study of the cellular viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets.

Article Type: Original Article

Section/Category:

Keywords:

Corresponding Author: Dr. Robert W.F. Vitral, DDS, MS, PhD

Corresponding Author's Institution: Juiz de Fora Federal University Brazil

First Author: Julia C Vitral, Postgraduate student

Order of Authors: Julia C Vitral, Postgraduate student; Marcelo R Fraga, MS; Maria A Souza, PhD; Ana P

Ferreira, PhD; Robert W.F. Vitral, DDS, MS, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Studies point to the fact that ceramic brackets are chemically inert to the oral cavity, whereas polycarbonate and polyoxymethylene brackets may degrade releasing bisphenol-A and formaldehyde, respectively. In addition to the traditional cytotoxicity tests, the study of nitric oxide cellular production stimulated by a specific material has shown to be a reliable tool for evaluating its cytotoxic potential. The present study was aimed at assessing cellular viability by the MTT method in a murine macrophage cell line J774 in the presence of esthetic brackets, and quantify nitric oxide production by these macrophages.

Evaluation of cell culture was undertaken in three time intervals: 24, 48, and 72 hours. Cellular viability in all groups was higher at the final time interval (72 hours) in relation to the initial time (24 hours). This increase was significant in the control and ceramic bracket groups. Final means in the bracket groups did not show significant differences when compared to the control group. Nitric oxide production was significantly greater in all groups at the final time interval in relation to the initial time. There was no significant difference between the final means of the bracket groups and the control group, although polyoxymethylene brackets have shown significantly greater means at times 24 and 48 hours.

**An *in vitro* study of the cellular viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets.**

1-First Author: Julia Cristina de Andrade Vitral DDS  
PostGraduate Student - Juiz de Fora Federal University

2-Marcelo Reis Fraga DDS MS  
Professor - Juiz de Fora Federal University

3- Maria Aparecida de Souza PhD  
Associate Professor Department of Immunology  
Juiz de Fora Federal University

4- Ana Paula Ferreira PhD  
Associate Professor Department of Immunology  
Juiz de Fora Federal University

5- Robert Willer Farinazzo Vitral DDS MS PhD  
Associate Professor Department of Orthodontics  
Juiz de Fora Federal University

Corresponding Author: Robert Willer Farinazzo Vitral  
Av. Rio Branco 2595 / 1603-1604  
CEP 36010 907 Juiz de Fora MG  
Tel/fax 55 32 3215 2270

[robertvitral@acessa.com](mailto:robertvitral@acessa.com)

[www.ortodontia.ufjf.br](http://www.ortodontia.ufjf.br)

### 3.2.2 – Artigo 2 - Carta de Aceite - AJODO



**De:** [American Journal of Orthodontics](#)[+] [[Exibir código fonte](#)]

**Para:** [robertvital](#)[+]

**Data:** 28 Mar 2008 19:29:42 +0000

**Assunto:** Your Submission AJODO-D-07-00709R2

Dr. Robert W.F. Vital

Address:

Associate Professor of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

Juiz de Fora Federal University Brazil - Orthodontics

Av. Rio Branco 2595/1604

Juiz de Fora, Minas Gerais 36010 907 - BRAZIL

Phone: 55 32 32323596

E-mail Address: robertvital@acessa.com

Preferred Method of Contact: Postal Mail.

-----

Ms. Ref. No.: AJODO-D-07-00709R2

Title: An in vitro study of the cellular viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets.

American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics

Dear Dr. Vital,

Thank you for revising your manuscript, "An in vitro study of the cellular viability and nitric oxide (NO) production by J774 macrophages in the presence of ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets.," and resubmitting it to the American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics. You have successfully addressed the reviewers' concerns and I am pleased to accept the paper for publication. It will –make a fine contribution to the orthodontic literature.

Thank you for submitting your work to this journal. I look forward to seeing the article in the AJO-DO.

With kind regards,

David L. Turpin - Editor-in-Chief

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics