

Efeito Citotóxico de Alginatos Odontológicos sobre Células Fibroblastóides

Cytotoxic effects of a dentistry alginates applied on fibroblast-like cells

Matheus M. PITHON¹, Rogério L. SANTOS¹, Fernanda O. MARTINS², Maria T. V. ROMANOS³

1 - Pós-Graduando (doutorado) em Ortodontia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2 - Aluna de graduação de Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3 - Doutora em Ciências (Microbiologia e Imunologia) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RESUMO

O alginato ou hidrocolóide irreversível é um dos materiais de moldagem mais aceitos e utilizados na Odontologia. Algumas substâncias presentes nesses pode levar toxicidade. O estudo foi avaliar a citotoxicidade de alginatos de uso odontológico. Foram avaliados quatro diferentes alginatos divididos em 4 grupos, assim denominados: Ava Gel, New Print, Kromopan e Hydrogum. Três grupos controle também participaram Controle positivo (C+) constituído pelo detergente celular Tween 80, controle negativo (C-) PBS, e controle de célula (CC) onde as células não foram expostas a nenhum material. Após manipulação dos materiais seguindo as orientações do fabricante foi confeccionado corpos de prova utilizando-se anéis de silicone. Em seguida os mesmos foram imersos em meio mínimo essencial de Eagle (MEM) por 2 min, onde então procedeu-se a remoção do sobrenadante e colocação em contato com fibroblastos L929. Após contato com o meio as células foram incubadas

por mais 24 h onde então foram adicionados 100ml do corante vermelho neutro a 0,01%. Novamente as células foram incubadas por 3 h para que as mesmas incorporassem o corante. Passado esse período as mesmas foram fixadas e então, realizada contagem de células viáveis em espectrofotômetro (BioTek, Winooski, Vermont, USA) em um comprimento de onda de 492nm. Os resultados demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos CC e C-com os demais ($P < 0.05$). Ausência de diferença estatística ocorreu entre os grupos Ava Gel, New Print, Kromopan e Hydrogum ($P > 0.05$). Pode-se concluir com a realização desse trabalho que todos os alginatos testados mostraram caráter citotóxico.

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade; Materiais para Moldagem Odontológica; Técnicas de Cultura de Células; Fibroblastos.

INTRODUÇÃO

Os testes de biocompatibilidade, efeitos carcinogênicos e mutagênicos de materiais odontológicos são de extrema importância, uma vez que na odontologia diferentes tipos de materiais utilizados para variados procedimentos operatórios podem entrar em contato com células da mucosa oral, gengiva marginal e/ou do complexo dentinopulpar. Diversos estudos têm chamado a atenção para a relevância de se verificar o grau de citotoxicidade dos materiais odontológicos, considerando este um passo importante antes de sua aplicação clínica na cavidade bucal¹⁻².

Dentre esses materiais cita-se em especial o alginato de uso odontológico, que é um material de moldagem classificado como hidrocolóide irreversível, de fácil manipulação, boa capacidade de reprodução de detalhes, barato e confortável para o paciente³. Por isso, esse material é de uso corriqueiro na prática odontológica diária. Apesar de fácil manipulação, nem sempre se consegue moldagens perfeitas, principalmente nas primeiras experiências dos alunos com o paciente, levando, muitas vezes, à repetição deste procedimento⁴.

Metais pesados e partículas de sílica podem fazer parte da composição do pó de alginato e trazer algum risco de toxicidade para o profissional e/ou paciente. Dentre os metais figura o

Chumbo, presente no pó ou como impureza, ou para aprimorar as propriedades elásticas do material após a sua geleificação⁵.

A intoxicação com alginato pode dar-se por inalação do pó pelo paciente e profissional, ingestão acidental pelo paciente e absorção pela mucosa oral em casos de repetidas moldagens⁵⁻⁷.

Durante uma moldagem, o alginato entra em contato íntimo, por um tempo de cerca de 2 minutos, com a mucosa oral que é altamente vascularizada e possui grande potencial de absorção. Assim sendo, a repetição de moldagens consecutivas poderia causar certo grau de toxicidade para o paciente, dependendo da composição do material⁴⁻⁵.

Baseado nessa premissa o objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade em culturas de células de quatro diferentes alginatos de uso odontológico.

MATERIAL E MÉTODO

Cultura de células

A linhagem celular utilizada foi L929 obtido do *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD) (fibroblasto de camundongo) cultivada em meio mínimo essencial de Eagle (MEM)

(Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), 50 mg/ml de gentamicina (Schering Plough, Kenilworth, New Jersey, USA), 2,5 mg/ml de fungizona (Bristol-Myers-Squibb, New York, USA), 0,25ml solução de bicarbonato de sódio (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM of HEPES (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil) e mantida a 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂.

Alginatos avaliados

A amostra foi composta de quatro diferentes alginatos odontológicos divididos em quatro grupos: Ava Gel, New Print, Kromopan e Hydrogum.

Confecção dos corpos de prova

Para confecção dos corpos de prova, o material foi manipulado por 1 minuto utilizando-se cubeta de borracha e espátula plástica seguindo as recomendações do fabricante. Após correta homogeneização, o alginato foi inserido em anéis de silicone nas dimensões de 4 mm de diâmetro e 4mm de altura, até sua completa geleificação.

Controles

Para verificar a resposta celular frente aos extremos, outros três grupos foram inseridos, grupo CC (controle de célula) o qual as células não foram expostas a nenhum material, grupo C+ (controle positivo) constituído de um detergente Tween 80 (Polioxietileno-20-Sorbitan) C- (controle negativo), Solução de PBS (Phosphate-buffered saline).

Ensaio de citotoxicidade dos materiais

Os materiais foram esterilizados previamente por exposição à luz U.V. (Labconco, Kansas, Missouri, USA) durante 1 hora. Em seguida, três amostras de cada material foram colocadas em placas de 24 poços contendo meio de cultura (MEM) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brazil). A cada 24h o meio de cultura foi substituído por meio novo e os sobrenadantes coletados após 24, 48, 72 e 168 horas (7dias), e avaliados quanto à toxicidade para as células L929. Os sobrenadantes foram colocados, em triplicata, em uma placa de 96 poços contendo monocamada confluyente de L929 e incubados por 24 horas a 37 °C em ambiente contendo 5% de CO₂. Terminado o tempo de incubação, o efeito na viabilidade celular foi determinado através da técnica "dye-uptake", descrita por Neyndorff *et al.*⁸ (1990), com pequenas modificações. Após 24 horas de incubação, foram adicionados 100ml de vermelho neutro a 0,01% (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), em meio de cultura, em cada poço das microplacas e estas foram incubadas a 37°C por 3 horas para penetração do corante nas células vivas. Passado esse período, após desprezar o corante, foram adicionados 100ml de solução de formaldeído (Reagen) a 4% em PBS (NaCl 130 mM; KCl 2 mM; Na₂HPO₄ 2H₂O 6 mM; K₂HPO₄ 1mM, pH7,2) por 5 minutos, para promover a fixação das células às placas. Em seguida, para a extração do corante, foram adicionados 100ml de uma solução de ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 1% com metanol (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) a 50%. Após 20 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro (BioTek, Winooski, Vermont, USA) em um comprimento de onda de 492nm (λ = 492 nm).

No presente trabalho, foram cumpridos todos os princípios éticos contidos na Declaração de Helsink (2000), além do atendimento a legislações específicas brasileiras quanto a realização de experimentação científica utilizando-se culturas de células.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois). Análise estatística descritiva incluindo média e desvio padrão, foram calculados para os grupos avaliados. Os valores da quantidade de células viáveis foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para determinar se havia diferenças estatísticas entre os grupos, e posteriormente ao teste de Tukey

RESULTADOS

Os resultados demonstraram diferenças estatísticas entre os grupos CC e C- com os demais (P<0.05). Ausência de diferença estatística ocorreu entre os grupos Ava Gel, New Print, Kromopan e Hydrogum (P>0.05).

Tabela 1. Média, desvio padrão, percentagem de células viáveis e análise estatística dos grupos avaliados.

Grupos	Média Celulas Viáveis	% Células Viáveis	Estatísticas
Ava Gel	545,87 (100,2)	42,88	A
New Print	588,87 (109,24)	46,25	A
Kromopan	563,75 (74,45)	44,28	A
Hydrogum	651,12 (100,51)	51,14	A
C+	67 (2,20)	5,26	B
C-	1111,5 (67,85)	87,31	C
CC	1273,75 (125,71)	100	C

M. Cel: valores médios da quantidade de células viáveis;
 DP: Desvio padrão;
 Est: Estatística, onde letras iguais representam ausência de diferenças estatísticas.

Com relação à viabilidade celular o grupo CC demonstrou maior viabilidade seguido do grupo C-, Hydrogum, New Print, Kromopan e Avagel. O grupo com menor viabilidade celular foi o grupo C+.

DISCUSSÃO

O alginato é um dos materiais de moldagem mais aceitos e utilizados na Odontologia. Os fabricantes produzem o pó de alginato contendo vários componentes, com diferentes finalidades. Muitas substâncias como zinco, bário, cádmio, silicatos de chumbo e fluoretos, são adicionados em algumas marcas comerciais com o objetivo de melhorar suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, causando preocupação no que se refere à toxicidade desse material⁹.

O alginato tem a capacidade de afetar a habilidade das células em se reproduzirem⁷. Isto é, a substância pode não ser tóxica o suficiente para matar as células, mas é tóxica para inibir o crescimento celular ou, em pequena escala, afetar a função celular normal. O significado clínico disso é que, enquanto um único contato pode não causar sintomas clínicos, contatos repetidos com o material, que altera ou afeta a viabilidade das células, pode resultar em reação tóxica tardia ou alérgica. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de quatro alginatos pertencentes à família Jeltrate em cultura de células.

A utilização de cultura de células vem sendo utilizada como parte de uma série de testes recomendados para avaliar o comportamento biológico dos materiais a serem colocados em contato com tecidos humanos¹⁰⁻¹². Neste estudo, testes de citotoxicidade foram realizados para avaliar a citotoxicidade de alginatos de uso odontológico. Utilizou-se linhagem de célula L929 (fibroblastos de camundongos), bastante utilizada quando se deseja avaliar a citotoxicidade de materiais de uso odontológico¹³⁻¹⁶.

O tempo de avaliação no presente foi de 2 minutos, tempo máximo que o alginato permanece na cavidade bucal durante o procedimento de moldagem. Após contato dos corpos de prova com o meio de cultura, foi coletado o sobrenadante do meio de cultura que foi então colocado em contato com as células. A escolha de contato indireto baseia-se na premissa de que, se os corpos de prova tocassem as células, esses poderiam danificá-las, interferindo nos resultados como sugerido por Costa *et al.*¹⁷ (2001).

Os resultados do presente trabalho demonstraram que todos os alginatos apresentaram citotoxicidade quando comparado ao controle de célula e ao controle negativo (C-). O Hydrogum demonstrou maior viabilidade celular seguido do New Print, Kromopan e Ava Gel.

Visando avaliar a resposta celular frente a situações extremas, foi inserido ao trabalho um grupo controle positivo (C+) que teve como função gerar lesões às células. O material utilizado como controle positivo foi o Tween, que é um surfactante não-iônico, tóxico para as membranas biológicas¹⁸, constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol, que tem como características estimular a secreção de proteínas em microrganismos¹⁹, além de alterar a morfologia e a superfície da parede celular²⁰. Como esperado o controle positivo apresentou alta toxicidade, sendo diferente estatisticamente de todos outros grupos ($P < 0.05$).

O grupo Controle negativo constituiu-se de uma solução de PBS (Phosphate-buffered saline), reconhecidamente não tóxica as células, esse controle visou avaliar apenas a ação física sobre as células. Esse demonstrou baixa citotoxicidade, com ausência estatística com o grupo controle de célula, o qual nenhuma substância foi colocada em contato com as células. Apesar de todos alginatos testados terem demonstrado citotoxicidade, é importante priorizar dentre esses, o que possui menor toxicidade celular quando da sua aquisição.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir com a realização desse trabalho que:

Todos os alginatos avaliados mostraram potencial tóxico às células.

REFERÊNCIAS

- Thonemann B, Schmalz G, Hiller KA, Schweikl H. Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater* 2002;18:318-323.
- Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J* 2003;36:831-839.
- Anusavice KJ. Phillips, materiais dentários, 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
- Samuel SW, Miranda LA, Dutra CAV. Potencial Tóxico dos Alginatos. *R Fac Odontol Porto Alegre* 1995;36:14-16.
- Braga AS, Braga SRS, Catirce ABCEB, Vaz LG, Spadaro ACC. Potencial tóxico dos alginatos para uso odontológico. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2007;28:153-158.
- Braga AS, Catirce ABCEB, Vaz LG, Spadaro ACC. Quantitative analysis of potentially toxic metals in alginates for dental use. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 2005;26:125-130.
- Sydskis RJ, Gerhardt DE. Cytotoxicity of impression materials. *J Prosthet Dent* 1993;69:431-435.
- Neyndorff HC, Bartel DL, Tufaro F, Levy JG. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. *Transfusion* 1990;30:485-490.
- Freitas JF. Potential toxicants in alginate powders. *Aust Dent J* 1980;25:224-228.
- Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo. Artes Médicas; 2005.
- Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. *Rev Odontol UNESP* 2004;33:65-68.
- Santos RL, Pithon MM, Oliveira MV, Mendes GS, Romanos MTV, Ruellas ACO. Cytotoxicity of introral orthodontic elastics. *Braz J Oral Sci* 2008;7:1520-1525.
- Alcaide M, Serrano MC, Pagani R, Sanchez-Salcedo S, Nieto A, Vallet-Regi M *et al.* L929 fibroblast and Saos-2 osteoblast response to hydroxyapatite-betaTCP/agarose biomaterial. *J Biomed Mater Res* 2008.
- Donadio M, Jiang J, Safavi KE, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of Activ GP and Resilon cones in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:e76-79.
- Feizzadeh B, Afshari JT, Rakhshandeh H, Rahimi A, Brook A, Doosti H. Cytotoxic effect of saffron stigma aqueous extract on human transitional cell carcinoma and mouse fibroblast. *Urol J* 2008;5:161-167.
- Jin CY, Zhu BS, Wang XF, Lu QH. Cytotoxicity of titanium dioxide nanoparticles in mouse fibroblast cells. *Chem Res Toxicol* 2008;21:1871-1877.
- Costa CA, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent* 2001;14:25-30.
- Rege BD, Kao JP, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci* 2002;16:237-246.
- Stutzenberger FJ. Interference of the detergent Tween 80 in protein assays. *Anal Biochem* 1992;207:249-254.

20. Domingues FC, Queiroz JA, Cabral JM, Fonseca LP. The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme Microb Technol* 2000;26:394-401.

ABSTRACT

Alginate or irreversible hydrocolloid is one of the most accepted and used impression materials in dentistry. Some substances present in these can lead toxicity. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of dental alginate of use. Was evaluated four different alginate divided into 4 groups, so called: Ava Gel, New Print, Kromopan e Hydrogum. Three control groups were also included: Group C+ (positive control), consisting of detergent Tween 80; Group C – (negative control), consisting of PBS, and Group CC (cell control), consisting of cells not exposed to any material. After manipulating the materials according to the manufacturer's instructions, samples were made by using silicon rings. Next, the samples were immersed into Eagle minimum essential medium (MEM) for 2 minutes, where the supernatants were removed and brought into direct contact with L929 fibroblasts. Following exposure

to the medium, the cells were incubated for further 24 hours and then 100 μ l of 0.01% neutral red dye were added. The cells were incubated again for 3 hours so that the dye could be absorbed. After this 3-hour period, the cells were fixed in order to count the viable ones by using a spectrophotometer (BioTek, Winooski, Vermont, USA) at a wavelength of 492nm. The results showed statistical differences between groups CC and C- with the others ($P < 0.05$). Lack of statistical difference occurred between groups and between Ava Gel, New Print, Kromopan e Hydrogum ($P > 0.05$). Based on the results obtained in this work, one can conclude that all four alginate impression materials are potentially cytotoxic.

KEYWORDS: Cytotoxicity; Dental Impression Materials; Cell Culture Techniques; Fibroblasts.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIAS

Matheus Melo Python
Centro Odontomédico Dr. Altamirando da Costa Lima
Av. Otávio Santos, 395, sala 705, Bairro Recreio, Vitória da
Conquista – Bahia, CEP 45020-750
Tel.: (77) 3084-2020 / 8805-2750
E-mail: matheuspython@bol.com.br