

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PRÓTESE
MESTRADO

CAMILA FRANCINE MAIA

CITOTOXICIDADE DOS MATERIAIS PROTÉTICOS DENTÁRIOS UTILIZADOS EM
IMPLANTODONTIA - ESTUDO IN VITRO

PORTO ALEGRE

2014

CAMILA FRANCINE MAIA

CITOTOXICIDADE DOS MATERIAIS PROTÉTICOS DENTÁRIOS UTILIZADOS EM
IMPLANTODONTIA - ESTUDO IN VITRO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia com área de concentração em Prótese Dentária pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Oshima

PORTO ALEGRE

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE

M217c Maia, Camila Francine
Cítotoxicidade dos materiais protéticos dentários utilizados em
implantodontia - estudo in vitro. — Porto Alegre, 2014.
32 f. : il.

Diss. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Pós-
Graduação em Odontologia, PUCRS, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima.

1. Odontologia. 2. Implantodontia. 3. Implantes dentários. 4.
Prótese dentária. 5. Toxidade. I. Oshima, Hugo Mitsuo Silva. II.
Título.

CDD: 617.69

Alessandra Pinto Fagundes
Bibliotecária
CRB10/1244

CAMILA FRANCINE MAIA

CITOXICIDADE DOS MATERIAIS PROTÉTICOS DENTÁRIOS UTILIZADOS EM
IMPLANTODONTIA - ESTUDO IN VITRO

Dissertação apresentada como
requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Odontologia, área
de concentração em Prótese Dentária
pelo Programa de Pós-Graduação da
Faculdade de Odontologia da
Pontifícia Universidade Católica do
Rio Grande do Sul.

Aprovada em: _____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Maria Martha Campos - PUCRS

Profa. Dra. Maria Perpétua Freitas de Azevedo - ULBRA

Prof. Dr. Hugo Oshima - PUCRS

Orientador

AGRADECIMENTOS

Em especial ao meu orientador, Hugo Oshima, pela amizade, disposição e conhecimentos transmitidos.

À Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, que oportunizou este curso para a minha formação acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa de estudos indispensável para realização deste curso.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, Prof. Ana Maria Spohr, meu muito obrigada.

À Professora Maria Perpétua Freitas de Azevedo por toda a sua colaboração indispensável na execução desta pesquisa.

À empresa Neodent (Curitiba, PR, Brasil), que apoiou esta pesquisa contribuindo com amostras de materiais.

À empresa Tecnodril (Novo Hamburgo, RS, Brasil), que apoiou esta pesquisa contribuindo na confecção de amostras.

Ao laboratório de prótese Portodent (Porto Alegre, RS, Brasil) que auxiliou na obtenção de amostras.

À Professora Denise Cantarelli Machado, que abriu as portas do seu laboratório no Instituto de Pesquisas Biológicas do Hospital São Lucas da PUCRS para execução desta pesquisa.

Ao Biólogo Fagner Heldt, técnico deste laboratório, pela amizade, dedicação e ensinamentos na realização dos procedimentos laboratoriais.

À Professora Maria Martha Campos, pela motivação, inspiração e ensinamentos.

Aos Professores da disciplina de Materiais Dentários desta Faculdade que me receberam e orientaram durante meu estágio docente.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação por se mostrarem sempre solícitos.

Aos colegas do mestrado pelo companheirismo e experiências compartilhadas.

“Viver é como andar de bicicleta. Para manter o equilíbrio, é preciso se manter em movimento.”

Albert Einsten

RESUMO

A escolha do material utilizado na confecção das próteses dentárias sobre implantes podem ter ligação direta com a qualidade e manutenção de tecido gengival. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de materiais protéticos dentários em cultura de fibroblastos através do teste MTT em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h. Foram confeccionadas amostras dos seguintes materiais: titânio (Ti), polietereer-cetona (PEEK), resina composta fotopolimerizável (RC) e resina acrílica autopolimerizável (RA), que foram deixados em eluição no meio de cultura D-MEM durante 24 h. Células NIH/3T3 foram semeadas em placas de 96 poços, seguido da adição do meio de cultura que esteve em contato com os materiais em teste. Para controle negativo de citotoxicidade (CN), foram utilizados poços contendo somente células e meio de cultura. Para o controle positivo de citotoxicidade (CP) as células foram submetidas à ação de hipoclorito de sódio. Os resultados foram submetidos ao cálculo de percentagem de viabilidade celular ao teste estatístico de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey ($p < 0,05$). Os resultados de percentagem de viabilidade celular em 24 h foram: CN 100%, Ti 67,52%, PEEK 65,71%, RC 44,49%, RA 49,09%, CP 4,29%. Conclusão: O Ti e o PEEK demonstraram uma evolução semelhante na nossa pesquisa, bem como a RC e a RA, sendo os piores resultados observados foram para RC em todos os tempos observados.

Palavras-chave: prótese dentária, implantes dentários, citotoxicidade, cultura de células, PEEK.

ABSTRACT

The choice of material used in the manufacture of dental prostheses on implants can be directly linked to the quality and maintenance of gingival tissue. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of dental prosthetic materials in fibroblasts in cell culture by MTT assay at 24, 48, 72 h. Samples of materials were prepared: Titanium (Ti), polietereeter-ketone (PEEK), composite resin (CR) and acrylic resin (AR) and left in contact with D-MEM for 24 h. NIH/3T3 cells was seeded in 96-well plate and added to the medium that were in contact with the test material. Wells containings only cells were used for negative control (NC) for toxicity. For positive control (PC) for toxicity cells were subjected to the action of sodium hypochlorite. The results were subjeti to calculating the percentage of cell viability and to statistical one-way anlysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test ($p < 0.05$). The results of percentage cell viability at 24 h were CN 100%, Ti 67.52%, 65.71% PEEK, RC 44.49%, RA 49.09%, CP 4.29%. Conclusion: The Ti and PEEK demonstrated a similar trend in our research, as well as the RC and RA. The worst results were observed for RC at all times observed.

Keywords: dental prosthesis, dental implants, cytotoxicity, cell culture, PEEK.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Quadro 1: Fórmula para cálculo da viabilidade celular em percentagem | 21 |
| Figura 1: Gráfico de resultados em percentagem de viabilidade | 22 |
| Figura 2: Gráfico das triplicatas | 24 |
| Figura 3: Gráfico dos resultados em 24 h | 25 |
| Figura 4: Gráfico dos resultados em 48 h | 25 |
| Figura5: Gráfico dos resultados em 72 h | 26 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Descrição dos materiais utilizados no estudo | 18 |
| Tabela 2 - Resultados em percentagem de viabilidade celular | 21 |
| Tabela 3 - Análise estatística | 23 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mm milímetros

NIH/3T3 linhagem de fibroblastos de camundongo

MTT 3-(4,5dimetil-2-tiazolil)2.5-difenil-2H-tetrazoliobrometo

TM trademark

U/mL unidades por mililitro

X vezes

n° número

CO₂ dióxido de carbono

D-MEM Dulbecco's Modified Eagle Media

ml mililitro

UV radiação ultravioleta

mg miligrama

PBS salina tamponada com fosfato

µL microlitro

nm nanômetro

USA United States of America

µg/mL micrograma por mililitro

ANOVA Análise de Variância

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 Introdução | 12 |
| 2 Objetivos | 14 |
| 2.1 Objetivo Geral | 14 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 14 |
| 3 Fundamentação Teórica | 14 |
| 3.1 Titânio | 14 |
| 3.2 Polietereter-cetona | 15 |
| 3.3 Resina Composta Fotopolimerizável | 15 |
| 3.4 Resina Acrílica Autopolimerizável | 16 |
| 3.5 Biocompatibilidade e Teste de Citotoxicidade MTT | 16 |
| 4 Materiais e Métodos | 18 |
| 4.1 Materiais | 18 |
| 4.2 Metodologia | 19 |
| 4.2.1 Cultura Celular | 19 |
| 4.2.2 Método de extração dos materiais | 19 |
| 4.2.3 Cultura para avliação da citotoxicidade | 19 |
| 4.2.4 Teste de citotoxicidade | 20 |
| 4.2.5 Cálculo da viabilidade celular | 20 |
| 4.2.6 Análise estatística | 21 |
| 5 Resultados | 21 |
| 6 Discussão | 27 |
| 7 Referencial Teórico | 30 |

1 Introdução

Quando a Implantodontia foi introduzida na Odontologia, a osseointegração era o grande alvo de atenção dos pesquisadores. O sucesso dos implantes dentários visava o contato íntimo do corpo do implante com o tecido ósseo, o que gerava estabilidade clínica frente às forças mastigatórias¹⁻². Os pacientes reabilitados com implantes dentários normalmente eram edêntulos e o objetivo maior do tratamento era a reabilitação da função fonética e mastigatória.

Com a consolidação da osseointegração, o tratamento com implantes começou a ser realizado em perdas dentárias parciais e unitárias, sendo que outras necessidades e interesses surgiram. Com isto, os critérios de sucesso se tornaram mais rigorosos em diversos aspectos, como, por exemplo, na manutenção da crista óssea e dos tecidos moles ao redor do implante. A reabsorção chamada de sausserização, considerada fisiológica, de 1,5 mm dentro no primeiro ano de função da prótese dentária, e de 0,2 mm nos anos subsequentes³ é efetiva quanto à função, porém, não supre as necessidades estéticas dos dias de hoje.

Esta perda óssea está relacionada ao desenho dos implantes, sendo a presença de um espaço entre o implante e o componente protético (*gap*) seu principal fator. Diversos desenhos de implantes foram desenvolvidos a fim de diminuir o *gap*. Esta vedação hermética do implante com o componente protético é obtida com mais sucesso em implantes com plataforma de encaixe cone Morse^{4,5,6}.

A união das peças no sistema de implantes cone Morse proporciona uma solda fria que dificulta a colonização de bactérias no interior do implante e um menor estímulo quimiotático, o que permite íntimo contato do tecido ósseo com a região do encaixe das peças.⁶⁻⁷

Contudo, implantes dentários com encaixe do tipo cone Morse respondem melhor quando levados ao nível ósseo ou intra ósseo⁶, sendo que a região protética se localiza cada vez mais subgingival, o que gera uma preocupação com a conformação das próteses e o material utilizado na confecção das mesmas. Este ficará localizado junto ao tecido ósseo ou muito próximo, sendo que uma ampla faixa de tecido mucoso estará em contato com a prótese dentária. Com isto, o comportamento dos tecidos moles frente aos implantes dentários se torna alvo de pesquisas atuais⁸⁻⁹.

Até hoje, a maioria das pesquisas em Implantodontia avaliam os materiais em relação a células ósseas, como a que acontece entre tecido ósseo e o titânio na Osseointegração. Porém, a interação do titânio, ou até mesmo de outros materiais com as células do tecido mole ainda necessita de maiores estudos. Esta interação histofisiológica entre o material e tecido é dada pela composição química e a característica de superfície dos materiais, a qual pode ser analisada pelo equilíbrio químico e crescimento celular em torno destes⁹.

Acredita-se que esta adaptação local do organismo ajudaria na manutenção dos tecidos perimplantares, e, conseqüentemente, no sucesso do tratamento em diversos parâmetros, como até mesmo a proteção da osseointegração obtida pelo vedamento entre tecidos moles e material protético.

Este trabalho tem o intuito de contribuir no avanço do conhecimento em Implantodontia, testando os materiais comumente utilizados na confecção das próteses dentárias provisórias, já que estes materiais participam de um momento crítico na fase protética, por entrarem em contato com o tecido ainda em fase de cicatrização.

Em relação à citotoxicidade de diferentes materiais testados, os dados desta pesquisa poderão influenciar na seleção dos materiais a serem utilizados na confecção das próteses sobre implantes, bem como na composição destes.

2 Objetivos

Avaliar a citotoxicidade de materiais protéticos dentários (Titânio, polietere-ter-cetona, resina composta fotopolimerizável e resina acrílica autopolimerizável) em cultura de fibroblastos da linhagem NIH-3T3, através de MTT por 24, 48 e 72 horas.

3 Fundamentação Teórica

3.1 Titânio

O Titânio é o material consolidado na Implantodontia, sendo padrão para confecção de implantes dentários e componentes protéticos dentários há mais de quarenta anos¹. Contudo, a grande maioria das pesquisas realizadas com o titânio é em relação ao seu comportamento com células ósseas.

Além disso, muitas pesquisas buscam melhorar as qualidades deste material, um processo natural na evolução da técnica e que também ocorre em função de exigências criadas pelo mercado¹⁰.

Um dos principais problemas apresentados na utilização dos implantes e componentes protéticos de titânio é sua cor cinza, que pode dificultar a estética, principalmente em casos de dentes anteriores, casos com pouca espessura óssea,

ou na presença de uma faixa gengival delgada, onde aspecto acinzentado do material transparece no local da implantação¹⁰.

Trabalhos atuais sobre citotoxicidade apresentaram resultados positivos para toxicidade com o titânio, principalmente ao compará-lo com a zircônia¹⁰⁻¹¹. Este efeito citotóxico estaria ligado a falhas na osseointegração, que apesar de se apresentarem em baixo percentual, estão sempre presentes¹¹.

3.2 Polietereeter-cetona

Um polímero chamado polietereetercetona (PEEK) vêm sendo amplamente utilizado na medicina para confecção de próteses de quadril e coluna; placas e parafusos de estabilização de fratura; também sendo utilizado para reconstrução de defeitos ósseos^{12,13}. Se trata de um material bioinerte, extremamente resistente aos testes de fadiga e com características de elasticidade muito semelhantes ao tecido ósseo¹². Pesquisadores acreditam que este material possa ser a matéria-prima capaz de substituir o titânio na confecção de implantes dentários¹⁴⁻¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷.

Atualmente, algumas empresas de implantes dentários têm comercializado este material na forma de componentes protéticos provisórios, porém, de maneira ainda muito inicial.

3.3 Resina Composta Fotopolimerizável

As resina composta fotopolimerizável (RC) é material clássico utilizado para restaurações dentárias anteriores e posteriores, que também é utilizado na

confeção de próteses, principalmente provisórias, pela facilidade de polimerização por luz, o que agiliza a execução da prótese. Além disto, as resinas de última geração possuem ótimas propriedades de polimento, fator importante na obtenção da estética. São compostas por partículas de carga de diferentes tipos em uma matriz. Esta matriz normalmente apresenta substâncias citotóxicas que já foram descritas em em estudos anteriores¹⁸⁻¹⁹.

3.4 Resina Acrílica Autopolimerizável

A resina acrílica (RA) é um material composto por polímeros, que tem sua reação de presa iniciada pela adição de um monômero. É muito utilizada em Odontologia pela sua facilidade de uso, sendo aplicada principalmente na confecção de próteses provisórias e aparelhos ortodônticos. O monômero residual da polimerização pode causar reação de contato na região aplicada, sendo por este motivo, objeto de estudo de muitas pesquisas.²⁰⁻²¹

3.5 Biocompatibilidade e Teste de Citotoxicidade MTT

A biocompatibilidade de um material pode ser definida como a capacidade do mesmo em desenvolver funções específicas sem causar danos ao organismo. O teste de citotoxicidade consiste na primeira fase de avaliação da biocompatibilidade de um material a ser utilizado no corpo humano²⁴.

Os testes *in vitro* podem não representar a situação clínica real de um material, mas introduzem resultados quanto à interação deste com o organismo,

evitando despendimento de pesquisas mais elaboradas e também de estudos que envolvam animais²⁴.

Estes testes são realizados utilizando linhagens celulares permanentes ou culturas primárias (como fibroblastos), sendo que se acredita que as culturas primárias reflitam de forma mais precisa as situações *in vivo*. As linhagens de células utilizadas para cultura são adquiridas a partir de bancos celulares ou de tecidos, como a *American Type Tissue Culture Collection* (ATCC)²⁴.

A citotoxicidade de um biomaterial pode ser investigada utilizando o ensaio de MTT, no qual é determinada a atividade mitocondrial de células vivas, sendo um teste laboratorial colorimétrico padrão para mensurar a proliferação celular, também utilizado para avaliar citotoxicidade. O sal MTT de coloração amarela (brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico) é reduzido na mitocôndria das células vivas, através da clivagem da enzima succinato desidrogenase, em cristais de formazan, de coloração púrpura. A resultante da quantidade destes cristais é diretamente proporcional ao número de células viáveis²⁵⁻²⁶⁻²⁷.

A densidade óptica resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro, sendo a viabilidade celular expressa por percentagem de células vivas do material testado versus a percentagem de células do controle negativo de citotoxicidade²⁵⁻²⁶⁻²⁷.

4. Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Os materiais testados quanto a citotoxicidade estão descritos na tabela abaixo, conforme sua origem e método de obtenção da amostra utilizada. As amostras foram confeccionadas através de uma matriz padrão medindo 3 mm de diâmetro e 2 mm de espessura.

Tabela 1: Descrição dos materiais utilizados no estudo.

| Material | Fabricante | Obtenção da amostra |
|--|--------------------------------------|---|
| Titânio (Ti) | Neodent (Curitiba, PA, Brasil) | Fresagem |
| Polietereter-cetona (PEEK) | Invibio (Lancashire, Reino Unido) | Fresagem |
| Resina composta fotoativável (RC) | Heraeus-Kulzer (Hanau, Alemanha) | Incremento e fotoativação por 20 segundos com luz led (Radii Plus, SDI) |
| Resina acrílica autopolimerizável (RA) | Yamachi Dental MGF (Gamagori, Japão) | Adição de polímero e monômero e espera de polimerização química por um minuto |

Fonte: O autor (2014)

4.2 Metodologia

4.2.1 Cultura Celular

Fibroblastos da linhagem NIH-3T3 foram obtidos da American Type Culture Collection - ATCC nº CRL-1658™ (Rockville, MD) e cultivados em meio DMEM (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 U/ml), em estufa a 37°C, em atmosfera úmida contendo 95% de oxigênio e 5% de CO₂.

O meio de cultura foi substituído a cada três dias e as passagens foram realizadas sempre que as células atingiam 70% de confluência. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com Azul de Trypan e, após a contagem, as células foram semeadas com o número de $0,5 \times 10^5$ em placas de cultura de 96 poços para a realização do teste de colorimétrico de MTT.

4.2.2 Modo de extração dos materiais

Amostras de cada material foram imersas no meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino, onde permaneceram durante 24 h, em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, sendo utilizada uma amostra de 3 mm de diâmetro e 2 mm de espessura de cada material testado para 200 µL de DMEM.

Ao serem depositados na placa, os materiais ficaram 40 minutos expostos a luz UV antes da colocação do meio de cultura, a fim de prevenir contaminações.

4.2.3 Cultura para avaliação de citotoxicidade

Triplicatas contendo 200 µl por poço de fibroblastos da linhagem NIH-3T3 na concentração de $0,5 \times 10^5$ células/ml foram cultivadas com o substrato dos

materias testados: 1) titânio, 2) PEEK 3) RC 4) RA 5) meio de cultura (controle negativo de citotoxicidade - CN) 6) hipoclorito de sódio (controle positivo para citotoxicidade - CP) e mantidos em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂ por 24, 48 e 72 horas.

4.2.4 Teste de citotoxicidade

Após os tratamentos, o meio de cultura foi removido e 10% de uma solução de MTT (5mg/ml) em PBS foi adicionado a cada poço. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C, ao abrigo da luz por 2 horas e 30 minutos. Para a solubilização dos cristais de formazan, 100 µL de dimetilssulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 570 nm, foi realizada em leitor de placas de ELISA (Bio-Rad Microplate Reader Benchmark, Inc. USA). A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao CN diminuindo valor de absorbância da parte branca da placa.

4.2.5 Cálculo da Viabilidade Celular

Os valores de absorbância (OD 570 nm) dos grupos estudados foram submetidos a equação descrita no quadro abaixo:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \frac{\text{Absorbância teste} - \text{Branco} \times 100}{\text{Absorbância CN}^* - \text{Branco}}$$

***CN: controle negativo para citotoxicidade**

Quadro 1: fórmula para cálculo da viabilidade celular em porcentagem

4.2.6 Estatística

As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste Análise de Variância (*oneway*) – ANOVA seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, através do software SPSS para windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 Resultados

O cálculo em percentagem de viabilidade celular obtida pelo teste de MTT nos diferentes grupos está demonstrado no quadro abaixo, onde o CN é o controle negativo para toxicidade (apenas células e meio de cultura sem tratamento) que é utilizado como padrão de referência, sendo considerado o poço com 100% de viabilidade celular; Ti = Titânio, PEEK = políeter-etercetona, RC = resina composta fotopolimerizável, RA = resina acrílica autopolimerizável.

Tabela 2: Resultado em percentagem de viabilidade celular

| | CN | Ti | PEEK | RC | RA | CP |
|------------|------|--------|--------|--------|--------|-------|
| 24h | 100% | 67,52% | 65,71% | 44,49% | 49,09% | 4,29% |
| 48h | 100% | 52,45% | 49,10% | 41,41% | 49,28% | 4,28% |
| 72h | 100% | 37,39% | 42,65% | 18,05% | 32,13% | 4,44% |

Fonte: O autor (2014)

Podemos observar que a RC esteve abaixo dos outros materiais, demonstrando mais citotoxicidade, nos três tempos avaliados. Observe a representação gráfica destes valores na figura abaixo:

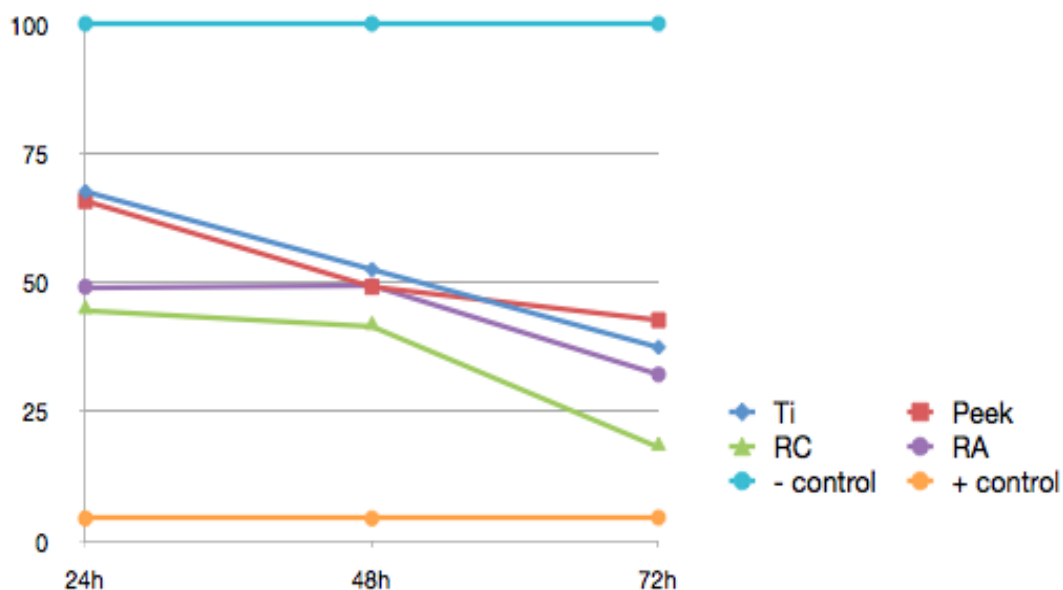


Figura 1: Gráfico de resultados em porcentagem de viabilidade celular

Fonte: Autor (2014)

Para comparação dos grupos nos três tempos e dentro dos tempos entre os mesmos, as triplicatas de cada grupo foram comparadas pelo teste ANOVA seguido de TuKey no software SPSS. As médias dos resultados em cada tempo e análise estatística foram representadas por letras. A comparação dos resultados do próprio material por ele mesmo nos diferentes tempos está representada pela letra maiúscula, como para o e titânio (Ti) que mostrou aumentar a citotoxicidade com o aumento do tempo de observação. Já a diferença dos materiais num mesmo momento de análise está representada por letras minúsculas e podemos observar

que todos os materiais testados demonstraram diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle positivo para toxicidade (CP = hipoclorito de sódio).

Tabela 3: Resultados estatísticos

| | CN | Ti | PEEK | RA | RC | CP |
|-----|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 24h | 2,49 A a (0,173) | 1.80 A b (0,141) | 1.71 A b (0,143) | 1,28 A c (0,098) | 1.14 A c (0,080) | 0.15 A d (0,021) |
| 48h | 2,64 A a (0,176) | 1.43 B b (0,062) | 1.37 B b (0,047) | 1,35 A b (0,095) | 1.14 A b (0,047) | 0.13 A c (0,032) |
| 72h | 2,53 A a (0,094) | 0.78 C bc (0,213) | 1.09 B b (0,046) | 0,78 B bc (0,024) | 0.47 B c (0,085) | 0.11 A d (0,003) |

Fonte: O autor (2014)

*Médias

seguidas por letra maíuscula distinta na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

**Médias seguidas por letra minúscula distinta na linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

() Desvio-padrão

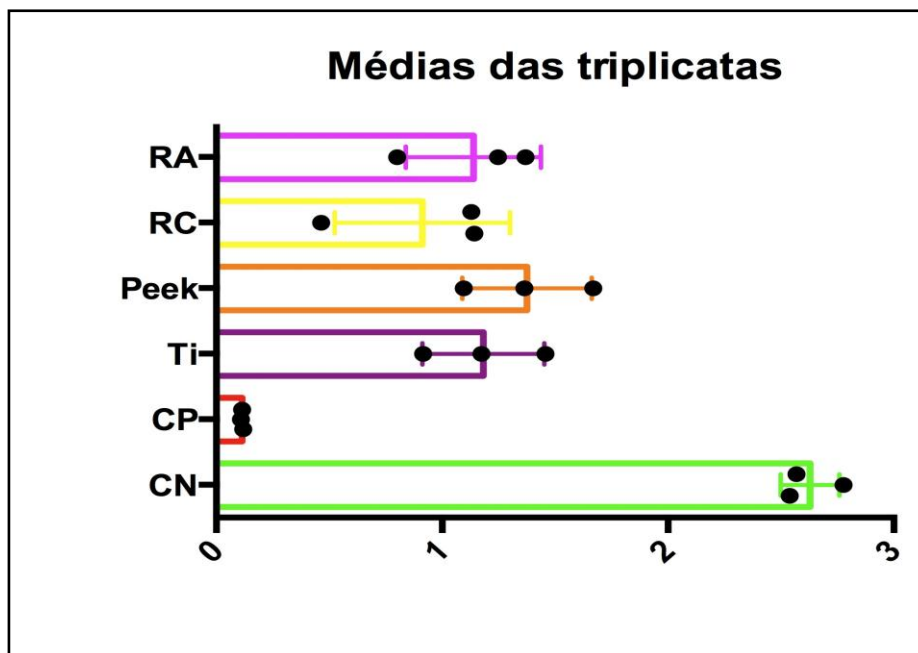


Figura 2: Gráfico média das triplicatas

Fonte: O autor (2014)

Nas figuras a seguir (3,4 e 5), a triplicata de cada grupo está representada nos diferentes tempos analisados, para uma comparação entre os grupos dentro de um mesmo tempo, sendo CN a leitura de viabilidade celular máxima obtida no poço de cultura.

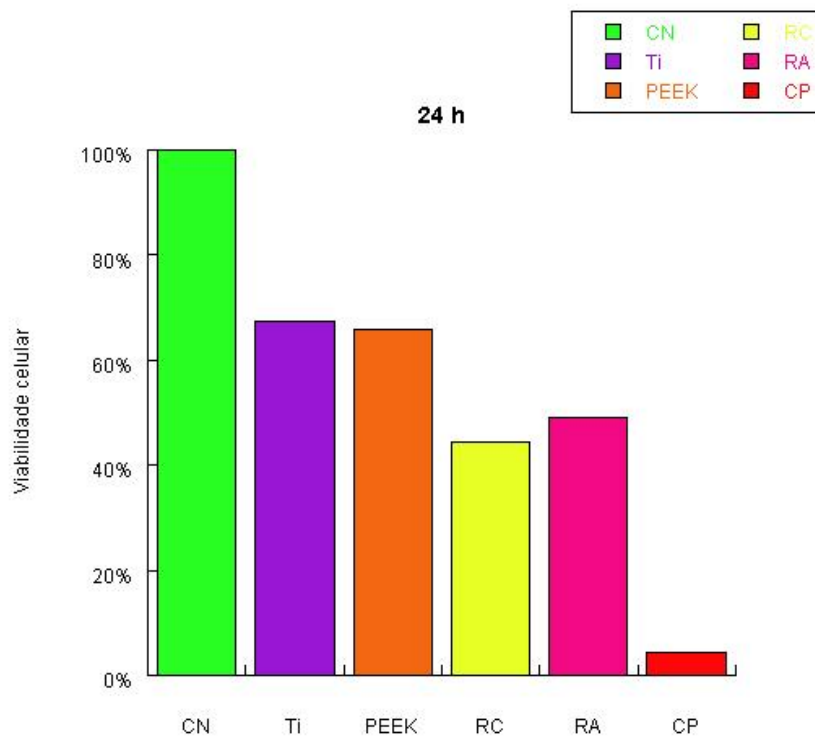


Figura 3: Gráfico dos resultados em 24 h. Fonte: O Autor (2014)

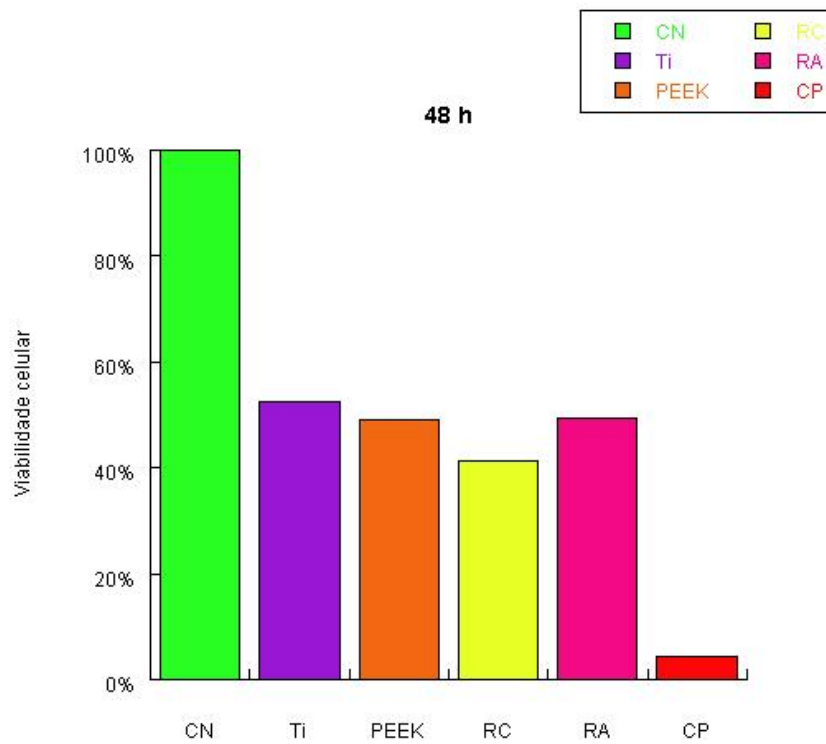


Figura 4: Gráfico dos resultados em 48 h. Fonte: O autor (2014)

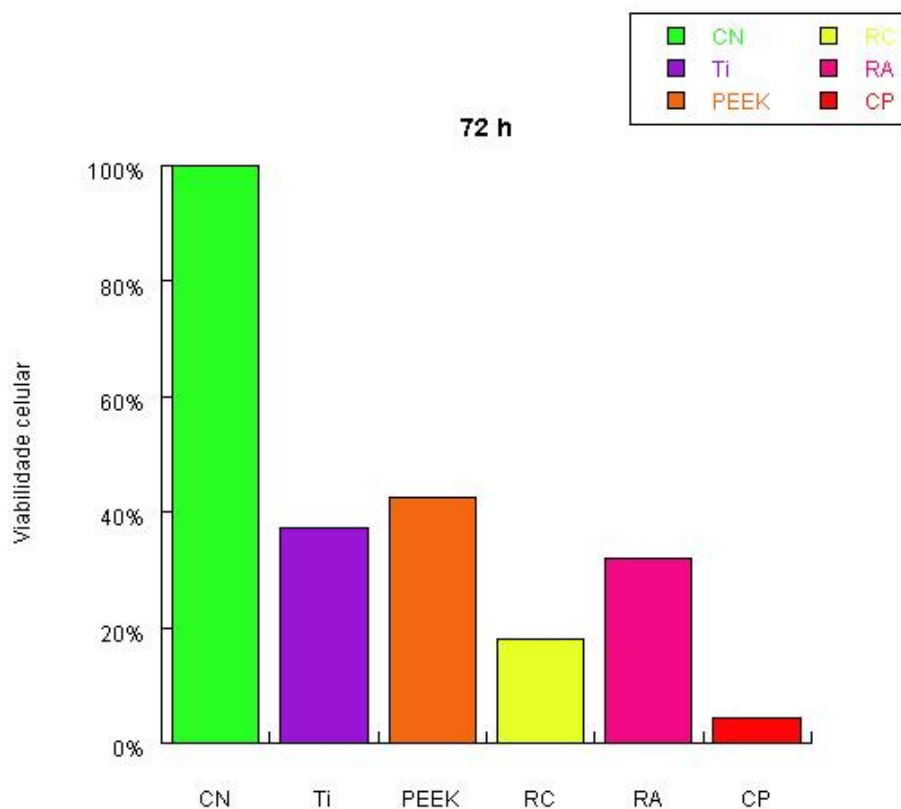


Figura 5: Gráfico dos resultados em 72 h. Fonte: O autor (2014)

Foi observado que o material que se manteve mais estável nos seus resultados nos diferentes tempos de avaliação foi o PEEK, que demonstrou melhor resultado que o Ti em 72h. Na figura a seguir temos a representação gráfica dos resultados em cada um dos tempos observados, para uma melhor comparação entre os materiais.

6 Discussão

O teste de MTT é um método suficientemente rápido para avaliar um grande número de biomateriais com potencialidade no uso clínico, sendo considerado um teste bastante confiável. A citotoxicidade pode ser avaliada utilizando diferentes tipos de células no ensaio MTT, sendo que a escolha de fibroblastos da linhagem NHI-3T3 representa um tipo celular pré-estabelecido no estudo da citotoxicidade dos materiais e que também vai de encontro com as células dos tecidos gengivais.¹⁹

Uma variabilidade menor de tempo foi determinada a fim de não destorcer os resultados, já que após a fase *PLATEAU* da cultura celular, que é caracterizada por grande formação de células, segue-se uma redução da velocidade de crescimento, onde o número de células mortas tende a ser equivalente ao número de células novas, que é seguida da fase de morte celular.²⁸

Podemos observar que nos resultados de 72 horas, mesmo os poços onde havia somente células (CN), houve uma redução do número de células. Portanto, estima-se que a opção de análise em um tempo maior que 72 horas exigiria a de troca de meio para fornecer nutrientes para células e condições de viabilidade, sendo que não teríamos como dizer se as células sobreviveriam em função da troca do meio ou por biocompatibilidade do material.

Também observamos que o fato colocar um material por determinado tempo em contato com o meio de cultura que fornecerá os nutrientes para viabilidade celular, provavelmente já é um fator de inibidor de crescimento, sendo que o meio de cultura que foi por menos tempo manipulado e que não tenha sofrido qualquer exposição proporcionaria um desenvolvimento mais adequado das células. Isto justifica que o PEEK e o titânio, materiais considerados bioinertes, obtiveram

resultados com diferença significativa na comparação com o controle negativo para citotoxicidade.

Pode-se observar também que dentre os materiais testados, o PEEK foi o material que demonstrou uma menor variação entre os tempos, podendo se dizer que apesar do material causar diminuição na viabilidade celular na cultura, esta não foi progressiva, o que pode ser visto como um indicativo de estabilidade do material.

Sabe-se que os materiais metálicos sofrem corrosão que liberam íons e estas substâncias causam efeitos adversos locais ou sistêmicos^{29,30}. Estudos anteriores como o de Finet et al³¹ já identificaram partículas de titânio espalhadas pelo organismo de pacientes implantados, como cérebro, cabelo, pele e trato gastrointestinal.

O fato é que o titânio utilizado para confecção dos implantes é uma liga que contém Alumínio e Vanádio para obter propriedades mecânicas adequadas. Estes metais, incluindo o Titânio, segundo pesquisa anteriores, podem afetar a função, proliferação e síntese celular³¹⁻³².

Os resultados encontrados nesta pesquisa em relação as resinas compostas estão de acordo com outros estudos prévios. Segundo Moharamzadeh et al¹⁹ substâncias presentes nas resinas compostas podem ser uma ameaça para os tecidos adjacentes a restaurações. Segundo eles, a substância presente nas resinas com maior potencial citotóxico é TEGDMA, presente em maior quantidade nas resinas fluidas.

Segundo o estudo de Retamoso³³ o uso da luz *led* para fotopolimerização ao invés da luz alógena influencia positivamente na redução da toxicidade deste material.

Em relação as resinas acrílicas, o estudo de Gonçalves et al²⁰ obteve resultados semelhantes a os da nossa pesquisa. O estudo referido avaliou diversas marcas comerciais de resinas acrílicas quanto à citotoxicidade em cultura celular nos tempos de 24, 48 h, e os materiais foram deixados em eluição por 24 e 48 h. Os pesquisadores observaram que no tempo de eluição de 48 h os materiais se mostraram menos citotóxicos. Este efeito ocorre em função da lixiviação dos compostos após a reação de presa do material. Um maior tempo de eluição tende a diminuir os efeitos tóxicos do material²⁰.

Portanto, como sugerido no estudo de Jorge et al²¹, a possibilidade de deixar este a prótese confeccionada com resina acrílica imersa em água por 24 h após sua reação de presa antes de realizar a instalação em boca diminuiria significamente os efeitos citotóxicos. Em nosso estudo o tempo de eluição foi único (24h), porém o tempo de contato com as células foram três: 24, 48 e 72 h. Em 72 h a resina acrílica apresentou resultados semelhantes ao PEEK, que em 72 h apresentou-se menos citotóxico.

É fato que o uso destes materiais se torna indispensável na prática protética, pela necessidade de realizar próteses temporárias, principalmente quando se trata de casos sobre implantes dentários, onde é preciso aguardar o período de cicatrização para realização da prótese final. Em nosso estudo a resina acrílica (RA) obteve melhores resultados em comparação com a resina composta (RC), apesar destes resultados não serem estatisticamente significativos.

Estes materiais exercem um importante papel na realização da conformação dos tecidos moles, particularmente em casos de regiões estéticas. Portanto, a interação deste material com o tecido gengival é de suma importância e devemos levar em consideração a composição dos materiais a serem utilizados.

7 Referencial Teórico

1. Albrektsson T. Direct bone anchorage of dental implants. *J Prosthet Dent* 1983 Aug; 50(2):255-61.
2. Albrektsson T. et al. The interface zone of inorganic implants in vivo: titanium implant in bone. *Annals of Biochemical Engineering* 1983 v. 11. p. 1-27.
3. Quirynen M, Bollen CM, Eyssen H, Van Steenberghe D. Microbial penetration along the implant components of the Brånemark system. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res.* 1994 Dec; 5(4):239-44.
4. Abrahamsson I, Berglundh T, Lindhe J. The mucosal barrier following abutment dis/reconnection. An experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 1997 Aug; 24(8):568-72.
5. Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997 Jul-Aug;12(4):527-40. Erratum in: *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997 Sep-Oct;12(5):709.
6. Dibart S, Warbington M, Su MF, Skobe Z. In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005 Sep-Oct;20(5):732-7.
7. Brogini N. Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface. *J Dent Res.* 2003;82(03):232-237.

8. Rompen E, Domken O, Degidi M, Pontes AE, Piattelli A. The effect of material characteristics, of surface topography and of implant components and connections on soft tissue integration: a literature review. *Clin Oral Implants Res.* 2006 Oct;17 Suppl 2:55-67.
9. Freitas MP, Oshima HM, Menezes LM, Machado DC, Viezzer C. Cytotoxicity of silver solder employed in orthodontics. *Angle Orthod.* 2009 Sep;79(5):939-44.
10. Depprich R et al. Osseointegration of zirconia implants: an SEM observation of the bone-implant interface. *Head & Face Medicine* 2008, 4:25.
11. Depprich R et al. Behavior of osteoblastic cells cultured on titanium and structured zirconia surfaces. *Head & Face Medicine* 2008, 4:29.
12. Quaresma SE, Cury PR, Sendyk WR, Sendyk C. A finite element analysis of two different dental implants: stress distribution in the prosthesis, abutment, implant, and supporting bone. *J Oral Implantol.* 2008;34(1):1-6.
13. Nentwig, GH. NM-system. Concept of an implant solution. *Niedersachs Zahnarztl.* 1991 Nov;26(11):658-62.
14. Brien, D. Response of primary fibroblasts and osteoblasts to plasma treated polyetheretherketone (PEEK) surfaces. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 2005 (16) 671-677.
15. Knebel M. Titanium in Difficulties - PEEK. *Kunststoffe international* 2/2010.
16. Kim DM et al. PEEK dental implants: A Review of the Literature. *J Oral Implantol.* 2011 Sep 9.

17. Sarot JR, Contar CM, Cruz AC, de Souza Magini R. Evaluation of the stress distribution in CFR-PEEK dental implants by the three-dimensional finite element method. *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Jul;21(7):2079-85.
18. Shehata M, Durner J, Eldenez A, Van Landuyt K, Styllou P, Rothmund L, Hickel R, Scherthan H, Geurtsen W, Kaina B, Carell T, Reichl FX. Cytotoxicity and induction of DNA double-strand breaks by components leached from dental composites in primary human gingival fibroblasts. *Dent Mater*. 2013 Sep;29(9):971-9.
19. Moharamzadeha K, Van Noort R, Brooka IA, Scuttb A M. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dental materials* 2007 (23) 40–44.
20. Gonçalves TS, de Menezes LM, Silva LE. Residual monomer of autopolymerized acrylic resin according to different manipulation and polishing methods. An in situ evaluation. *Angle Orthod*. 2008 Jul 78(4): 722-7.
21. Jorge JH, Giampaolo ET, Machado AL, Vergani CE. Cytotoxicity of denture base acrylic resins: a literature review. *J Prosthet Dent*. 2003 Agu 90 (2):190-3.
22. Terhune WF, Sydiskis RJ, Davidson WM. In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding materials. *American Journal of Orthodontics* 1983 June 83 (6): 501–506.
24. Chai WL, Moharamzadeh K, Van Noort R, Emanuelsson L, Palmquist, Brook IM. Development of a Novel Model for the Investigation of Implant–Soft Tissue Interface. *Periodontol* August 2010 81(8).
25. ISO document 10993-1:2003, Biological evaluation of medical devices, Part 1, Guidance on selection of tests.

26. ISO document 10993-5:1999, Biological evaluation of medical devices, Part 5, Test for cytotoxicity: in vitro methods.
27. ISO document 10993-12:2007, Biological evaluation of medical devices, Part 12, Sample preparation and reference materials.
28. Spangberg LS. Correlation of in vivo and in vitro screening tests. J Endod. 1978;4(10):296-9.
29. Retamoso LB, Luz TB, Marinowic DR, Machado DC, De Menezes LM, Freitas MP, Oshima HM. Cytotoxicity of esthetic, metallic, and nickel-free orthodontic brackets: cellular behavior and viability. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2012 Jul;142(1):70-4.
30. Finet B, Weber G, Cloots R. Titanium release from dental Implants: an in vitro study on sheep. Mater Letters, London, v. 43, p. 159-165, 2000.
31. Woodman JL, Jacobs JJ, Galante JO, Urban RM. Metal ion release from titanium-based prosthetic segmental replacements of long bones in baboons: a long-term study. J. Orthop. Res., Hoboken, v. 1, p. 421-430, 1984.
32. Freitas MP, Oshima HM, Menezes LM. Release of toxic ions from silver solder used in orthodontics: an in-situ evaluation. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2011 Aug;140(2):177-81.
33. Retamoso LB. Avaliação da citotoxicidade, liberação de monômero residual, sorção e solubilidade em água de resinas compostas. Orientador: Prof. Dr. Hugo Mitsuo Silva Oshima. Porto Alegre, PUCRS, Faculdade de Odontologia - Tese (Doutorado em Materiais Dentários), 2011.