

ALINHADORES ORTODÔNTICOS EM DIFERENTES COMPOSIÇÕES: EXISTE DIFERENÇA NA TOXICIDADE?

Data de submissão: 12/04/2024

Data de aceite: 02/05/2024

Maria Perpétua Mota Freitas

Universidade Luterana do Brasil,
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, Curso de Odontologia,
Professora Adjunta
Canoas – RS
<http://lattes.cnpq.br/4016032073425939>

Monique Fonini Trevisan

Universidade Luterana do Brasil,
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, Curso de Odontologia,
Doutoranda
Canoas – RS
<http://lattes.cnpq.br/0285681267271786>

Luiz Makito Osawa Gutierrez

Universidade Luterana do Brasil,
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, Curso de Odontologia,
Doutorando
Canoas – RS
<http://lattes.cnpq.br/2711072063704099>

Denise Cantarelli Machado

Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul, Instituto de Pesquisas
Biomédicas, Hospital Universitário,
Coordenadora
Porto Alegre – RS
<http://lattes.cnpq.br/3647042041612695>

RESUMO: Esse estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade “in vitro” dos alinhadores ortodônticos, comparando diferentes composições e tempos de exposição. Para tanto, foram avaliados 100 amostras, com dimensões de 5x5mm, divididos em 2 grupos experimentais (n=50, cada), de acordo com as composições (Poliuretano - *Invisalign®*; PET-G - *Clear Aligner®*). A viabilidade celular foi analisada através do teste com MTT, nos tempos de 24h, 48h, 72h, 7 e 14 dias. Como controle negativo - C(-) foi utilizado o crescimento celular e controle positivo - C(+), o hipoclorito de sódio a 1%. Os dados foram analisados utilizando os testes estatísticos de ANOVA, para comparação entre os grupos, e não-paramétrico de Friedman, para a comparação entre os tempos, ambos com $p \leq 0,05$. Pode-se observar que, até as 72h, ambos os grupos diferiram estatisticamente do controle negativo, sugerindo influência negativa sobre a viabilidade celular, com diferença entre as composições avaliadas. Após 7 dias, houve uma redução significativa na média de viabilidade celular para o grupo Poliuretano - *Invisalign®*, sendo diferente das 72h, enquanto os valores para o grupo PET G - *Clear Aligner®* aumentaram, chegando a semelhança estatística com o

C(-) ($p > 0,05$) até os 14 dias. Pode-se concluir que os alinhadores ortodônticos, independente da sua composição, reduziram a viabilidade celular dos fibroblastos até 72h. Após esse período, apenas aqueles a base de poliuretano mantiveram esse comportamento, atingindo o pico de toxicidade aos 7 dias, com regressão no período posterior.

PALAVRAS-CHAVE: alinhadores, ortodontia, citotoxicidade, polímeros termoplásticos, aparelhos ortodônticos removíveis.

ORTHODONTIC ALIGNERS IN DIFFERENT COMPOSITIONS: IS THERE A DIFFERENCE IN TOXICITY?

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the in vitro cytotoxicity of orthodontic aligners, comparing different compositions and times of exposure. For this purpose, 100 specimens with dimensions of 5x5mm, divided into 2 experimental groups ($n = 50$, each) according to the compositions (Polyurethane - Invisalign®; PET-G - Clear Aligner®). Cell viability was analyzed by the MTT test at 24h, 48h, 72h, 7 and 14 days. As negative control was used cell growth and positive control, sodium hypochlorite 1%. Data were analyzed using ANOVA for comparison between groups, and non-parametric Friedman for comparison between the times, both with $p \leq 0.05$. It can be observed that up to 72h, both groups differed statistically from the negative control, suggesting influence on cellular viability, with difference between the evaluated compositions. After 7 days, there was a significant reduction in mean cell viability for the polyurethane group - Invisalign®, being different from 72h, while the values for the PET G group - Clear Aligner® - increased, reaching statistical similarity with negative control ($p > 0.05$) for up to 14 days. It can be concluded that orthodontic aligners, regardless of their composition, reduced cell viability of fibroblasts by up to 72 hours. After this period, only those with polyurethane base maintained this behavior, reaching the peak of toxicity at 7 days, with regression in the posterior period.

KEYWORDS: aligners, orthodontics, cytotoxicity, thermoplastic polymers, removable orthodontic appliances.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido a procura por tratamentos ortodônticos com alinhadores (GALAN-LOPEZ *et al.*, 2019). Essa modalidade de tratamento tem se popularizado pelo grande apelo estético, pelo conforto e pela praticidade. Os alinhadores ortodônticos são placas termoplásticas que tem como função à movimentação dentária (ROSSINI *et al.*, 2015).

Existem no mercado uma grande variedade de marcas de alinhadores. A sua composição pode variar de uma marca a outra, porque diversos polímeros são utilizados em sua fabricação: cloreto de polivinil, poliuretano (PU), polietileno tereftalato (PET) e polietileno tereftalato glicol (PET-G) (PITHON, 2012; ERCOLI *et al.*, 2015; AHN *et al.*, 2015). Embora diferentes, são todos polímeros à base de bisfenol A (BPA) (SABOUR *et al.*, 2021). O BPA e seus derivados conferem alta transparência, elevada resistência térmica e mecânica aos alinhadores (FRANCISCO *et al.*, 2022).

O processo de manufatura na produção dos alinhadores pode também variar de uma marca a outra. Os alinhadores podem ser confeccionados sob alta pressão ou à vácuo (ERCOLI *et al.*, 2015; AHN *et al.*, 2015). Essa diferença parece influenciar não só na adaptação e geração de força do aparelho, mas também no processo de degradação e corrosão do material (PITHON, 2012).

O uso corrente e indiscriminado de materiais a base de BPA é, no entanto, motivo de preocupação da comunidade internacional (COLORADO-YOHAR *et al.*, 2021). Diversas agências regulatórias têm impostas restrições e até proibições ao BPA no que toca a questões ambientais e sanitárias (CDC, 2009; ANVISA, 2012; GUNDERT-REMY *et al.*, 2017).

Existem evidências que a exposição prolongada, a degradação e corrosão de materiais a base de BPA traz riscos a médio e longo prazo à saúde (CDC, 2009; GUNDERT-REMY *et al.*, 2017). Resultados preliminares apontam que o BPA pode estar associada a infertilidade, câncer de próstata, câncer de mama, má formação fetal e uma série de alterações relacionadas a desregulação do sistema neuroendócrino (KLOUKOS *et al.*, 2013).

Embora os alinhadores ortodônticos sejam amplamente utilizados, existem reservas quanto à citotoxicidade e quanto ao potencial tóxico e/ou irritante aos tecidos da cavidade bucal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade “in vitro” dos alinhadores ortodônticos, comparando diferentes composições e tempos de exposição.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido no laboratório de Biologia e Fisiologia Respiratória do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). O presente trabalho foi aprovado pelo Comissão Científica e de Ética da PUCRS sob número 0071/09.

A amostra foi composta por 100 alinhadores ortodônticos, dimensão 5x5mm, compondo 2 grupos experimentais (n=50), de 5 diferentes lotes das seguintes marcas comerciais: *Clear Aligner*[®] (Iserlohn, Alemanha) e *Invisalign*[®] (San Jose, Califórnia, EUA), conforme Quadro 1.

	MARCA	COMPOSIÇÃO	LOTE	n
Grupo 1 – Controle negativo C (-)	Sem exposição	-	-	10
Grupo 2 - <i>Clear Aligner</i> [®]	<i>Clear Aligner</i> [®]	Copoliéster de polietileno tereftalato-glicol (PET-G)	1-5	50
Grupo 3 - <i>Invisalign</i> [®]	<i>Invisalign</i> [®]	Poliuretano Termoplástico (PU)	1-5	50
Grupo 4 - Controle positivo C (+)	hipoclorito de sódio a 1%	-	-	10

Quadro 1: Grupos experimentais com características das amostras avaliadas.

Dois grupos controles foram avaliados: um grupo controle negativo C(-), sem exposição e um grupo controle positivo C (+), exposto a uma solução aquosa de hipoclorito de sódio 1%. Os grupos foram testados em 5 diferentes tempos: T1- 24 horas, T2 – 48 horas, T3 – 72 horas, T4- 7 dias e T5- 14 dias.

Cultura de células e teste de viabilidade celular

O teste de citotoxicidade foi realizado segundo a normativa ISO 10993-5. A viabilidade celular foi avaliada através de teste colorimétrico do Metiltetrazolium (MTT), com a linhagem NIH/3T3 (RETAMOSO *et al.*, 2012), a qual é estruturalmente semelhante as células da lâmina própria da mucosa oral.

Fibroblastos de camundongo da linhagem NIH/3T3 (ATCC®) foram manipulados no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da PUCRS. Eles foram descongelados e cultivados em meio de cultura D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Media; Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 50µg/mL de gentamicina (D-MEM completo), em garrafas de cultura (TPP®, Zollstrasse, Suíça) e incubadas a uma temperatura de 37°C em estufa umidificada contendo 5% de CO₂, sendo o meio trocado duas vezes por semana, até que as células atingissem a confluência de 80%. Após a confluência, as células foram removidas por ação enzimática, Tripsina-EDTA 0,1% (Gibco® – Invitrogen Corporation, Grand Island, EUA) e contadas em Câmara de Neubauer (Optik Labor, EUA). A suspensão celular foi adicionada sobre as placas de 96 poços, em 200µL com densidade de 10⁵ células por poço.

Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e foi realizado, então o tratamento das culturas através da adição de 200µL de meio de cultura contendo o eluído das amostras, e a placa foi mantida por 24, 48, 72 h, 7 e 14 dias em incubadora com 100% de umidade a 37°C, com 5% de CO₂ e 95% de ar. Para avaliar a influência da degradação na citotoxicidade, os materiais sem o processo corrosivo também foram analisados.

Decorridos os tempos experimentais, foi realizada a análise do metabolismo celular, por meio da quantificação da atividade da enzima desidrogenase succínica (SDH), a qual representa a taxa de respiração mitocondrial das células, usando, para isto, o teste colorimétrico de MM (RETAMOSO *et al.*, 2012). Para atingir este objetivo, os extratos foram descartados e substituídos por 200µL da solução de brometo de 3(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), (Sigma-Aldrich Brasil LTDA, São Paulo – SP – Brasil), diluído a 0,5% em D-MEM sem suplementação. Após 2 horas e 30 minutos de incubação das culturas com a solução de MTT, a solução foi descartada, sendo então aplicado 100µL de dimetilsulfóxido para solubilizar os cristais de *formazan* de coloração azul/violeta, formados pela clivagem dos anéis de tetrazolium pela enzima SDH das mitocôndrias ativas.

A viabilidade celular (VB) foi dessa forma avaliada por espectrofotometria no Leitor Universal de ELISA (Bio-Rad Laboratories, Inc, Califórnia, CA, USA), em um comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem média da absorbância dos poços em triplicata dos diferentes tratamentos, inclusive dos controles e do branco. Em seguida, subtraiu-se a média da absorbância da triplicata dos poços em Branco de todas as médias dos testes, inclusive dos controles. O valor obtido pela subtração da média dos brancos em relação a média do Controle Negativo (onde não foi adicionado nenhum tratamento, contendo somente células e meio de cultura D-MEM suplementado) deve ser considerado como mínimo de 100% de células viáveis (VB Grupo Controle).

A viabilidade celular dos materiais foi então obtida através da seguinte fórmula:

$$\text{Citotoxicidade} = \frac{\text{VB Grupo Experimental}}{\text{VB Grupo Controle}} \times 100$$

Para determinação da citotoxicidade, a viabilidade celular foi classificada de acordo com AHARARI *et al.* (2013), seguindo a quantificação abaixo descrita:

- Mais do que 90% de células viáveis – sem citotoxicidade;
- 60–90% de células viáveis – citotoxicidade leve;
- 30–59% de células viáveis – citotoxicidade moderada;
- Menos de 30% de células viáveis – citotoxicidade severa.

Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o software SPSS versão 22.0 (IBM, New York, EUA), por meio dos testes estatísticos de Análise de Variância (ANOVA), para comparação entre os grupos, bem como não-paramétrico de Friedman, para a comparação entre os tempos, ambos com nível de significância máximo de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Com base nos resultados obtidos, a viabilidade celular entre os grupos PET-G - *Clear Aligner®* e PU - *Invisalign®* diferiram estatisticamente quando comparados ao grupo controle C (-) em T1, T2, T3, T4 e T5. A diferença na viabilidade celular entre os tempos para cada grupo foi também estatisticamente significativa. (Tabela 1 e 2).

Tempo	Grupo	Média	DP	p	Grau de Citotoxicidade
Tempo 24hs	<i>PU - Invisalign®</i>	109 ^A	16	0,000**	Não citotóxico
	<i>PET – G - Clear Aligner®</i>	111 ^A	12		Não citotóxico
	Controle Negativo	153 ^B	7		Não citotóxico
	Controle Positivo	6 ^C	0,00		Severa
Tempo 48hs	<i>PU - Invisalign®</i>	128 ^A	6	0,000**	Não citotóxico
	<i>PET – G - Clear Aligner®</i>	120 ^B	11		Não citotóxico
	Controle Negativo	146 ^C	1		Não citotóxico
	Controle Positivo	7 ^D	0,00		Severa
Tempo 72hs	<i>PU - Invisalign®</i>	102 ^A	6	0,000**	Não citotóxico
	<i>PET – G - Clear Aligner®</i>	95 ^A	9		Não citotóxico
	Controle Negativo	155 ^B	2		Não citotóxico
	Controle Positivo	9 ^C	2		Severa
Tempo 7 dias	<i>PU - Invisalign®</i>	36 ^A	13	0,000**	Moderada
	<i>PET – G - Clear Aligner®</i>	97 ^B	56		Não citotóxico
	Controle Negativo	151 ^B	27		Não citotóxico
	Controle Positivo	29 ^C	44		Severa
Tempo 14 dias	<i>PU - Invisalign®</i>	93 ^A	8	0,000**	Não citotóxico
	<i>PET – G - Clear Aligner®</i>	101 ^B	7		Não citotóxico
	Controle Negativo	120 ^B	0,00		Não citotóxico
	Controle Positivo	9 ^C	1		Severa

DP – desvio-padrão

**significativo $p \leq 0,01$

Tabela 1. Comparação das médias de viabilidade celular entre os grupos para cada tempo.

Tempos	<i>PU - Invisalign®</i>			<i>PET G - Clear Aligner®</i>		
	Média	DP	p	Média	DP	p
24h	109 ^A	6,5	0,001**	111 ^A	4,3	0,009**
48h	128 ^B	2,3		120 ^B	4,4	
72h	102 ^C	3,0		95 ^C	6,4	
7 dias	36 ^D	11,9		97 ^{AC}	18,4	
14 dias	93 ^C	7,5		101 ^C	5,7	

DP – desvio-padrão

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si

**significativo $p \leq 0,01$

Tabela 2. Comparação médias de viabilidade celular entre os tempos para cada grupo.

DISCUSSÃO

O conhecimento sobre a biocompatibilidade dos materiais ortodônticos em uso faz se imprescindível para garantir a segurança dos pacientes na rotina clínica. Apesar de existirem diversas pesquisas acerca da biocompatibilidade dos materiais ortodônticos (DE ANDRADE *et al.*, 2010), poucos estão relacionados aos alinhadores.

No presente trabalho a composição dos alinhadores ortodônticos e o tempo de exposição influenciaram negativamente a viabilidade celular em todos os tempos avaliados.

Os alinhadores investigados no presente trabalho apresentaram diferentes composições e formas de produção: *Clear Aligner®* - Copoliéster de polietilenoentereftalato-glicol (PET-G) - produção a vácuo; *Invisalign®* - Poliuretano (PU) - produção sob alta pressão. Segundo Sabour *et al.* 2021, a composição química dos materiais poliméricos tem influência direta na liberação de resíduos como, por exemplo, cianetos e BPA. Do nosso conhecimento, não existem relatos na literatura sobre trabalhos que comparam alinhadores ortodônticos com diferentes composições.

No presente trabalho, a redução da viabilidade celular encontrada a curto e à médio prazo pode ser justificada em consequência da lixiviação e absorção de água dos alinhadores avaliados. Esses resíduos, mesmo em pequenas quantidades, podem levar a uma hipersensibilidade dos tecidos com conseqüente toxicidade (FRANCISCO *et al.* 2022).

Os alinhadores PU - *Invisalign®* avaliados, no presente trabalho, apresentaram toxicidade moderada após 7 dias, uma vez que somente 30 a 59 % das células avaliadas mantiveram-se viáveis. Para RYOKAWA *et al.*, 2006PE (CopyplastPE (Copyplast, os alinhadores ortodônticos a base de PU absorvem maiores quantidades de água após 24 e 36 horas e, conseqüentemente, apresentam uma maior taxa de lixiviação dos componentes não polimerizados. Isso pode justificar os resultados encontrados. Da mesma forma, PREMARAJ *et al.*, 2014 relataram que a exposição aos alinhadores *Invisalign®* em uma solução salina causou alterações na viabilidade, permeabilidade e adesão de células epiteliais quando avaliadas em um período de 2 a 8 semanas.

ELIADES *et al.*, 2009 encontraram, no entanto, resultados diferentes quando avaliaram os efeitos citotóxicos dos alinhadores *Invisalign®* para fibroblastos gengivais. Os autores concluíram que os alinhadores avaliados não tiveram efeitos negativos sobre as células testadas após imersão em solução salina por 2 meses.

A diferença entre os resultados pode ser atribuída ao tempo total de imersão, uma vez que é de se esperar que passados 2 meses uma menor taxa de lixiviação e de resíduos pode ser encontrada. Isso reflete os resultados encontrados no presente trabalho para o último tempo avaliado. Após 14 dias, os alinhadores avaliados apresentaram um aumento na média de viabilidade celular, principalmente para o grupo PU - *Invisalign®*. Apesar desse aumento, continuaram apresentando média de viabilidade celular estatisticamente diferente do controle negativo.

Esses resultados reforçam a importância de estudos a curto e à médio prazo sobre a liberação de resíduos poliméricos em contato com tecidos humanos. Isto é um dado preocupante quando se trata de cavidade bucal, tendo em vista que todo componente liberado pode ser absorvido pela mucosa ou deglutido, o que pode trazer consequências ao sistema digestivo, urinário ou circulatório (RAGHAVAN *et al.*, 2019).

O presente trabalho apresenta algumas limitações. Mesmo seguindo as recomendações metodológicas dadas pela *International Standard Organization* (ISO), como primeira escolha para avaliar a biocompatibilidade dos materiais biomédicos. Os resultados do presente trabalho não podem ser extrapolados, tendo em vista o caráter laboratorial. No entanto os resultados apresentados não devem ser subestimados, mas, sim, servir de estímulo para novos ensaios clínicos.

CONCLUSÕES

Os alinhadores ortodônticos avaliados, independente da sua composição, reduziram a viabilidade celular dos fibroblastos até 72h. Após esse período, apenas os alinhadores da Invisalign® mantiveram esse comportamento, atingindo o pico de toxicidade aos 7 dias.

REFERÊNCIAS

GALAN-LOPEZ L, BARCIA-GONZALEZ J, PLASENCIA E. A systematic review of the accuracy and efficiency of dental movements with invisalign®. **Korean J Orthod.** v.49, n.3, p.140-149, 2019.

ROSSINI, G.; PARRINI, S.; CASTROFLORIO, T.; DEREGIBUS, A.; DEBERNARDI, C.L. Efficacy of clear aligners in controlling orthodontic tooth movement: A systematic review. **Angle Orthod.** v.85, n.5:881-889, 2015.

PITHON, M.M.. A modified Thermoplastic Retainer. **Prog Orthod.** v.13, n.2, p.195-199, 2012.

ERCOLI, F.; TEPEDINO, M.; PARZIALE, V.; LUZI, C. A comparative study of two different clear aligner systems. **Prog Orthod.** v.15, n.1, p.2-6, 2014.

AHN, H.W.; HA, H.R.; LIM, H.N.; CHOI, S. Effects of aging procedures on the molecular, biochemical, morphological, and mechanical properties of vacuum-formed retainers. **J Mech Behav Biomed Mater.** v.51, p.356-366, 2015.

SABOUR, A.; EL HELOU, M.; ROGER-LEROI, V.; BAUER, C. Release and toxicity of bisphenol-A (BPA) contained in orthodontic adhesives: A systematic review. **Int Orthod.** v.19, n.1, p.1-14, 2021.

FRANCISCO, I.; PAULA, A.B.; RIBEIRO, M. *et al.* The Biological Effects of 3D Resins Used in Orthodontics: A Systematic Review. **Bioengineering.** v.9, p.1-15, 2022.

COLORADO-YOHAR, S.M.; CASTILLO-GONZÁLEZ, A.C.; SÁNCHEZ-MECA, J. *et al.* Concentrations of bisphenol-A in adults from the general population: A systematic review and meta-analysis. **Sci Total Environ.** 775, 2021.

ANVISA. Resolution No. 56 of 16 November 2012 provides on the positive list of monomers, other initiators and polymers authorised for the preparation of plastic packaging and equipment in contact with food. **Natl Heal Surveill Agency**. (D), p.57, 2012.

CDC. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. **Fourth Natl Rep Hum Expo to Environ Chem**. Published online. p1-529, 2009.

GUNDERT-REMY, U.; BODIN, J.; BOSETTI, C. *et al.* Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol. **EFSA Support Publ**. v.14,n.12, 2017.

KLOUKOS, D.; PANDIS, N.; ELIADES, T. Bisphenol-A and residual monomer leaching from orthodontic adhesive resins and polycarbonate brackets: A systematic review. **Am J Orthod Dentofac Orthop**. v.143(4 SUPPL):S104-S112.e2, 2013.

RETAMOSO, L.B.; LUZ, T.B.; MARINOWIC, D.R.; MACHADO, D.DC.; FREITAS, M.P.M. Cytotoxicity of esthetic, metallic, and nickel-free orthodontic brackets: Cellular behavior and viability. **Am J Orthod Dentofac Orthop**.v.142, n.1:70-74, 2012.

DE ANDRADE VITRAL, J.C.; FRAGA, M.R.; DE SOUZA, M.A.; FERREIRA, A.P.; VITRAL, R.W.F. In-vitro study of cellular viability and nitric oxide production by J774 macrophages stimulated by interferon gamma with ceramic, polycarbonate, and polyoxymethylene brackets. **Am J Orthod Dentofac Orthop**. v.137, n.5:665-670, 2010.

RYOKAWA, H.; MIYAZAKI, Y.; FUJISHIMA, A.; MIYAZAKI, T.; MAKI K. The mechanical properties of dental thermoplastic materials in a simulated intraoral environment. **Orthod Waves**. v.65, n.2:64-72, 2006.

PREMARAJ, T.; SIMET, S.; BEATTY, M.; PREMARAJ, S. Oral epithelial cell reaction after exposure to Invisalign plastic material. **Am J Orthod Dentofac Orthop**. v.145, n.1:64-71, 2014.

ELIADES, T.; PRATSINIS, H.; ATHANASIOU, A.E.; ELIADES, G.; KLETSAS, D. Cytotoxicity and estrogenicity of Invisalign appliances. **Am J Orthod Dentofac Orthop**. v.136, n.1:100-103, 2009.

RAGHAVAN, A.S.; POTTIPALLI, S.H.; KAILASAM, V.; PADMANABHAN, S. Comparative evaluation of salivary bisphenol A levels in patients wearing vacuum-formed and Hawley retainers: An in-vivo study. **Am J Orthod Dentofac Orthop**. v.151, n.3, p.471-476, 2019.