

ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DA TOXICIDADE DO AMÁLGAMA SOBRE O FECHAMENTO DO PALATO

Renata Hinhug VILARINHO*

Sebastião HETEM**

Lizete Toledo de Oliveira RAMALHO**

- RESUMO: Cristas palatinas de fetos de camundongos foram cultivadas in vitro na presença de fragmentos de amálgama que permaneceram na cavidade bucal de pacientes. Verificou-se por meio de análise histológica o efeito tóxico do amálgama sobre o desenvolvimento dos elementos palatinos. Os resultados mostraram a presença de restos epiteliais que alteram o padrão de fechamento do palato. É lícito concluir que o amálgama promove alterações no processo de diferenciação celular.
- PALAVRAS-CHAVE: Amálgama dentário; mercúrio; palato.

Introdução

A alta incidência de cáries durante o século XX exigiu a obtenção de um material restaurador que resistisse às forças mastigatórias, fosse eficiente e eficaz, e apresentasse durabilidade e baixo custo.^{13, 19, 23, 30, 31}

O amálgama tem sido, desde então, amplamente empregado por profissionais, obtendo aceitação pública satisfatória.⁷ No entanto, sus-

* Estagiária e bolsista da Fapesp (Processo nº 96/04409-3) – Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

** Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – UNESP – 14801-903 – Araraquara – SP.

peitas de possíveis efeitos adversos à saúde, causados pelo vapor de mercúrio liberado pelas restaurações, têm surgido desde o início do século e recentemente alcançaram amplo enfoque.^{7, 11, 12, 28}

Atualmente, pesquisas têm detectado elevados níveis de vapor de mercúrio na cavidade oral de indivíduos portadores de restaurações de amálgama.^{28, 30} Estudos adicionais em animais sugerem que o mercúrio das restaurações pode ser depositado em tecidos distantes do local de emprego do amálgama.^{1, 3, 5, 6, 14, 24, 29, 34}

O estudo da toxicidade de elementos metálicos em cultura tem apresentado aspectos favoráveis, como o melhor potencial de controle de variáveis de difícil uniformização *in vivo*.¹⁸

O desenvolvimento de tecidos *in vitro* tem mostrado ser um sistema vantajoso para o estudo de biocompatibilidade, uma vez que seus efeitos podem ser observados e que, precocemente, a diferenciação, a proliferação e a interação celular podem revelar mais claramente efeitos sutis não detectáveis facilmente nos tecidos adultos.¹⁸

Os processos palatinos inicialmente se apresentam em posição vertical com a língua interposta. O abaixamento desta cria condições para a união, que se apresenta em dois estágios: o primeiro, caracterizado pela mudança na direção de desenvolvimento, o qual se torna mais horizontal, e o segundo, resultante do contato e de fusão epitelial seguida de fusão mesenquimal, a qual, às vezes, é incompleta pela persistência de remanescentes epiteliais.^{4, 21, 26, 34}

Diante do exposto, nosso estudo visa analisar *in vitro* a toxicidade do amálgama após sua remoção da cavidade oral de pacientes sobre o fechamento do palato.

Material e método

Materiais

- Cristas palatinas de camundongos com 13 dias de vida intra-uterina
- Filtro Millipore com poros de 0,22 μm
- Frasco de cultura
- Tela metálica
- Placa de Petri descartável
- Pipetas estéreis

- Estufa de CO₂ a 37°C
- Dissecador
- Fragmentos de amálgama
- Vela
- Meio de cultura – Meio essencial mínimo (MEM) Eagle
- Lâmina de bisturi nº 11, montada em cabo
- Pinça de relojoeiro
- Tesoura para cirurgia oftálmica
- Microscópio estereoscópico
- Microscópio óptico

Métodos

Camundongos albinos foram cruzados, e o aparecimento do plugue vaginal foi considerado o dia zero da gestação.¹⁵ Após 13 dias de gestação, as mães foram sacrificadas, os úteros assepticamente removidos, e os embriões dissecados e colocados em MEM – Eagle para cultura (Eagle's minimum essencial medium), suplementado com glutamina, glicina, ácido ascórbico, penicilina, estreptomicina.¹⁰

Os embriões foram dissecados e decapitados em capela de fluxo laminar com auxílio de um microscópio estereoscópico, as cabeças colocadas em novo meio e as cristas palatinas, dissecadas e unidas, colocadas em novo meio.

As cristas palatinas unidas foram colocadas sobre uma peça de papel Millipore, de forma retangular, que, por sua vez, foi colocada sobre um segmento de tela metálica apoiado nas bordas do frasco de cultura e colocado em meio de cultura até que este estivesse em contato com o palato. Cada um desses conjuntos foi colocado no interior de uma placa de Petri descartável e incubado durante 6 dias em um dissecador com atmosfera umidificada e adequado nível de CO₂, em estufa com umidade e a 37°C.

Fragmentos de amálgama com diferentes tempos de permanência na cavidade bucal (4, 5 e 8 anos) foram removidos com alta rotação, sob refrigeração adequada, dos pacientes da clínica da Faculdade de Odontologia de Araraquara e mantidos em álcool a 70%. Esses fragmentos foram colocados no meio de cultura no qual o palato foi cultivado.

O palato foi cultivado em meio de cultura (MEM – Eagle), sem presença de fragmentos de amálgama, como espécimes controle.

O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, e, após o período de 6 dias, os palatos foram fixados em formol neutro a 10%, submetidos a lavagem em álcool em série crescente, incluídos em parafina, cortados com 6 μm de espessura e corados pelo método da hematoxilina e eosina para análise em microscopia óptica.

Resultado

Espécimes controle

O palato apresentava união entre o palato primário e o secundário com aspecto triangular (Figura 1) e ausência de restos epiteliais (Figuras 2 e 3). O septo nasal e as fossas nasais se apresentavam com boa organização tecidual (Figuras 1, 2, 3, 4).

Espécimes tratados – Experimental

O palato em contato com meio contendo fragmentos de 4 anos caracterizou-se pela formação de uma estrutura triangular correspondente à união entre o palato primário e o palato secundário, existindo ainda alguns restos epiteliais (Figuras 5, 6).

O palato em contato com meio contendo fragmentos de 5 anos apresentou o processo de união em desenvolvimento, permanecendo ainda alguns restos epiteliais (Figuras 7, 8, 9). Boa organização de septo nasal e fossas nasais (Figuras 7, 8 e 9).

O palato em contato com meio contendo fragmentos de 8 anos apresentou a união dos palatos primário e secundário em estágio menos adiantado, caracterizado pelo formato triangular (Figura 10). Existem restos epiteliais que identificam uma estrutura trilaminar (Figura 11). O septo nasal e as fossas nasais se apresentam com boa organização tecidual (Figuras 10, 11 e 12).

Discussão

O amálgama é um material restaurador efetivo que oferece muitas vantagens sobre outros materiais restauradores, inclusive: ampla aplicação, fácil manipulação, razoável aceitação clínica e baixo custo relativo.²⁴ No entanto, alguns trabalhos sugerem que a liberação de vapor

de mercúrio, durante procedimentos clínicos como a inserção, condensação e remoção de restaurações, pode comprometer a saúde do profissional e do paciente.^{8, 9} E outros acreditam na insuficiência de dados que comprovem seus danos biológicos.^{16, 22}

A remoção de restaurações de amálgama é um procedimento que envolve liberação de vapores de mercúrio^{29, 30} e é frequentemente exe-

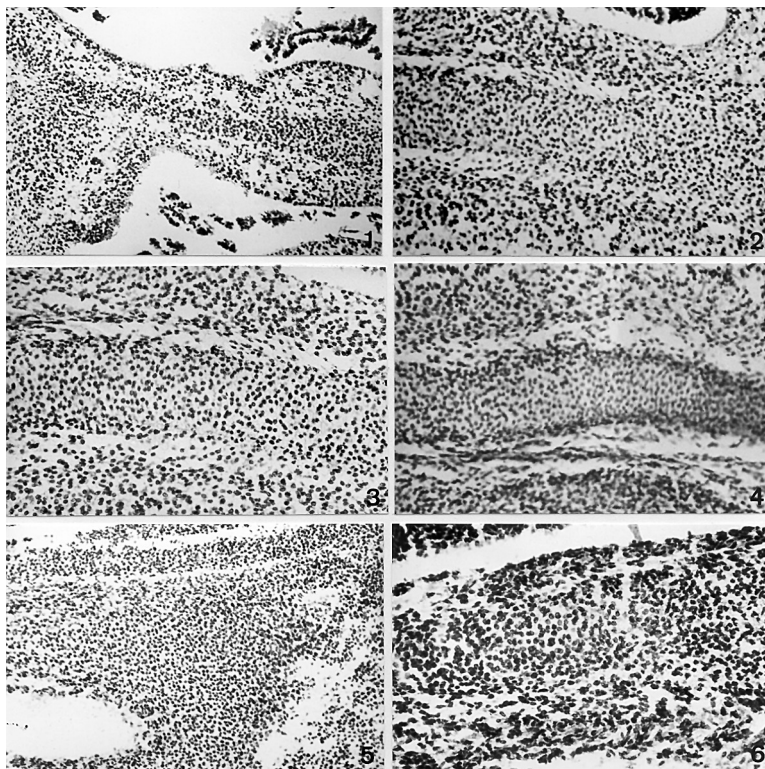


FIGURA 1 - Controle. Palato. União entre o palato primário e o secundário com aspecto triangular. HE 650x.

FIGURA 2 - Controle. Palato, região média. Ausência de restos epiteliais. Septo nasal e fossas nasais com boa organização tecidual. HE 650x.

FIGURA 3 - Controle. Palato, região média. Ausência de restos epiteliais. Septo nasal e fossas nasais com boa organização tecidual. HE 1000x.

FIGURA 4 - Controle. Palato, região posterior. Septo nasal e fossas nasais com boa organização tecidual. HE 650x.

FIGURA 5 - Experimental. Palato. Amálgama de 4 anos. União palato primário e secundário com aspecto triangular com presença de alguns restos epiteliais. HE 650x.

FIGURA 6 - Experimental. Palato. Amálgama de 4 anos. Região média. Presença de restos epiteliais. HE 650x.

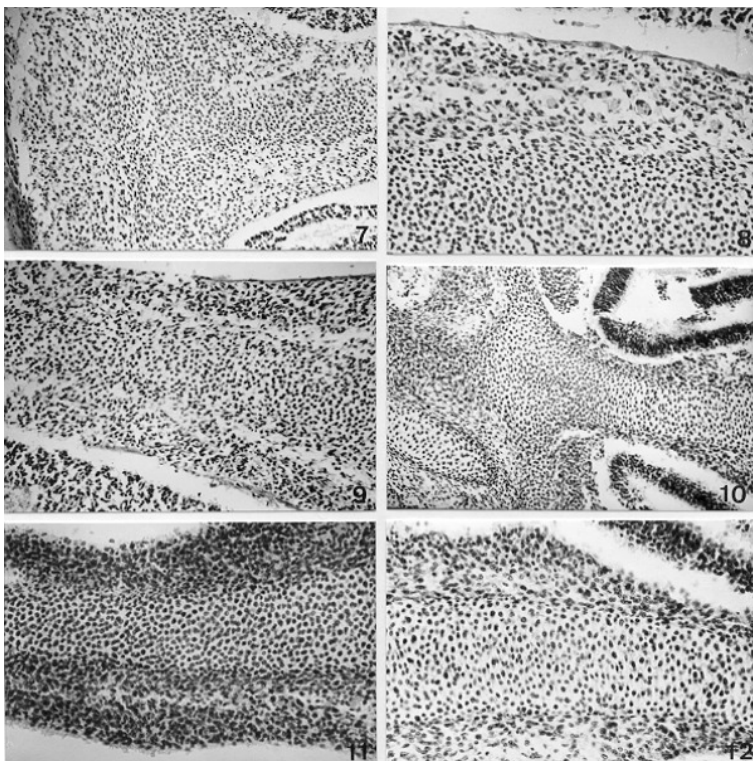


FIGURA 7 - Experimental. Palato. Amálgama de 5 anos. Região anterior. Boa organização de septo nasal e fossas nasais. HE 650x.

FIGURA 8 - Experimental. Palato. Amálgama de 5 anos. Região média. Boa organização de septo e fossas nasais. HE 650x.

FIGURA 9 - Experimental. Palato. Amálgama de 5 anos. Processo de união das cristas palatinas em desenvolvimento, permanecendo ainda alguns restos epiteliais. HE 650x.

FIGURA 10 - Experimental. Palato. Amálgama de 8 anos. Região anterior. União do palato primário com o secundário em estágio menos adiantado, caracterizado pelo formato triangular. HE 650x.

FIGURA 11 - Experimental. Palato. Amálgama de 8 anos. Região média. O septo nasal e as fossas nasais se apresentam com boa organização tecidual. HE 650x.

FIGURA 12 - Experimental. Palato. Amálgama de 8 anos. Região posterior. O septo nasal e as fossas nasais se apresentam com boa organização tecidual. HE 650x.

cutado em consultório. No estudo em questão se procurou avaliar a citotoxicidade de fragmentos de amálgama submetidos a esse procedimento sobre o desenvolvimento de elementos celulares do palato in

vitro. Os resultados mostraram um atraso na diferenciação, comprovando alguns estudos anteriores.^{20, 32, 33}

Alguns fatores podem influenciar no padrão de liberação de mercúrio^{16, 20} como o uso de sugador de alta potência, refrigeração adequada, alta velocidade, brocas carbide, composição do amálgama, tipo de lima-lha,²⁵ brunidura e polimento das restaurações,¹³ tempo de permanência em cavidade oral. Destes, apenas os cinco primeiros estiveram sob controle neste experimento, não sendo possível, contudo, avaliá-los.

Os resultados apresentados mostraram que as alterações ocorridas no processo de fechamento do palato dependem das condições do meio de cultura, ou seja, da presença de algum componente estranho a este meio, fato também observado em outros estudos.^{17, 19, 20, 23, 27}

O meio de cultura MEM – Eagle mostrou-se eficaz para a metodologia empregada no experimento atual, uma vez que os resultados encontrados no grupo controle desse estudo corroboram os resultados levantados pela literatura.^{19, 33, 34}

Com relação ao palato, foi possível observar a presença de restos epiteliais em grande concentração, o que também representa um atraso de desenvolvimento segundo alguns estudos.^{2, 4, 21, 34}

Trabalhos anteriores ressaltam a validade dos estudos *in vitro* na avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos em decorrência da maior capacidade de controle de variáveis, que não são passíveis de controle nos estudos *in vivo*.^{17, 19, 20, 23, 27, 30, 34}

A permanência de restos epiteliais durante o processo de fechamento do palato, segundo alguns estudos, poderia atuar bloqueando a ação do mesênquima sobre o epitélio, sendo um dos fatores relacionados à formação de fendas.^{2, 4, 21, 34}

Dessa forma, acreditamos colaborar com a validade dos estudos *in vitro* e com o exercício clínico diário, com o objetivo de alertar para as intervenções com amálgama, especialmente no que diz respeito à clínica odontopediátrica, onde estarão presentes tecidos e órgãos em desenvolvimento.

Conclusão

Com base em nossos resultados, o amálgama interfere no padrão de fechamento do palato em razão da permanência de alguns restos epiteliais

durante o processo de fechamento das cristas palatinas para posterior formação do palato.

VILARINHO, R. H., HETEM, S., RAMALHO, L. T. de O. The toxic effect of amalgam on palate closure. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v.28, n.1, p.23-32, 1999.

- **ABSTRACT:** Palatine shelves of 13 days mouse foetuses were cultured in vitro with amalgam removed from patients, for 6 days. After this, palatine shelves were submitted to histological analysis of palate closure. The results showed changes on development; it was possible to observe the presence of epithelial cells that changed the normal palate closure. Thus, under the experimental conditions used here, the amalgam induced changes on the palate closure.
- **KEYWORDS:** Dental amalgam; mercury; palate.

Referências bibliográficas

- 1 ABRAHAM, J. E., SVARE, C. W., FRANK, V. W. The effect of dental amalgam restorations on blood mercury levels. *J. Dent. Res.*, v.63, p.71-3, 1984.
- 2 BEAR, J. C. Spontaneous abortion, sex ratio and facial cleft malformations. *Clin. Genet.*, v.13, p.1-7, 1978.
- 3 BJORKMAN, L., LIND, B. Factors influencing mercury evaporation rate from dental amalgam fillings. *Scand. J. Dent. Res.*, v.100, p.354-60, 1992.
- 4 BORDET, G. Contribution à l'étude de la fermeture du palais secondaire chez l'embryon humain. *Trans. Eur. Orthod. Soc.*, v.2, p.149-59, 1975.
- 5 BOYD, N. D. et al. Mercury from dental "silver" tooth fillings impairs sheep kidney function. *Am. J. Physiol.*, v.261, p.1110-4, 1991.
- 6 BRUNE, D. et al. Exposure to mercury and silver during removal of amalgam restorations. *Scand. Dent. J.*, v.88, p.460-3, 1980.
- 7 CUTRIGHT, D. E. et al. Mercury: its relation to the dentist's health and dental practice characteristics. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.92, p.1182-8, 1976.
- 8 EAGLE, H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, v.130, p.432-7, 1959.
- 9 EAMES, W. B., GASPAR, J. D., MOHLER, C. The mercury enigma in dentistry. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.92, p.1199-1203, 1976.

- 10 FERRACANE, J. L. et al. Reduced mercury vapour released from dental amalgam prepared with binary Hg-In liquid alloys. *J. Dent. Res.*, v.73, p.1711-6, 1994.
- 11 FLEMING, M. A., ADEY, J. D., MAHLER, D. B. Hg emission from dental amalgams related to the amount of Sn in the Ag-Hg (gamma 1) phase. *J. Dent. Res.*, v.73, p.1663-8, 1994.
- 12 FONTANA, U. F. et al. Influência da brunidura e polimento na corrosão galvânica de amálgamas convencional e de maior conteúdo de cobre. Estudo in vitro e in vivo. *Rev. Odontol. UNESP*, v.20, p.207-16, 1991.
- 13 GOERING, P. L. et al. Toxicity assessment of mercury vapor from dental amalgam. *Fundam. Appl. Toxicol.*, v.19, p.319-29, 1992.
- 14 GRUNEBERG, H. The development of some external features in the mouse embryos. *J. Hered.*, v.34, p.89-92, 1943.
- 15 HALBACH, S. Combined estimation of mercury species released from amalgam. *J. Dent. Res.*, v.74, p.1103-9, 1995.
- 16 HETEM, S., JOWETT, A. K., FERGUSON, M. W. J. Biocompatibility testing of a posterior composite and dental cements using a new organ culture model. *J. Dent.*, v.17, p.175-85, 1993.
- 17 JOWETT, A. K., FERGUSON, M. W. J., COMBE, E. C. In vitro biocompatibility testing: a new organ culture method. *J. Dent.*, v.16, p.55-65, 1988.
- 18 KAGA, M. et al. Citotoxicity of amalgams. *J. Dent. Res.*, v.67, p.1221-4, 1988.
- 19 KAWAHARA, H. et al. Cellular responses to dental amalgam in vitro. *J. Dent. Res.*, v.54, p.394-401, 1975.
- 20 KITAMURA, H. A consideration on the possibility of cleft lip or palate formation due to epithelial hypertrophy. A comparison of the palatal fusion with the eyelid fusion. *Bull Kanagawa Dent. Coll.*, v.5, p.21-39, 1977.
- 21 LORSCHIEDER, F. L., VIMY, M. J. Evaluation of the safety issue of mercury release from dental fillings. *FASEB J.*, v.7, p.1432-3, 1993.
- 22 MERYON, S. D. Relationship between the in vitro cytotoxicity of dental amalgams and zinc release. *British Division.*, v.63, p.104-8, 1984.
- 23 MOLIN, C. Amalgam: fact and fiction. *Scand. J. Dent. Res.*, v.100, p.66-73, 1992.
- 24 NAKAMURA, M., KAWAHARA, H. Cellular responses to the dispersion amalgams in vitro. *J. Dent. Res.*, v.58, p.1780-90, 1979.
- 25 PÉCORÁ, J. D. et al. Apresentação de um método qualitativo de identificação de vapor de Hg. *Rev. Paul. Odontol.*, v.2, p.6-8, 1997.
- 26 PELOZO, A. M., HETEM, S., MATHEUS, M. T. G. Efeitos da ivermectina sobre o fechamento do palato e sobre o desenvolvimento de germes dentais de camundongos. *Rev. Odontol. UNESP*, v.23, p.203-11, 1994.

- 27 PSARRAS, V., DERAND, T., NILNER, K. Effect of selenium on mercury vapour released from dental amalgams. An in vitro study. *Sweed. Dent. J.*, v.18, p.15-23, 1994.
- 28 REINHART, J. W. et al. Mercury vaporization during amalgam removal. *J. Prosthet. Dent.*, v.50, p.62-4, 1983.
- 29 SHAPIRO, B. L. Cell Culture. *Northwest Dent.*, v.6, p.281-4, 1977.
- 30 STEPHEN, B. et al. The benefits and risks of dental amalgam: current findings reviewed. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.125, p.381-8, 1994.
- 31 THESLEFF, I. Differentiation of odontogenic tissues in organ culture. *Scand. J. Dent. Res.*, v.84, p.353-6, 1976.
- 32 THESLEFF, I. Tissue interactions in tooth development. *Differentiation*, v.18, p.75-88, 1981.
- 33 VIMY, M. J., TAKAHASHI, Y., LORSCHHEIDE, F. L. Maternal fetal distribution of mercury (^{203}Hg) released from dental amalgam fillings. *Am. J. Physiol.*, v.258, p.939-45, 1990.
- 34 WALKER, B. E., QUARLES, J. Palate development in mouse foetuses after tongue removal. *Arch. Oral Biol.*, v.21, p.405-12, 1976.