

# Testes de biocompatibilidade: cultivo de células animais e suas aplicações em estudos de toxicidade na Odontologia

*Biocompatibility tests: cultivation of animal cells and their applications in toxicity studies in Dentistry*

Fabiano Luiz Heggendorn<sup>1,3</sup>, Lúcio de Souza Gonçalves<sup>3</sup>, Elisama Azevedo Cardoso DDS<sup>1</sup>, Márcia T. S. Lutterbach<sup>3</sup>, Viviane de Oliveira Freitas Lione<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Bioensaios Farmacêuticos

<sup>2</sup>Faculdade de Odontologia, universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de biocorrosão e Biodegradação, Instituto Nacional de Tecnologia

## Resumo

**Introdução:** o cultivo *in vitro* de células animais é uma tecnologia moderna, baseada em fundamentos e princípios científicos com inúmeras aplicações, levando inclusive, a união de organizações internacionais no sentido de validar modelos de ensaios *in vitro* para avaliar toxicidade de produtos químicos, tendo em vista que estes são de baixo custo, maior produtividade e fornece resultados mais rápidos. **Objetivo:** Abordar por meio de revisão bibliográfica os métodos de avaliação de citotoxicidade mais empregados, necessários para testes de biocompatibilidade dos materiais odontológicos. **Metodologia:** foram selecionados os principais trabalhos e normas por meio de busca nas bases de pesquisa de trabalhos científicos da Scielo, Google Acadêmico e livros sobre o tema, a fim de possibilitar um embasamento para um adequado delineamento de ensaios *in vitro* de citotoxicidade. **Resultados:** A atual disponibilidade de uma variabilidade de metodologias de linhagens celulares em bancos nacionais e internacionais tornou possível a larga utilização da cultura de células como modelos *in vitro* para avaliações toxicológicas. **Conclusão:** As normas da série ISO 10993 e 7405, que orientam os ensaios de citotoxicidade apresentam uma desatualização de 10 anos, o que para a evolução tecnológica e científica representa um gap abissal quando comparada as diferentes técnicas disponíveis atualmente. Outro dado avaliado é a falta de padronização no emprego das linhagens celulares nos testes de citotoxicidade no campo odontológico. Diversos trabalhos empregam linhagens celulares distintas das que são determinadas pelas normas ISO. Tais diferenças podem representar dados discrepantes quando utilizados para avaliar um mesmo biomaterial.

**Palavras-Chave:** Citotoxicidade; Cultivo celular; Biomateriais.

*Autor correspondente:*

Dr. Fabiano Luiz Heggendorn

Endereço: Rua Feliz da Cunha, 11, apto 806 – Tijuca

CEP: 20260-300 – Rio de Janeiro (RJ), Brasil.

E-mail: fabianohegg@gmail.com

Recebido em: 09/10/2018

Revisado em: 08/02/2019

Aceito em: 03/04/2020

Publicado em: 03/06/2020

## Abstract

**Introduction:** the *in vitro* culture of animal cells is a modern technology, based on scientific principles and principles with many applications, including the union of international organizations to validate models of *in vitro* tests to evaluate chemical toxicity. since these are low cost, higher productivity and provides faster results. **Objective:** To address, through a bibliographic review, the most commonly used methods of cytotoxicity evaluation, assays necessary for biocompatibility tests. **Methodology:** the main works and standards were selected by means of a search in the scientific research bases of Scielo, Google Scholar and books on the subject, in order to provide a basis for an adequate design of *in vitro* cytotoxic assays. **Results:** The current availability of a variability of methodologies and cell lines in national and international banks made possible the wide use of cell culture as *in vitro* models for toxicological evaluations. **Conclusion:** The ISO 10993 and 7405 series standards, which guide cytotoxicity assays, have a 10-year outdate, which for technological and scientific evolution represents an abyssal gap when compared to the different techniques currently available. Another evaluated data is the lack of standardization in the use of cell lines in cytotoxicity tests in the dental field. Several works employ cell lines other than those determined by ISO standards. Such differences may represent discrepant data when used to evaluate the same biomaterial.

**Keywords:** Cytotoxicity; Cell culture; Biomaterials.

## Introdução

Nas últimas décadas, observamos um grande avanço da biologia molecular, particularmente, no que tange a novos métodos capazes de analisar e manipular moléculas de DNA, RNA e proteínas. Consequentemente, temos um rol de informações que tornaram o conhecimento da célula e sua fisiologia, algo nunca imaginado anteriormente. De fato, essas técnicas inovadoras permitiram acessarmos os vários bilhões de nucleotídeos e o entendimento do que ocorre dentro das células e como elas interagem com meio ambiente<sup>1</sup>.

Nesse contexto, é evidente que o cultivo *in vitro* de células animais transformou-se em uma tecnologia moderna, baseada em fundamentos e princípios científicos com inúmeras aplicações, levando inclusive, a união de organizações internacionais no sentido de validar modelos de ensaios *in vitro* para avaliar toxicidade de produtos químicos, tendo em vista que estes são de baixo custo e maior produtividade, além de fornecerem resultados mais rápidos<sup>1</sup>.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para a avaliação de um biomaterial odontológico, permitindo a determinação de fatores que influenciam o

crescimento celular quando expostos ao dispositivo estudado, além de verificar a compatibilidade tecidual deste<sup>2-4</sup>. A norma *International Organization for Standardization*(ISO) 10993-5<sup>3</sup> rege o uso dos testes de citotoxicidade *in vitro*, definindo o período de incubação das culturas celulares com o dispositivo médico por meio do teste de contato direto, teste de contato indireto e teste de extração, o preparo adequado dos testes de amostras para análises e gradua a citotoxicidade perante a análise das células empregadas<sup>2-4</sup>.

Por mais de 30 anos os estudos de culturas celulares são empregados na investigação das reações citotóxicas induzidas pelos materiais endodônticos oferecendo a possibilidade de estudar os efeitos da liberação destes componentes em sistemas celulares<sup>5</sup>. Tais estudos revelaram que são poucos os biomateriais que não apresentam alguma resposta imunológica do organismo<sup>6</sup>. Entretanto tais reações resultam em uma resposta de cura após o tratamento reparador empregado com o biomaterial<sup>6</sup>.

Nesta revisão não temos a intenção de esgotar o assunto, até porque o cultivo celular é o método *in vitro*

mais largamente empregado em Farmacologia e Toxicologia, já que o desenvolvimento de fármacos e as investigações toxicológicas começaram a partir desses estudos<sup>7</sup>. Assim, objetiva-se abordar por meio de uma revisão bibliográfica os métodos de avaliação de citotoxicidade mais empregados necessários para testes de biocompatibilidade nos materiais odontológicos.

## Metodologia

Foram selecionados os principais trabalhos e normas por meio de busca nos bancos de dados da Scielo, pubmed e Google Acadêmico, e em livros sobre o tema, utilizando as palavras chave: *in vitro*; citotoxicidade e odontologia, em português e em inglês. Foram utilizadas as principais normas para ensaios de citotoxicidade como critério de inclusão. Nesta revisão, não foi utilizado nenhum critério de exclusão.

## Resultados e discussão

### Cultivo de células animais

A cultura de células teve seu começo, no início do século XX, com os trabalhos de Harrison<sup>8</sup> e Carrel<sup>9</sup>. Os primeiros experimentos consistiam em cultivo de tecidos fragmentados mecanicamente e colocados em frascos contendo fluidos dos animais de onde provinham os tecidos<sup>10</sup>. O objetivo do desenvolvimento dessa técnica foi a obtenção de um método de estudo do comportamento das células fora do organismo que a originou e em um meio controlado<sup>10</sup>.

Apesar dos primeiros estudos datarem de 1907, o cultivo de células animais alcançou sucesso na década de 1950, quando H. Eagle conseguiu definir os nutrientes necessários para o crescimento celular (**TABELA 1**).

**TABELA 1 - Componentes e Elementos básicos utilizados em meio de cultura para células animais**

Componentes Básicos para manutenção celular em meio de cultura	Elementos e compostos aplicáveis em meio de cultura
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Destilada ou desmineralizada.
Fonte de Carbono	Glicose
Elementos inorgânicos	Sais: KCl, NaCl, MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaHCO <sub>3</sub>
Aminoácidos	Arginina, cistina, fenilalanina, glutamina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano, tirosina, valina.
Vitaminas	Biotina, ácido fólico, colina, nicotinamida, ácido pantotênico, piridoxal, riboflavina, tiamina.
Para controle fungico ou de diferentes contaminações	Antibióticos (Penicilina e Estreptomicina)
Indicador de pH	Vermelho fenol (pH 7,2-7,4)
Soro	Soro animal de diferentes origens. Ex: soro fetal Bovino.
Na ausência de soro	Proteínas: Insulina, Transferrinas e Fatores específicos de crescimento

Basicamente, um meio para o cultivo de células animais inclui água, sais minerais, aminoácidos,

vitaminas, glicose, soro humano ou de cavalo (fatores de crescimento), antibióticos (para prevenir as

contaminações microbianas)<sup>11</sup>. Além disso, as células devem ser isoladas, inoculadas e mantidas assepticamente em condições bastante estritas de temperatura (35°C a 37°C), pH e umidade<sup>11</sup>.

Assim, a cultura celular é um conjunto de técnicas que permitem o cultivo e manutenção de células vivas em laboratório, num ambiente controlado<sup>12,13</sup>. O desenvolvimento da técnica de cultura de células possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares da célula, o que permite avanços científicos em diversas áreas de pesquisa tais como: terapia celular, doenças degenerativas, células tronco e produção de vacinas<sup>12,13</sup>. Além disso, a técnica de cultivo celular tem sido considerada uma alternativa ao uso de experimentação animal<sup>12,13</sup>.

Em adição, a utilização da técnica de cultura de células animais permitiu a compreensão de vários mecanismos moleculares propiciando importantes avanços científicos na biologia da célula, fazendo com que a técnica de cultivo celular passasse a ser uma ferramenta importante na pesquisa e uma protagonista do desenvolvimento tecnológico mundial<sup>14,15</sup>.

As culturas celulares são derivadas de explantes primários ou de suspensão de células dispersas mecanicamente ou enzimaticamente, cultivadas em monocamadas aderentes em substrato sólido (plástico ou vidro), ou em suspensão em meio de cultura para as células não-aderentes<sup>17</sup>. As culturas preparadas diretamente de tecidos de um organismo, sejam com ou sem fracionamento das células, são chamadas de culturas primárias<sup>16</sup>. Na maioria dos casos, células em culturas primárias podem ser retiradas da placa de cultura e usadas para formar um número razoável de culturas secundárias, podendo ser subcultivadas repetidamente, por semanas ou meses<sup>16</sup>.

O estabelecimento do cultivo de células *in vitro* ocorre após dissecação e dispersão (desagregação) total ou parcial do tecido de origem (humano ou animal), o que permite uma classificação didática, de acordo com sua natureza em primária e secundária (ou subcultura)<sup>16</sup>.

A - Cultura primária: Após o processo de desagregação, as células sobreviventes aderem a garrafa

de cultura de células e formam a primeira monocamada de células daquele tecido<sup>11</sup>. Caracteristicamente, a cultura primária tem sua vida limitada, são mais heterogêneas e representativas do tecido ou órgão de origem<sup>16</sup>.

Até o primeiro subcultivo, a cultura é considerada como primária, pois à medida que a cultura é repicada, as células com maior capacidade de proliferação irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram ao processo de cultivo ou, que devido a traumas no processo de desagregação, não possuem taxa normal de proliferação<sup>16</sup>.

B - Células secundárias: são derivadas de subculturas de células primárias<sup>11</sup>. Culturas secundárias podem ser repetidamente subcultivadas por semanas ou meses, mas após sucessivos repiques surge uma linhagem celular finita (com um único tipo de célula, mais homogênea e com maior velocidade de crescimento)<sup>16</sup>.

As subculturas também apresentam tempo de vida limitada, em média 50 subcultivos (limite de Hayflick), pois a cada divisão celular os telômeros (regiões finais que protegem os cromossomos) são encurtados em tamanho, até que já não possam mais se dividir. Esse fenômeno é denominado de senescência celular replicativa<sup>16</sup>.

A progressiva perda dos telômeros leva à senilidade, enquanto a ação de uma enzima chamada de telomerase leva a uma contínua multiplicação<sup>16</sup>. Essa enzima é responsável pela reposição da parte do telômero que foi perdida a cada divisão celular<sup>16</sup>. Em células consideradas normais (exceto células germinativas, células tronco da pele e as da medula óssea), essa enzima é inativa, mas em células cancerígenas ou células transformadas, as telomerasas estão constantemente ativas, o que implica na multiplicação “infinita” ou transformação da célula<sup>16</sup>.

C - Células de linhagem contínua - derivam de células primárias ou secundárias que sofreram o processo de transformação<sup>16</sup>. Possuem a capacidade de se multiplicarem ilimitadamente sem inibição por contato e

com grande rapidez. A transformação de uma célula pode resultar de mutações espontâneas ou induzidas por agentes químicos, físicos ou virais e assim originar células cancerígenas<sup>16</sup>.

Outra maneira na qual podemos classificar as células é quanto ao modo de propagação celular. Assim, as células podem estar em suspensão ou aderentes<sup>16</sup>.

A - Culturas não aderentes (em suspensão): São cultivadas em suspensão no meio líquido, derivadas de tecidos que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver. Dessa forma, não é necessário que as células estejam aderidas entre si ou ao suporte sólido (paredes interiores dos frascos de cultura de células ou outro recipiente no qual esteja em cultivo)<sup>16</sup>.

B - Em monocamada ou aderentes: são células que necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. Assim, crescem aderindo ao suporte sólido e entre si. Para serem transferidas para outro suporte sólido, necessitam ser dissociadas entre si e do suporte de cultura em que se fixaram, através de métodos enzimáticos (uso de Tripsina com EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético), físicos (uso do *rubber policeman* ou seringas e ainda pipetas descartáveis) ou agentes quelantes (EDTA)<sup>16</sup>.

Como discutido até o momento, células em cultivo são um modelo de função fisiológica com algumas limitações, devido à perda de características que ocorre durante o seu desenvolvimento em cultura<sup>16</sup>. A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*. Por mais próximo que esse modelo esteja da realidade, o processo *in vitro*, ainda, causa problemas para o desenvolvimento celular, principalmente devido à redução da adesão célula-célula e célula-matriz e a falta de heterogeneidade celular e arquitetura tridimensional, características de um tecido *in vivo*, já que o meio nutricional e hormonal são diferentes do organismo<sup>17,18</sup>.

De fato, células que anteriormente cresciam tridimensionalmente, agora se encontram em um meio que favorece o espalhamento, a migração e a proliferação de células não especializadas com diferentes funções, ocasionado pelo crescimento em monocamada ou em 2-dimensões (2D, bidimensional) em suportes, tal como

lamínulas de vidro ou em placas e garrafas de plástico. Tais suportes sintéticos forçam a célula ao ajustamento em plano artificial e a superfície rígida, muito embora, a escolha do meio de cultivo ideal, ainda seja um caminho para a obtenção de uma cultura que expresse uma função específica<sup>19,20</sup>.

### Estudos de Toxicidade

O conhecimento do mecanismo de ação tóxica envolvendo uma substância química é de suma importância, visto que este auxilia de forma significativa na avaliação de risco toxicológico<sup>21,22</sup>. Além disso, a atual disponibilidade de uma variabilidade de linhagens celulares em bancos nacionais e internacionais tornou possível a larga utilização da cultura de células como modelos *in vitro* para avaliações toxicológicas<sup>17</sup>.

Os estudos de toxicidade *in vitro*, celular ou tecidual, são usados para estudar mecanismos de ação e efeitos tóxicos de fármacos para avaliação de eficácia e segurança no homem, a partir da exposição aos compostos químicos, podendo, ainda, classificá-los de acordo com sua capacidade tóxica<sup>7, 23-26</sup>.

As últimas três décadas demonstraram enormes avanços no desenvolvimento de novos biomateriais odontológicos<sup>4</sup>. Estes são empregados para substituir ou reparar tecidos lesionados e não funcionais, possibilitando traçar novas estratégias terapêuticas para o reparo de tecidos, atuando como agentes terapêuticos na regeneração e reparação de tecidos<sup>27</sup>.

Vale ressaltar que o termo biocompatibilidade é associado com os testes de cultura celular. Se o resultado obtido for positivo, demonstrando a manutenção da viabilidade celular, então o material é considerado biocompatível, se o resultado for negativo, com destruição parcial significativa ou total da monocamada celular, o material é rotulado como lesivo e não biocompatível<sup>3,4</sup>. Entretanto, a biocompatibilidade não deve ser avaliada como um único evento ou fenômeno entre o material e o tecido do hospedeiro, e sim na capacidade de realizar e desempenhar a função proposta do biomaterial<sup>4</sup>.

Logo, o termo biocompatibilidade não determina que não deva haver nenhuma resposta imunológica, esta pode variar de mínima até mesmo mais agressiva<sup>4</sup>. A melhor definição para a biocompatibilidade foi dada pela Sociedade Europeia de Biomateriais, durante a conferência de consenso sobre definições em Biomateriais, em 1986, quando qualificaram um biomaterial como “a capacidade de um material para realizar, com uma resposta do hospedeiro adequada, uma aplicação específica”<sup>4</sup>. Assim, fica claro que os ensaios devem ser norteados em função do objetivo do biomaterial utilizado, da situação biológica de aplicação, pelo tipo de tecido ou órgão afetado, as características físico-químicas do material e pelo período de duração<sup>4,28</sup>.

A ISO especifica o uso dos biomateriais, orientando o planejamento biológico para minimizar o uso de modelos animais durante a concepção de um biomaterial, além de enfatizar a importância em definir as características e propriedades de seus produtos químicos, toxicológicos, físicos, elétricos, morfológicos e suas propriedades mecânicas<sup>31</sup>. Nesse contexto, durante o desenvolvimento de um biomaterial, também devem ser avaliados os produtos finais como as substâncias lixiviáveis, produtos de degradação e outros componentes, bem como as propriedades e características do produto final assim como suas interações<sup>31</sup>.

Para essa avaliação deve-se incluir as condições de exposição e de natureza, grau, frequência e duração da exposição do dispositivo, categorizados como de exposição prolongada, para os dispositivos com duração de uso de 24 a 30 dias, e os de exposição permanente, os dispositivos cujo único ou múltiplo uso é superior a 30 dias<sup>31</sup>. Logo, a avaliação biológica da segurança de um biofármaco se torna uma tarefa complexa, pois requer conhecimentos da área de patologia, medicina, biologia, engenharia e ciências dos materiais<sup>4</sup>.

Dessa maneira, para a liberação de um dispositivo médico ou biomaterial no mercado, devem

ser realizados os testes de avaliação inicial. Primeiramente, a característica do biomaterial irá reger a necessidade dos tipos de ensaios a serem realizados, tais como os testes de citotoxicidade, carcinogenicidade e genotoxicidade, testes de efeitos locais após o implante; ensaios de avaliação de produtos lixiviáveis ou de degradação e testes de toxicidade sistêmica, subaguda e subcrônica<sup>2,5</sup>.

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para a avaliação de um biomaterial, permitindo determinar os fatores que influenciam o crescimento celular quando expostos ao dispositivo estudado, além de verificar a biocompatibilidade do material<sup>2-4</sup>.

A norma ISO 10993-5<sup>3</sup> define o período de exposição dos cultivos celulares com o biomaterial, recomendando que sejam realizados testes de contato direto, testes de contato indireto e teste de extração, além de graduar a citotoxicidade perante a análise das células empregadas. Já a norma ISO 7405 direciona os testes de avaliação inicial para os materiais odontológicos<sup>2,4,29,30</sup>.

A avaliação de citotoxicidade é feita por meio da medição da densidade das células expostas a um período de tempo determinado, indicado o uso de mais de uma linhagem celular, recomendada a inclusão das linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongos) e Vero para as avaliações de materiais odontológicos<sup>29,30</sup>. Os parâmetros avaliados nos ensaios de citotoxicidade podem ser quantitativos e qualitativos. O primeiro mede o número de células após proliferação ou inibição celular, o número de colônias formadas ou quantifica as células por meio da contagem de seus componentes como proteínas e mitocôndrias, enquanto o segundo analisa as células microscopicamente, observando as alterações morfológicas como vacuolização citoplasmática e lise de suas membranas. Pode, então, enquadrar o material, como não citotóxico, levemente citotóxico, moderadamente citotóxico, severamente citotóxico ou tóxico (TABELA 2)<sup>2-4,31</sup>.

**TABELA 2 - Enquadramento citotóxico: Relação de viabilidade celular com a escala citotóxica.**

<b>Viabilidade Celular (%)</b>	<b>Escala de Citotoxicidade</b>	<b>Padrões celulares Morfológicos</b>
90%	Não tóxico	Discreta presença de grânulos intracitoplasmáticos. Sem lise celular Taxa de crescimento celular normal.
80 a 89	Levemente tóxico	Presença de células arredondadas (até 20%). Ligações intercelulares frouxas e sem grânulos intracitoplasmáticos com possíveis alterações morfológicas. Ocasionalmente estão presentes lisados celulares. Pequena inibição de crescimento celular
50 a 79	Moderadamente	Presença de células arredondadas (até 50%). Ausência de grânulos intracitoplasmáticos. Lise celular não é extensa nesta etapa Inibição de crescimento celular em até 50% da monocamada.
1 a 49	Severamente	Presença de células arredondadas (até 70%) ou lisadas. A monocamada celular não está completamente destruída. Inibição de crescimento celular superior a 50% da monocamada.
0	Tóxico	Completa redução da monocamada celular.

Entretanto, não existe uma padronização no tipo de linhagem celular empregada para os diferentes tipos de materiais odontológicos existentes. São encontrados relatos do emprego de cocultura de fibroblastos humanos e de células epiteliais (Skin<sup>2</sup> ZK1200) ou de culturas de fibroblastos do ligamento periodontal para avaliar o potencial irritativo das ligas metálicas odontológicas<sup>32,33</sup>.

Durante o ensaio também deve ser utilizado um grupo controle positivo, mediante o emprego de um material citotóxico, um grupo controle branco, em que o mesmo tipo de linhagem celular empregado deve ser mantido nas mesmas condições dos outros grupos, porém, sem a exposição do produto de avaliação e, por fim, um controle negativo, em que o material aplicado não produz resposta citotóxica<sup>3</sup>.

#### **Ensaio de contato direto**

Quando o ensaio é procedido na forma de contato direto, de um biomaterial insolúvel em água ou sólido com as células, pode haver uma inibição do

crescimento celular decorrente do contato físico e não das substâncias tóxicas liberadas<sup>31</sup>. Para evitar essa alteração nos resultados devido à inibição do crescimento celular, pode ser empregado o teste de extração, utilizando extratos obtidos a partir dos materiais, obtendo-se assim substâncias liberadas dos mesmos para os testes<sup>31</sup>.

No processo de delineamento experimental de avaliação, deve ser avaliada a futura aplicabilidade clínica do biomaterial. Em determinadas situações clínicas não há contato direto do biomaterial com as células presentes na polpa dentinária, existindo uma camada de dentina entre o material e o tecido pulpar. Tal situação clínica pode ser melhor simulada com o emprego do método do filtro Millipore<sup>28</sup>.

#### **Ensaio Indireto**

No método indireto, as células são cultivadas em um lado do filtro e o material é colocado em contato com a superfície oposta do filtro e as substâncias

lixiviáveis desse material difundem através dos poros do filtro (0,45 µm), exercendo qualquer efeito tóxico, caso exista, sobre as células, as mais indicadas são as células HeLa ou L929<sup>6,28</sup>. Após o período de realização do ensaio, utilizando um período predeterminado, as amostras são removidas e o filtro Millipore e a monocamada celular são incubados para, posteriormente serem analisados por métodos citoquímicos. As vantagens desse método incluem a diversidade física das amostras empregadas, e podem ser materiais sólidos, pastosos ou líquidos. O emprego de amostras líquidas nesse tipo de técnica, normalmente, volume de 0,1 ml da substância já é suficiente para a avaliação, devendo ser absorvido esse volume por um disco de celulose para posterior colocação sobre o filtro Millipore<sup>28</sup>.

No campo dos materiais dentários, a utilização do teste de cultura possibilita correlacionar o uso das diferentes ligas odontológicas empregadas no material restaurador com os possíveis elementos de ligas dissolvidos e liberados<sup>34</sup>. O emprego de linhagens celulares como fibroblastos NIH3T3 e células epiteliais L123 demonstraram a citotoxicidade de 36 ligas odontológicas comerciais e metais puros, indicado o Cu e Ag com uma toxicidade média, entre 30-60% de sobrevivência celular e o Ni, Zn e Co, altamente tóxicos, sem sobrevivência celular<sup>35</sup>. Também devem ser verificadas as diferentes respostas citotóxicas que cada linhagem celular possui quando expostas em mesmas condições e produtos<sup>36</sup>, tal fato é inerente a característica celular de cada cultura a produzir respostas adequadas a fim de evitar a lesão celular.

A grande discrepância entre os resultados dos testes *in vitro* e *in vivo* podem ser minimizados pela aplicação de novas metodologias *in vitro*, como o teste de barreira dentinária<sup>37,38</sup>. Em 1977, Tyas descreveu o primeiro ensaio utilizando discos de dentina de terceiros molares inclusos, de 150 a 160 µm de espessura, no lugar dos filtros de membrana. Com essa técnica, diversos autores relataram a vantagem em se aproximar de uma situação clínica, além de ser observada que a presença de dentina modera a ação citotóxica do biomaterial estudado

quando comparado aos ensaios tradicionais de modelo de poços<sup>37,39,40</sup>.

### Testes aplicados na odontologia

Partindo do princípio que o efeito terapêutico dos agentes aplicados sobre a dentina é dependente da difusão dos componentes ativos desses materiais através da própria dentina, o método da coroa dentinária pode permitir a aplicação do material similar aos procedimentos clínicos, como as sequências e combinação dos materiais empregados<sup>41,42</sup>.

Já no método da coroa dentinária, as raízes de terceiros molares humanos são removidas para seguir-se o preparo de uma cavidade oclusal de tamanho padrão assegurando-se uma medida, em torno, de 2 mm de espessura da dentina remanescente. Esse método pode oferecer algumas vantagens em relação ao método do disco de dentina, porém a utilização de um dente com a camada de *smear layer*, proveniente do efeito de corte, se aproxima ainda mais da situação clínica e biológica<sup>42</sup>. Uma melhoria dessa técnica foi apresentada com a utilização do dispositivo denominado de “montagem da câmara pulpar”, que permite avaliar a citotoxicidade de diferentes materiais restaurativos utilizando discos de dentina de 0,5 e 1,5 mm de espessura<sup>43</sup>.

Logo, os métodos que envolvem barreiras dentinárias podem demonstrar a capacidade de um material de difundir através da dentina e dos túbulos dentinários, permitindo uma estimativa da toxicidade do material em relação a sua capacidade de difusão, e recomendado para a maioria dos testes que envolvam materiais dentários. Existindo, entretanto, uma relação inversa da espessura destes discos dentinários com a reação citotóxica dos diferentes materiais as células<sup>44</sup>.

Vale ressaltar a dificuldade em se obter um biomaterial totalmente inerte para o organismo. As resinas acrílicas presentes nas próteses dentárias apresentam potencial citotóxico causando estomatite alérgica, irritação química local e hipersensibilidade<sup>30</sup>, assim como cimentos endodônticos, hipoclorito de sódio, o formocresol, o tricresol formalina e o formaldeído<sup>5, 45-49</sup>. Enfim, tais materiais largamente comercializados



apresentam alguma incompatibilidade biológica, resultando em dor pulpar severa quando utilizados em humanos<sup>38</sup>.

Por fim, é sabido que os testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quando correlacionados com as situações clínicas, porém são válidos para determinar o comportamento biológico dos materiais e/ou seus componentes, estabelecendo informações essenciais na fase inicial de investigação de um biomaterial e direciona os testes *in vivo* necessários<sup>4,5,31,37</sup>. Entretanto vale esclarecer que as normas da série ISO 10993 e 7405, que orientam os ensaios de citotoxicidade para a liberação de biofármacos, são antigas, apresentando uma desatualização de 10 anos, o que para a evolução tecnológica e científica representa um gap abissal quando comparada as diferentes técnicas e ensaios disponíveis atualmente.

Outro dado avaliado é a falta de padronização no emprego das linhagens celulares nos testes de citotoxicidade no campo odontológico. Diversos trabalhos empregam linhagens celulares distintas das que são determinadas pelas normas ISO. São relatadas linhagens celulares de ostoblastos SaOS-2<sup>50</sup> e murino Mc3T3-E1<sup>51</sup>, linhagens celulares de fibroblastos NIH3T3 e células epiteliais L123<sup>35</sup>. Tais diferenças podem representar dados discrepantes quando utilizados para avaliar um mesmo biomaterial. Logo, existe a necessidade de normatizar o emprego das linhagens celulares para os diferentes biomateriais estudados, assim como atualizar as normas internacionais ISO a fim de atualizar para as constantes evoluções científicas que são apresentadas atualmente.

### Declaração de conflitos de interesses

Os autores afirmam que não houve nenhuma situação de conflito de interesse, tais como financiamento, emissão de pareceres, promoções ou participação em comitês consultivos ou diretivos, entre outras, que pudessem influenciar no desenvolvimento do trabalho.

### Referências

1. LILIENBLUM, W; Dekant, W; Foth, H; Gebel, T; Hengstler, J. G; Kahl, R; Kramer, P. J, Schweinfurth, H; Wollin, K. M. Alternative methods to safety studies in experimental animals: Role in the risk assessment of chemicals under the European chemicals legislation (Reach). **Aech Toxicol**, v. 82, n.4, p. 211-236, 2008.
2. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-1**: Biological evaluation of medical devices, Part 1: Evaluation and testing. 2003.
3. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity, 2009.
4. NARAYAN, R. **Biomedical Materials**. Springer, 2009.
5. HAUMAN, C. H. J; LOVE, R. M. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. **International Endodontic Journal**, 36: 75-85, 2003.
6. MURRAY, P. E; GODOY, C. G; GODOY, F. G. How is the biocompatibility of dental biomaterials evaluated? **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 12, E. 258-266, 2007.
7. SPIELMANN, H; GRUNE, B; LIEBSCH, M; SEILER, A; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.60, n.2, p.225-233.2008
8. HARRISON, R. G; GREENMAN, M. J; MALL, F.P; JACKSON, C.M. Observations of the living developing nerve fiber. **The anatomical Record**, v.1, n.5, p. 116-128, 1907.
9. CARREL, A. On the permanent life of tissues outside of the organism. **J Exp Med.**, v.15, n.5, p.516-28, 1912.
10. FELL, H.B. Tissue culture and its contribution to biology and medicine. **J Esp Biol**, v.57, n. 1, 1972.
11. MALAJOVICH, M. A. **Biociencia**. Rio de Janeiro: Biblioteca Max feffer, 2012.
12. LEVAI, L. F. **Direitos dos Animais**. São Paulo: Mantiqueira, 2011.
13. ANDRADE, A; PINTO, S. C; OLIVEIRA, R. S, **Orgs Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2002.
14. HUDU, A. S; ALSHRARI, A. S; SYAHIDA, A; SEKAWI, Z. Cell Culture, technology: Enhancing the culture of diagnosing human diseases. **Jornal of Clinical and Diagnostic Research**, vol 103, 2016.
15. THORPE, T. A. History of plant tissue culture. **Molecular Biotechnology**, v.37, n.2, p.169-180, 2007
16. ALBERTS, B. **Biologia Molecular da célula**. 5 ed, Porto alegre: Artmed, 2010

17. FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique**. 5 ed, Hoboken: John Wiley & Sons, 2005.
18. FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells, a manual of basic technique**, New York, 1983.
19. GRIFFITH, L.G; SWARTZ, M.A. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.7, p.211–224, 2006.
20. MIKOS, A. G; HERRING, S. W; OCHAREON, P; ELISSEFF, J; LU, H. H; KANDEL, R; SCHOEN, F. J; TONER, M; MOONEY, D; ATALA, A.; VAN DYKE, M. E; KAPLAN, D; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Engineering complex tissues. **Tissue Engineering**, v.12, n.12, p.3307–3339, 2006.
21. DESCOTES, J. From clinical to human toxicology: linking animal research and assessment in man. **Toxicology Letters**, v.140-141, p.3-10, 2003.
22. BERNAUER, U; OBEREMM, A; MADLE, S; GUNDERT-REMY, U. The use of *in vitro* data in risk assessment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n.3, p.176 -181, 2005;
23. BROADHEAD, C. L; BETTON, G; COMBES, R; DAMMENT, S; EVERETT D, GARNER C, GODSAFE Z, HEALING G, HEYWOOD R, JENNINGS M, LUMLEY C, SMITH D, STRUGHAN D, TOPHAM J, WALLIS R, WILSON S, BUCKLEY, P. Prospects for reducing and refining the use of dogs in regulatory toxicity testing of pharmaceuticals. **Hum Exp Toxicol**, v.19, n.8, p.440-447, 2000.
24. EISENBRAND, G; POOL-ZOBEL, B; BAKER, V; BALLS, M; BLAAUBOER, B. J; BOOBIS, A; CARERE, A; KEVEKORDES, S; LHUGUENOT, J. C; PIETERS, R; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food Chem Toxicol**, v.40, n.2-3, p.193-236, 2002.
25. HENDRIKSEN, C.F. Refinement, reduction and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. **Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 43, p.43-48, 2002.
26. RUSSELL, W.M. S; BURCH, R.L. **THE principles of humane experimental technique**. London, UK: Methuen; 1959 *apud* SPIELMANN H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M.; SEILER, A.; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.60, n.2-3, p.225-233, 2008.
27. CHU, P. K; LIU, X. **Biomaterials Fabrication and Processing Handbook**. London: CRC Press, 2008.
28. HENSTEN-PETTERSEN, N. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. **International Endodontic Journal**, v.21, p.89-99, 1988.
29. International organization for standardization. **ISO 7405: Dentistry Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry**. Test methods for dental materials, 1997.
30. International organization for standartion. **ISO 7405: Dentistry - Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry**, 2008.
31. JORGE, J. H; GIAMPAOLO, E. T; PAVARINA, A. C. Citotoxicidade dos materiais dentários. Revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.33, n.2, p.65-68, 2004.
32. SCHMALZ, G; ARENHOLT-BINDSLEV, D; HILLER, K. A. SCHEWEIKL, H. Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. **Eur J Oral Sci**, v.105, p.86-91, 1997.
33. ELIADES, T; PRATSINIS, H; KLETSAS, D. ELIADES, G; MAKOU, M. Characterization and cytotoxicity of ions released from stainless steel and nickel-titanium orthodontic alloys. **Am J Orthod Dentofacial Orthop**, v.125, n.1, p.24-9, 2004.
34. CRAIG, R. G; HANKS, C. T. Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys. **J Oral Pathol**, v.17, p.341-347, 1988.
35. HORNEZ, J. C; LEFÈVRE, A; JOLY, D; HILDEBRAND, H.F. Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. **Biomolecular Engineering**, v. 19, p.103-117, 2002.
36. WATAHA, J. C; HANKS, C. T; SUN, Z. Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. **Dent Mater**, v.10, p.156-161, 1994.
37. ESTRELA, C. **Metodologia Científica – Ensino e pesquisa em odontologia**. São Paulo: Artes Medicas, 2001.
38. SCHMALZ, G; Materials Science: Biological aspects. **J Dent Res**, v.81, n.10, p.660-663, 2002.
39. TYAS, M. J. A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. **J Dent Res**, v. 56, n.10, p.1285-1290, 1977.
40. MERYON, S. D; STEPHENS, P. G; BROWNE, R. M. A comparison of the in vitro cytotoxicity of two glass-ionomer cements. **J Dent Res**, v.62, n.6, p.769-773, 1983.
41. HUME, W. R. A new technique for screening chemical toxicity to the pulp from dental restorative materials and procedures. **J Dent Res**, v. 64, n.11, p. 1322-1325, 1985.
42. HUME, W. R. Methods of assessment in vitro of restorative material cytotoxicity using an intact human dentine diffusion step. **International Endodontic Journal**, v.21, p.85-88, 1988.
43. HANKS, C. T; CRAIG, R. G; DIEHL, M. L; PASHLEY, D. H. Cytotoxicity of dental composites and other materials in a new *in vitro* device. **J Oral Pathol**, v. 17, p.396-403, 1988.
44. HANKS, C. T; CRAIG, R. G; DIEHL, M. L. *In vitro* models of biocompatibility: A review. **Dent Mater**, 12: 186-193, 1996.
45. OSORIO, R. M; HEFTI, A; VERTUCCI, F. J; SHAWLEY, A. L. Cytotoxicity of endodontic materials. **Journal of endodontics**, v.24, n.2, p.91-96, 1998.
46. DAHL, J. E. Toxicity of endodontic filling materials. **Endodontic topics**, v.12, p.39-43, 2005.
47. SENNE, M. I; LEMOS, N; FIDEL, S. R; FIDEL, R. A. S. Avaliação da citotoxicidade dos três cimentos

endodônticos empregados na obturação do sistema de canais radiculares. **RSBO**, v.6, n.1, p.71-76, 2009.

48. THOMAS, M. I. **Avaliação in vitro da citotoxicidade do formocresol, do tricresol formalina e do formaldeído em três diferentes linhagens celulares.** Faculdade de biologia, PUC-RS, 2006.
49. FIDALGO, T. K. S; BARCELOS, R; PETRÓPOLIS, D. B; AZEVEDO, B.R; PRIMO, L. G; SILVA PRIMO, F, C. Citotoxicidade de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre osteoblastos humanos. **RGO**, v.57, n.3, p.317-321, 2009.
50. KIRMANIDOU, Y; SIDIRA, M; BAKOPOULOU, A; TSOKNIDAS, A; PRYMAK, O; PAPI, R; et al. Assessment of cytotoxicity and antibacterial effects of silver nanoparticle-doped titanium alloy surfaces. **Dental Materials**, v.10, p.E1-E14, 2019.
51. CAVALCANTI, J.H, L; MATOS, P.C; GOUVÊA, C.V.D; CARVALHO, W; CALVO-GUIRADO, J.L; ARAGONESES, J.M; et al. In vitro assessment of the functional dynamics of titanium with surface coating of hydroxyapatite nanoparticles. **Materials**, v.12, p.2-14, 2019.