

## Citotoxicidade dos Materiais Dentários. Revisão de Literatura

Janaina Habib JORGE<sup>a</sup>, Eunice Teresinha GIAMPAOLO<sup>b</sup>, Ana Cláudia PAVARINA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Pós-graduanda em Reabilitação Oral, Área de Prótese, Nível de Doutorado  
Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia - UNESP  
14801-903 Araraquara - SP

<sup>b</sup>Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese, Faculdade de Odontologia,  
Araraquara - UNESP, 14801-903 Araraquara - SP

Jorge JH, Giampaolo ET, Pavarina AC. Cytotoxicity of the dental materials. A literature review. Rev Odontol UNESP. 2004; 33 (2): 65-8.

**Resumo:** A biocompatibilidade dos materiais dentários tem sido avaliada por meio de estudos in vitro e in vivo e estudos clínicos em humanos. Os testes de citotoxicidade dos materiais dentários são considerados relativamente simples, reproduzíveis, efetivos e controlados. Diferentes parâmetros que avaliam a citotoxicidade dos materiais odontológicos podem ser utilizados para monitorar os efeitos citotóxicos, como a inibição do crescimento celular, a citólise, as modificações na membrana ou no citoplasma e as alterações na atividade metabólica. Os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas, não podendo ser extrapolados para seres humanos. Entretanto, a utilização de diferentes métodos proporciona informações mais completas sobre a citotoxicidade do material testado.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade; cultura de células; materiais dentários.

**Abstract:** Biocompatibility of dental materials has been evaluated by in vitro and in vivo studies and human clinical studies. Testing of dental materials by cell culture methods are relatively simple to perform, reproducible, cost-effective and can be carefully controlled. Different parameters are used to monitor cytotoxic effects of the dental materials, such as inhibition of cell growth, cytolysis, the effects on membrane or cytoplasmic markers and changes in metabolic activity. The data of cytotoxicity test cannot necessarily be extrapolated to clinical scenarios. However, the use of different assessment methods provides more complete information on the toxicity of the material under analysis.

**Keywords:** Cytotoxicity; cell culture; dental materials.

### Introdução

Por vários anos, as pesquisas clínicas procuraram estabelecer as propriedades físicas das resinas acrílicas<sup>4,19</sup> buscando melhorar a resistência à abrasão, a rugosidade, a estabilidade dimensional, a dureza, entre outras. Entretanto, o aparecimento de reações adversas na mucosa bucal pelo uso de próteses tem despertado o interesse dos pesquisadores em determinar o comportamento biológico desses materiais, objetivando buscar materiais chamados biocompatíveis com o meio bucal. A biocompatibilidade pode ser definida como a capacidade de um material de exercer suas funções específicas quando aplicado em tecidos vivos de determinado hospedeiro, sem, contudo, causar danos ou prejuízo ao mesmo<sup>2</sup>. Podem ser citadas como exemplo as resinas acrílicas para bases de próteses, as quais devem permanecer na cavidade bucal do paciente, em íntimo contato com a mucosa, sem causar irritação durante a utilização das próteses. Os materiais experimentais são avaliados de for-

ma a fornecer um rápido e consistente resultado em relação a sua atividade biológica.<sup>2</sup>

Fisher<sup>5</sup> dividiu as reações às resinas acrílicas utilizadas em odontologia em duas categorias: 1- dermatite alérgica de contato, que atinge dentistas e técnicos de prótese e 2-estomatite alérgica, que afeta os pacientes portadores de próteses.

Weaver, Goebel<sup>18</sup> relataram casos clínicos relacionados com os componentes liberados pelas resinas. Segundo os autores, as reações da cavidade bucal apresentam-se como ardência na língua, vermelhidão e erosão na mucosa. As causas mais prováveis dessas reações seriam traumas causados por próteses mal-adaptadas, doenças sistêmicas ou bucais não relacionadas com as resinas acrílicas, como a candidíase, e irritação química local e hipersensibilidade causadas pelas resinas acrílicas e por seus constituintes.

As substâncias tóxicas e seus efeitos sobre os tecidos têm

sido constatados por meio de estudo em animais, observações clínicas e culturas de células *in vitro*. Esses testes são divididos em: iniciais, os quais envolvem o método de cultura de células; testes secundários, que incluem os estudos com implantação dos materiais em tecidos subcutâneos, testes de sensibilidade e irritação na mucosa e os testes pré-clínicos, que verificam a irritação pulpar e dos implantes<sup>2,6,19</sup>. É importante lembrar que os resultados dos testes iniciais de citotoxicidade apresentam limitações quanto à sua correlação direta com situações clínicas<sup>2</sup>. Sendo assim, tanto os resultados destes testes quanto daqueles realizados em animais (secundários ou de aplicação) não podem ser de imediato extrapolados para as condições clínicas em seres humanos, porém são muito importantes pois determinam o comportamento biológico dos materiais e/ou de seus componentes<sup>2</sup>.

Dessa forma, os testes para a avaliação biológica dos materiais odontológicos foram divididos em vários níveis e os materiais em várias categorias: materiais restauradores, materiais protéticos, materiais endodônticos, materiais para o uso em periodontia e materiais utilizados em ortodontia<sup>2</sup>.

Este artigo tem como objetivo realizar uma revisão de literatura relacionada a diferentes testes de citotoxicidade de alguns materiais dentários.

## Revisão da literatura

Para avaliar a citotoxicidade dos materiais odontológicos podem ser realizadas análises quantitativas ou qualitativas. A análise quantitativa mede o número de células após proliferação ou inibição celular, o número de colônias formadas ou, ainda, quantifica as células por meio da contagem de seus componentes, como proteínas e mitocôndrias, ou pela proliferação ou inibição do material genético. A análise qualitativa avalia as células microscopicamente, observando as alterações morfológicas, como vacuolização citoplasmática e lise de suas membranas<sup>9</sup>.

O teste da citotoxicidade utilizando o método da cultura de células tem sido considerado relativamente simples, reproduzível, efetivo e controlado<sup>6,7</sup>. Hensten-Pettersen<sup>6</sup>, em 1988, realizou uma revisão de literatura com o objetivo de comparar os métodos que avaliam a citotoxicidade dos materiais odontológicos e observou que diferentes métodos podem ser utilizados para monitorar os efeitos citotóxicos, como a inibição do crescimento celular, a citólise, as modificações na membrana ou no citoplasma e as alterações na atividade metabólica. Muitos testes de citotoxicidade são realizados utilizando extratos obtidos a partir do contato entre as amostras dos materiais e o meio de cultura. Quando da obtenção de extratos, o autor relatou alguns dos fatores que podem influenciar nos resultados, como o tempo e a temperatura para a extração e a média entre o volume do meio e a superfície do corpo-de-prova. Contudo, o autor concluiu que alguns materiais odontológicos apresentaram-se tóxicos em alguns estudos e não

tóxicos em outros, dependendo das condições em que os testes foram realizados, mostrando, assim, a necessidade da padronização dos testes de citotoxicidade. Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade de resinas acrílicas para bases de próteses de acordo com o método de processamento, o tipo de polímero e as condições de armazenagem, Hensten-Pettersen, Wictorin<sup>7</sup>, em 1981, realizaram um estudo utilizando resinas termo e autopolimerizáveis. Para cada tipo de polimerização, auto e termo, dois tipos de processamento foram realizados. Os resultados mostraram que os diferentes métodos de processamento não influenciaram significativamente no efeito citotóxico. Em função do tipo de polimerização, houve crescimento celular menor para as resinas autopolimerizáveis em relação às termopolimerizáveis, e, para ambas, o crescimento celular foi menor em relação ao grupo controle.

Pelo fato dos testes de citotoxicidade *in vitro* apresentarem um grande número de métodos e materiais, as normas da *International Standard 10993-5*<sup>9</sup> (1992) padronizam esses testes e selecionam o método para análise da citotoxicidade mais apropriado para cada material. Com isso, três categorias são listadas: o teste que utiliza extratos, o teste onde há o contato direto do material com as células utilizadas e o teste onde o contato é indireto, por meio da difusão em ágar ou filtros Millipore. É importante lembrar que o contato direto de corpos-de-prova obtidos de diferentes materiais pode causar inibição do crescimento celular decorrente do contato físico e não das substâncias tóxicas liberadas<sup>14</sup>.

Quando da obtenção de extratos, vários fatores podem influenciar nos resultados, como o tipo e o volume do meio, a área do corpo-de-prova, o tempo e a temperatura para a extração<sup>6,19</sup>. Para que as substâncias sejam liberadas dos materiais a serem testados, pode-se utilizar como meio para a extração água destilada, solução salina ou meio de cultura com ou sem soro. A quantidade do material para a obtenção do extrato a ser testado pode ser expressa em peso ou em tamanho, e o volume do extrato obtido depende da relação entre a superfície do corpo-de-prova e o volume do meio<sup>19</sup>.

Os grupos controle negativo e positivo são bem definidos nessas normas, sendo o primeiro responsável por não provocar citotoxicidade, como, por exemplo, discos de polietileno, e o segundo responsável por promover a citotoxicidade, como o polivinilcloro. Quando da produção de extratos, determinados tempos e temperaturas são recomendados, e, na temperatura de 37 °C, o tempo não deve ser menor do que 24 horas. Além disso, a média entre a superfície do corpo-de-prova e o volume do meio utilizado para a extração deve estar entre 6 cm<sup>2</sup>/ml e 0,5 cm<sup>2</sup>/ml. O tipo celular L929 (fibroblastos de hamster) é uma das linhagens recomendadas pela ISO 10993-5 para a realização dos testes de citotoxicidade.

Os diferentes métodos que avaliam a citotoxicidade dos

materiais podem ser agrupados em categorias de acordo com o tipo de análise, tais como a avaliação dos danos pela morfologia celular, medida das células danificadas, medida do crescimento celular e medida de aspectos específicos do metabolismo celular.

Wennberg et al.<sup>20</sup>, em 1979, demonstraram uma técnica para a verificação da citotoxicidade de materiais odontológicos com a utilização de filtros Millipore. Para isso, fibroblastos de hamster (L 929) e células epiteliais humanas (HeLa) foram propagados em meio de cultura Eagle acrescido de 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 µl/ml de estreptomicina. Após dois dias de incubação, meio de cultura fresco foi adicionado, tendo sido a concentração final de células de  $1,5 \times 10^5$  cel/ml. Em seguida, filtros Millipore com 47 mm de diâmetro com poros de 0,45 µm, 3 µm ou 8 µm foram colocados sobre as placas com 50 mm de diâmetro e cobertos com 6 ml da suspensão de células. Para a formação de uma monocamada de células sobre a membrana, o conjunto foi armazenado por 24 horas a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> no ar. Depois desse período, o meio de cultura foi aspirado, e os pesquisadores colocaram novo meio contendo 1,5% de Bacto-ágar e aguardaram sua solidificação. Após a solidificação, a membrana e o ágar foram separados de cada placa e recolocados de maneira invertida. Dessa forma, as células ficaram para baixo e a membrana para cima. Em seguida, os corpos-de-prova dos materiais testados foram colocados sobre as membranas Millipore imediatamente após a mistura ou após um período de 5, 15 ou 60 minutos ou 24 horas. Os materiais testados foram: resina acrílica autopolimerizável Sevriton, cimento de silicato Super Syntrex e cimento de fosfato de zinco Pharmacent. Discos de teflon serviram como grupo controle negativo. Foi colocado um corpo-de-prova de cada material sobre cada membrana Millipore e, para cada grupo, foram realizados cinco experimentos. Os materiais testados permaneceram em contato com os filtros Millipore por um período de 24 horas. O efeito citotóxico foi analisado microscopicamente, após a coloração das células com eosina e hematoxilina e macroscopicamente através da formação do halo de inibição. A análise microscópica mostrou que, para todos os materiais, após 24 horas, havia confluência entre as células, ou seja, não havia espaços entre as mesmas. As células em contato com a membrana Millipore com poros de 0,45 µm mostraram-se morfolologicamente normais. Porém, as que estavam em contato com as membranas com poros de 3,0 µm e 8,0 µm mostraram-se morfolologicamente danificadas com citoplasma contraído e vacuolização. Na análise macroscópica, para a resina acrílica, ocorreu a formação do halo de inibição para os corpos-de-prova colocados imediatamente após a mistura. Após 5 minutos ou mais, ocorreu a formação de células sob a membrana. O cimento de silicato mostrou-se citotóxico em todos os períodos, e o cimento de fosfato de zinco apresen-

tou efeito citotóxico às células logo após a mistura e, após 24 horas, um pequeno efeito ainda estava presente. Os discos de teflon colocados sobre as membranas não causaram danos às células vistos micro e macroscopicamente. O teste realizado nesse estudo para análise da citotoxicidade de alguns materiais foi considerado simples e rápido, porém, mais informações sobre o crescimento ou morte celular podem ser obtidas com testes mais detalhados.

Outros testes têm sido utilizados para determinar a citotoxicidade dos materiais, como a incorporação de produtos radioativos, que avalia a síntese de DNA<sup>8,14-17</sup>, e o teste MTT (sal metil tetrazolium), descrito por Mosmann<sup>11</sup> em 1983, o qual reflete o metabolismo celular por meio da atividade mitocondrial<sup>2,3,12-14,16</sup>. Com eles, pode-se observar, através do método de cultura de células, a proliferação ou a inibição do crescimento celular decorrente do contato com substâncias citotóxicas.

Ciapetti et al.<sup>1</sup> avaliaram a interação entre células e biomateriais por meio do teste MTT e observaram como vantagem dessa técnica a capacidade de identificar a alteração no metabolismo e na função celular decorrente do contato entre as células e os materiais mesmo na ausência de morte celular.

Entretanto, Jorge et al.<sup>10</sup>, em 2004, realizaram um estudo utilizando extratos com a proposta de comparar os efeitos de tratamentos térmicos na citotoxicidade de três resinas para bases de próteses utilizando o teste de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina e o teste MTT. Para a análise do efeito citotóxico das substâncias liberadas pelos corpos-de-prova, foram obtidos extratos das substâncias hidrossolúveis dessas amostras. Para isso, três corpos-de-prova de cada grupo experimental, após terem recebido os tratamentos térmicos, foram colocados dentro de tubos de ensaio com 9 ml de meio de cultura Eagle e incubados a 37 °C por 24 horas. Durante esse período de incubação, as substâncias provavelmente tóxicas são difundidas para o meio de cultura, formando, assim, os extratos a serem utilizados nos testes de citotoxicidade. Um tubo de ensaio contendo apenas 9 ml de meio de cultura foi armazenado sob as mesmas condições, servindo, assim, como grupo controle negativo. Os resultados desse estudo mostraram que as substâncias liberadas das três resinas testadas foram mais citotóxicas para as células L 929 quando comparadas ao controle negativo no teste de incorporação de <sup>3</sup>H-timidina. Os tratamentos térmicos não reduziram a citotoxicidade dos materiais avaliados. O teste de incorporação <sup>3</sup>H-timidina classificou os materiais como discretamente citotóxicos, e o MTT, como não citotóxicos sendo, portanto, considerado menos sensível.

Da mesma forma, Tang et al.<sup>14</sup> mostraram que o teste da incorporação de <sup>3</sup>H-timidina foi mais sensível do que o teste MTT. Além disso, compararam diferentes metodologias que avaliam a citotoxicidade dos materiais resinosos. Os autores observaram que o contato direto dos discos de vi-

dro com os fibroblastos causou inibição do crescimento em comparação com as células cultivadas em contato indireto, tanto para o teste MTT como para o teste da incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina. Assim, os autores concluíram que, apesar da necessidade do grupo controle, o contato direto dos discos de vidro com as células pode influenciar na viabilidade celular, não pela liberação de substâncias tóxicas, mas sim por fatores físicos. Além disso, os resultados mostraram que a remoção da camada de inibição de oxigênio dos corpos-de-prova reduziu a citotoxicidade dos materiais. Os autores concluíram também que a utilização de diferentes métodos fornece informações mais completas sobre a citotoxicidade dos materiais resinosos.

Portanto, pode-se observar que são várias as formas de se testar a citotoxicidade dos materiais odontológicos. Contudo, tais testes, quando adequadamente padronizados, o que é absolutamente necessário, são muito importantes, pois determinam o comportamento biológico dos materiais e/ou de seus componentes, fornecendo um rápido e consistente resultado com relação a sua atividade biológica.

## Conclusão

- Os testes de citotoxicidade utilizando o método da cultura de células são muito importantes pois determinam o comportamento biológico dos materiais dentários e/ou de seus componentes;
- para avaliar os materiais, é aconselhável a utilização de diferentes métodos para a obtenção de informações mais completas sobre a citotoxicidade do material testado;
- o teste de citotoxicidade pode ser realizado por várias metodologias, porém todas devem ser regulamentadas e padronizadas para serem reproduzidas em qualquer laboratório.

## Referências

1. Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*. 1993; 14: 359-64.
2. Costa CAS. Testes de citotoxicidade em cultura de células. In: Estrela C. Metodologia científica: ensino e pesquisa em odontologia. São Paulo: Artes Médicas; 2001. p.145-60.
3. Costa CAS, Edwards CA, Hanks CT. Cytotoxic effects of cleansing solutions recommended for chemical lavage of pulp exposures. *Am J Dent*. 2001; 14: 25-30.
4. Craig RG. Prosthetics applications of polymers. In: Craig RG. Restorative dental materials. 10<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby; 1997. p. 500-51.
5. Fisher AA. Allergic sensitization of the skin and oral mucosa to acrylic denture materials. *J Am Med Assoc*. 1954; 18: 238-42.
6. Hensten-Pettersen A. Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J*. 1988; 21: 89-99.
7. Hensten-Pettersen A, Wictorin L. The cytotoxic effect of denture base polymers. *Acta Odontol Scand*. 1981; 39: 101-6.
8. Imazato S, Tarumi H, Ebi N, Ebisu S. Cytotoxic effects of composite restorations employing self-etching primers or experimental antibacterial primers. *J Dent*. 2000; 28: 61-67.
9. International Standard Organization. ISO 10993-5:1992. Biological evaluation of medical devices – part 5: tests for cytotoxicity: in vitro methods. 1992.
10. Jorge JH, Giampaolo ET, Vergani CE, Machado AL, Pavarina AC, Carlos IZ. Cytotoxicity of denture base resins. Effect of water-bath and microwave post-polymerization heat-treatments. *Int J Prosthodont*. 2004; 17: 340-4.
11. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65: 55-63.
12. Niu Q, Zhao C, Jing Z. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 2001; 251: 11-9.
13. Rose EC, Bumann J, Jonas IE, Kappert HF. Contribution to the biological assessment of orthodontic acrylic materials. *J Orofac Orthop*. 2000; 61: 246-57.
14. Tang ATH, Li J, Ekstrand J, Liu Y. Cytotoxicity tests of in situ polymerized resins: methodological comparisons and introduction of a tissue culture insert as a testing device. *J Biomed Mater Res*. 1999; 45: 214-22.
15. Turner TD, Spyratou O, Schmidt J. Biocompatibility of wound management products: standardization of and determination of cell growth rate in L 929 fibroblast cultures. *J Pharm Pharmacol*. 1989; 41: 775-80.
16. Upadhyay P, Bhaskar S. Real time monitoring of lymphocyte proliferation by an impedance method. *J Immunol Methods*. 2000; 244: 133-7.
17. Wagner U, Burkhardt E, Failing K. Evaluation of canine lymphocyte proliferation: comparison of three different colorimetric methods with the  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation assay. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999; 70: 151-9.
18. Weaver RE, Goebel WM. Reactions to acrylic resin dental prostheses. *J Prosthet Dent*. 1980; 43: 138-42.
19. Wennberg A. Cell culture in the biological evaluation of dental materials: a review. *ATLA*. 1986; 13: 194-202.
20. Wennberg A, Hasselgren G, Tronstad L. A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on Millipore Filters. *J Biomed Mater Res*. 1979; 13: 109-20.