

Ensaio de citotoxicidade de implantes de superfície lisa e quimicamente ativada da SIN.

Test for cytotoxicity of SIN dental implants with smooth and chemical treatment surface



Marcelo José Carbonari*
Sizue Ota Rogero*
Ariel Lenharo**
Luiz Antônio Pugliesa***

RESUMO

O efeito da toxicidade de implantes dentais de superfície lisa e quimicamente ativada da empresa SIN (Sistema de Implante Nacional) foi determinado por meio de testes de citotoxicidade utilizando um método quantitativo de contagem em cultura utilizando células de ovário de hamster da linguagem da American Type Culture Collection (ATCC) em contato com extratos diluídos dos materiais. Solução fenol (0,02%) e Ticp foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. O potencial citotóxico pode ser quantitativamente determinado pelo índice citotóxico, expresso como IC(50%), facilmente determinado plotando em um gráfico o

percentual do número de colônias do controle e a concentração do extrato. IC(50%) é a concentração do extrato necessário para matar metade da população de células, ou a concentração do extrato que inibi a formação de colônias em 50% do valor do controle. O controle negativo não apresentou citotoxicidade ($Ic(50%) > 100$), controle positivo apresentou citotoxicidade ($Ic(50%) = 72$). Todos extratos obtidos dos implantes dentais de superfície lisa e quimicamente ativada não apresentam citotoxicidade.

Unitermos: Citotoxicidade, implantes, microscopia.

ABSTRACT

The toxic effect of the SIN (Sistema de Implante Nacional) dental implants with smooth and chemical treatment surface were evaluated by a test for cytotoxicity by a quantitative method of colony suppression assay using chinese hamster ovary (CHO) cells culture, from American Type culture collection (ATCC) in contact with diluted extracts of the materials. Phenol solution (0.02%) and Ticp were used as positive and negative controls, respectively. The cytotoxic potential can be quantitatively determined by the cytotoxic index, expressed as IC(50%), which is easily determined by plotting the percentage of

the colony number in relation to CHO cell control and the concentration of the extract. $Ic(50%)$ is concentration of the extract. necessary to kill half the cell population, of the extract concentration which suppresses colony formation to 50% of the control value. The negative control not present any cytotoxic effect ($Ic(50%) > 100$), and the positive control present cytotoxic effect ($Ic(50%) = 72$). All the extracts obtained from dental implants with smooth and chemical treatment surface were not cytotoxic.

Key words: Cytotoxicity, implants, microscopy

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

**Especialista em implantodontia e prótese/Prof. da SIN - Sistema de Implante Nacional/Doutorado em implantodontia UNESP - Araçatuba.

***Engenheiro da SIN - Sistema de Implante Nacional.

Introdução

No estudo da biocompatibilidade de um material ou dispositivo que tem como objetivo final serem utilizados como biomaterial ou implante, a ISO 10993⁽¹⁾ sugere como primeiro teste o ensaio *in vitro* de citotoxicidade. Os testes *in vitro* devem ser utilizados para selecionar os materiais ou dispositivos para que seja minimizado o uso de animais de laboratório, uma vez que os ensaios *in vivo* devem ser realizados somente com os materiais ou dispositivos que não apresentarem toxicidade. O teste de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro é um ensaio *in vitro* quantitativo, eficaz, de baixo custo e reprodutível. A quantificação da citotoxicidade é feita pela medida da viabilidade celular e obtenção do índice de citotoxicidade $IC_{50\%}$.

Metodologia

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-5⁽¹⁾, Ciapetti e col.⁽²⁾ e trabalhos anteriores⁽³⁻⁴⁾, colocando-se os extratos dos implantes de superfície lisa e de superfície quimicamente ativada, em diluições seriadas, em contato com cultura de células em microplaca de 96 cavidades. A viabilidade celular foi avaliada pela incorporação do corante

vital vermelho neutro pelas células vivas e íntegras.

Cultura celular: foi utilizada a linhagem celular NCTC clone 929 de tecido conectivo de camundongo, originária da American Type Culture Collection [ATCC-(CCL1)]. E o meio de cultura foi o meio de Eagle (MEM) com adição de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (MEM-uso).

Preparo dos extratos: foi realizado de acordo com a norma ISO 10993-5⁽¹⁾.

1. Controle positivo: solução de fenol 0,2% em tampão fosfato-salina (PBS) – diluir 1/10 em meio MEM-uso.
2. Controle negativo: chapas de Ti comercialmente puro, atóxico: 1cm²/mL de meio MEM-uso durante 10 dias em estufa a 37°C (Figura 1).
3. Implantes: cada implante foi colocado em 2mL de MEM-uso (1cm²/mL) durante 10 dias de extração em temperatura de 37°C (Figura 2).

Após o tempo de incubação de 10 dias foi feita uma diluição seriada de cada extrato, com meio de cultura MEM-uso obtendo-se concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25% (Figura 3).

Preparo da suspensão celular: Após crescimento confluyente das células NCTC-clone 929 em garrafa de cultura celular foi realizado o destaque das células utilizando-se solução de tripsina. O número de células foi contado em hemocitômetro e a suspensão celular foi acertada para cerca de $2,5 \times 10^5$ células por mL.

Preparo da microplaca: 200mL da suspensão celular foram distribuídas em cada cavidade (5×10^4 céls/cavidade). A placa foi incubada em estufa a 37°C e atmosfera úmida com 5% CO₂ por cerca de 24h, para atingir a confluência desejada (Figura 4).

Decorrido o tempo de incubação para a adesão e cultivo das células na microplaca, o meio de cultura foi desprezado e substituído pelas diluições dos extratos, em triplicata. Controles positivo e negativo receberam o mesmo procedimento da amostra (Figuras 5 e 6). Nas cavidades do controle de células (100% de viabilidade celular) o meio foi substituído por meio MEM-uso fresco.

A microplaca foi então mantida em estufa a 37°C e atmosfera úmida com 5%CO₂ por 24h (Figura 7).

Após esse período os meios foram trocados por meio MEM fresco contendo 50mg do corante vermelho neutro/mL e a placa foi

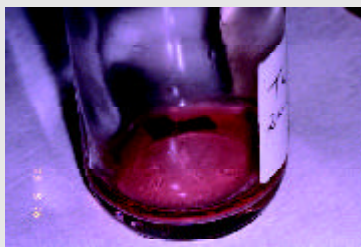


Fig. 1 – Chapas de titânio comercialmente puro utilizado como controle negativo.



Fig. 2 – Implantes de superfície lisa e quimicamente ativada imersos em meio MEM-uso.



Fig. 3 – Diluição dos extratos com meio de cultura MEM-uso nas concentrações 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 e 100%.

incubada por 3h para a incorporação do corante (Figuras 8 e 9).

Após esta etapa a placa foi lavada duas vezes com PBS (Figura 10) e uma vez com solução de lavagem (1% de CaCl_2 em formol 0,5%) e em seguida cada poço recebeu 200mL da solução de extração (50% de etanol em ácido acético 2%) (Figura 11).

A placa, após ser agitada por 10 min, foi levada para leitura de densidade óptica num espectrofotômetro leitor de ELISA em 540nm (Figura 12).

Resultados e discussão

A média das leituras de densidade óptica da triplicata de cada diluição foi calculada e comparada com a média do controle de células, obtendo-se a porcentagem de sobrevivência das células em cada diluição. Projetando-se em gráfico a porcentagem de sobrevivência em função da diluição do extrato obteve-se uma curva, na qual pode-se encontrar o índice de citotoxicidade ($\text{IC}_{50\%}$) do material testado. $\text{IC}_{50\%}$ significa a concentração do extrato que lesa ou mata 50% da população celular no ensaio de citotoxicidade.

A Figura 13 apresenta as curvas de viabilidade celular do teste de citotoxicidade dos implantes SIN de superfície lisa e quimicamente ativada bem como dos controles positivo e negativo.

Pode ser observado através dos resultados da Figura 13 que o controle positivo (solução fenol), apresentou toxicidade ($\text{IC}_{50(\%)} = 72$). Os implantes de superfície lisa e quimicamente ativada apresentaram comportamento semelhante ao controle negativo (titânio comercialmente puro), ou seja, não apresentaram efeito tóxico ($\text{IC}_{50(\%)} > 100$).

A superfície das amostras ensaiadas foi verificada em um micros-

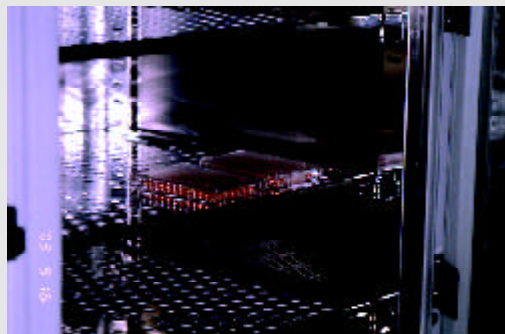


Fig. 4 – Microplaca contendo suspensão celular de NCTC – clone 929 da ATCC-CCL1.

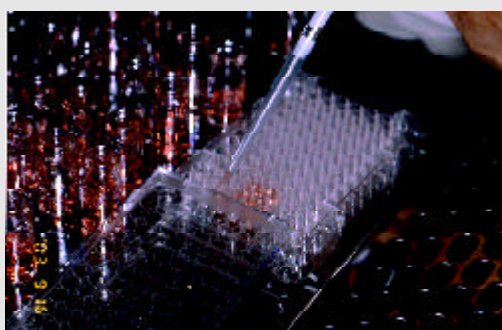


Fig. 5 – Pipetagem das diluições na microplaca contendo as células aderidas.

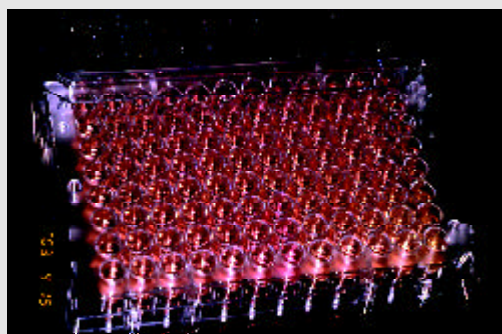


Fig. 6 – Microplaca após a pipetagem das diluições dos extratos, controle negativo e controle positivo.

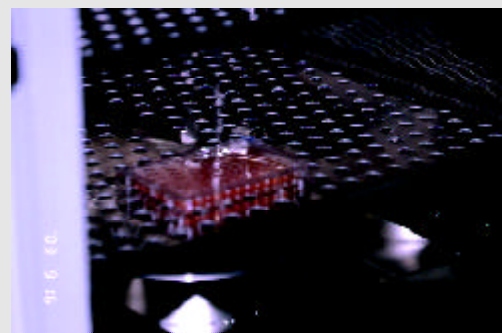


Fig. 7 – Vista frontal da estufa e microplaca.



Fig. 8 – Meio de cultura (extratos) sendo descartado.



Fig. 9 - Substituição por meio MEM fresco contendo vermelho neutro.

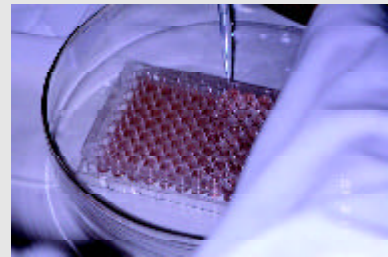


Fig. 10 – Microplaca lavada com PBS.

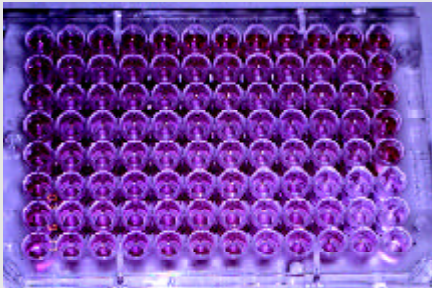


Fig. 11 - Microplaca após receber 200mL da solução de extração.



Fig. 12 – Leitor de ELISA: Microplaca sendo agitada para posterior leitura de densidade óptica.

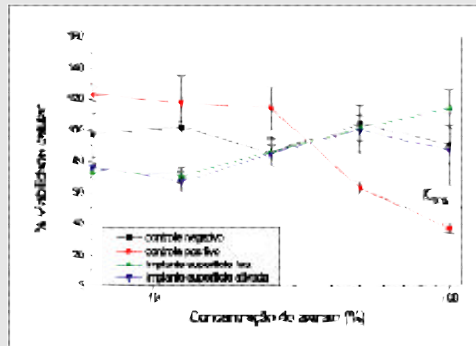


Fig. 13 – Curvas de viabilidade celular do teste de citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro dos implantes de superfície lisa e quimicamente ativada.



Fig. 14 – Micrografia de implante de superfície lisa submetido ao ensaio de citotoxicidade.

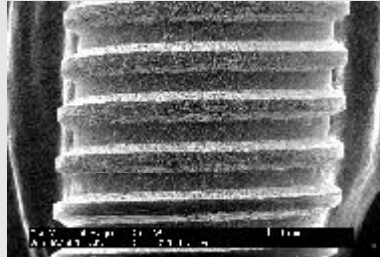


Fig. 15 – Micrografia de implante de superfície quimicamente ativada submetido ao ensaio de citotoxicidade.

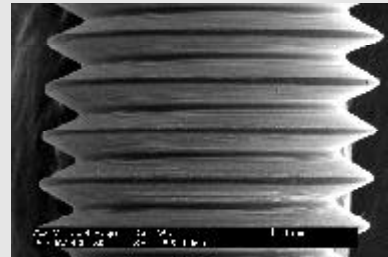


Fig. 16 – Micrografia de implante de superfície lisa não submetido ao ensaio de citotoxicidade

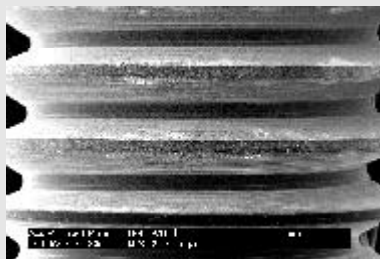


Fig. 17 – Micrografia de implante de superfície quimicamente ativada não submetido ao ensaio de citotoxicidade.

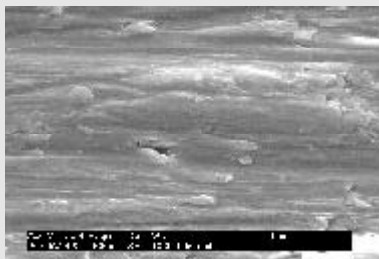


Fig. 18 – Micrografia de implante de superfície lisa submetido ao ensaio de citotoxicidade.

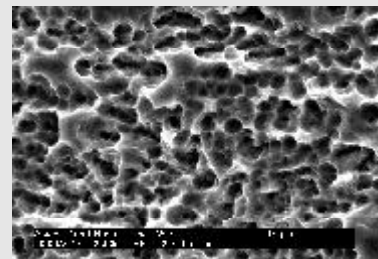


Fig. 19 – Micrografia de implante de superfície quimicamente ativada submetido ao ensaio de citotoxicidade.

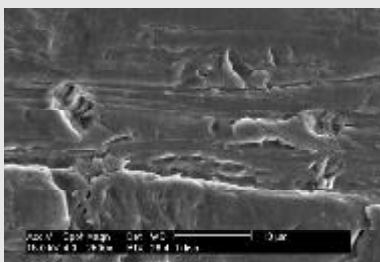


Fig. 20 – Micrografia de implante de superfície lisa não submetido ao ensaio de citotoxicidade.

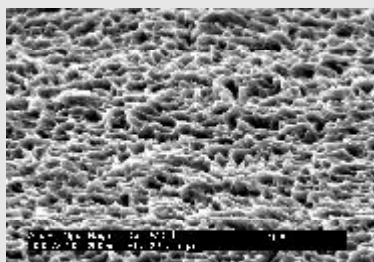


Fig. 21 – Micrografia de implante de superfície quimicamente ativada não submetido ao ensaio de citotoxicidade.

cópio eletrônico de varredura (Philips modelo XL 30 acoplado a um equipamento para espectroscopia de energia dispersiva) e comparada com a superfície de implantes não submetidos ao ensaio de citotoxicidade.

As Figuras 14 a 21 mostram as micrografias da superfície dos implantes com superfície lisa e quimicamente ativada submetidas ou não ao ensaio de citotoxicidade.

Verifica-se nas Figuras 14 a 21 que os implantes não sofreram ataque químico do meio MEM-uso utilizado para o ensaio de citotoxicidade.

Pode ser observado nas micrografias dos implantes quimicamente ativados que a superfície apresenta uma distribuição uniforme de poros (Figuras 19 e 21). Não foram observadas irregularidades causadas pelo processo de ativação química.

Os resultados obtidos na espectroscopia de energia dispersiva (EDS) (cinco regiões analisadas por amostra) indicaram apenas a presença do elemento titânio.

Conclusão

O potencial citotóxico pode ser quantificado através do índice de

citotoxicidade, expressado como $IC_{50(\%)}$. Este índice é facilmente determinado no gráfico do percentual da viabilidade celular em relação à concentração do extrato, como pode ser observado no resultado do teste de citotoxicidade.

Neste ensaio somente o controle positivo, solução de fenol, apresentou potencial citotóxico. Os implantes SIN de superfície lisa e de superfície quimicamente ativada não apresentaram citotoxicidade.

Os implantes de superfície lisa e quimicamente ativada não possuem irregularidades causadas pelos processos de usinagem e ataque químico. Apenas o elemento titânio foi detectado nos implantes.■

Agradecimentos

Agradecemos à Dra Áurea S. Cruz e à pesquisadora Tamiko I. Ikeda do Instituto Adolfo Lutz pelo fornecimento das células em cultura, dentro do projeto de Cooperação Técnica entre as instituições, ao técnico Celso Vieira de Moraes do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pela operação do MEV e ao estudante José S. Sousa pela assistência técnica no ensaio.

Referências Bibliográficas

1. ISO document 10 993-5, 1992 Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods.
2. Ciapetti, G., Granchi, D., Verri, E., Savarino, L., Cavedagna, D., Pizzoferrato, A. Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials, *Biomaterials*, 17: 1259-1264, 1996.

3. Rogero, S.O., Malmonge, S.M., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Miyamaru, L.L., Cruz, A.S. Biocompatibility study of polymeric biomaterials, *Artificial Organs*, 27(5): 412-415, 2003.
4. Rogero, S.O., Lugão, A.B., Ikeda, T.I., Cruz, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, 6(3), 2003 - No Prelo.