



Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e  
Clínica Integrada

ISSN: 1519-0501

apesb@terra.com.br

Universidade Federal da Paraíba  
Brasil

Andrade VITRAL, Julia Cristina de; Alves SILVA, Adriana; Aparecida de SOUZA, Maria; FERREIRA, Ana Paula; Farinazzo VITRAL, Robert Willer  
Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica  
Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada, vol. 8, núm. 3, septiembre-diciembre, 2008, pp. 359-365  
Universidade Federal da Paraíba  
Paraíba, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63711711017>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica  
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal  
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Avaliação da Citotoxicidade de Materiais Odontológicos Através do Método de MTT e Produção de Óxido Nítrico: Descrição de uma Técnica

## Cytotoxicity of Dental Materials by the MTT Assay and Nitric Oxide Production: Description of a Technique

Julia Cristina de Andrade VITRAL<sup>I</sup>

Adriana Alves SILVA<sup>I</sup>

Maria Aparecida de SOUZA<sup>II</sup>

Ana Paula FERREIRA<sup>III</sup>

Robert Willer Farinazzo VITRAL<sup>IV</sup>

<sup>I</sup>Mestre em Saúde pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil.

<sup>II</sup>Professora Visitante da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil.

<sup>III</sup>Professora Associada do Departamento de Imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil.

<sup>IV</sup>Professor Associado do Departamento de Odontologia Social e Infantil da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora/MG, Brasil.

### RESUMO

**Introdução:** Um dos problemas apresentados pelos materiais utilizados em Odontologia está associado à biocompatibilidade, já que poucos são totalmente inertes do ponto de vista biológico. Os materiais a serem usados em contato com tecidos humanos devem, portanto, ser testados com o objetivo de simular reações biológicas e ajudar no entendimento das respostas obtidas. Os estudos *in vitro* constituem a primeira etapa destes testes. A *International Organization Standardization* (ISO) e o *Council on Dental Materials Instruments and Equipment of the American Dental Association* recomendam o uso de uma bateria de testes *in vivo* e *in vitro* para estudar a biocompatibilidade dos materiais e, de acordo com as normatizações, a principal categoria de testes com este objetivo é a dos testes de biocompatibilidade. Dentre estes testes o protocolo MTT assay é um dos mais utilizados para se determinar a citotoxicidade de materiais de diversas naturezas sobre células em cultura. A citotoxicidade pode também estar relacionada às moléculas que, ao serem liberadas a partir de um determinado estímulo podem ocasionar danos aos tecidos. Estudos têm relatado a presença de uma molécula com potencial citotóxico, o óxido nítrico, em tecidos da cavidade bucal e seu envolvimento em doenças inflamatórias.

**Objetivo:** Apresentação de uma metodologia de avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método MTT e da análise da produção de óxido nítrico (NO), o qual está relacionado com a ação destes materiais na indução da resposta inflamatória.

**Conclusão:** Verifica-se nesta metodologia que o ensaio de MTT pode ser facilmente adaptado para testes de citotoxicidade de materiais de diferentes composições e a mensuração da produção de óxido nítrico através do método de Griess fornece dados adicionais para a análise da citotoxicidade.

### ABSTRACT

**Introduction:** Biocompatibility is one of the issues of dental materials, since very few of them are completely inert from the biological standpoint. Therefore, the materials to be used in contact with human tissues should be previously tested in order to simulate possible biological reactions and help understanding the obtained responses. *In vitro* studies constitute the first stage of these tests. The International Organization for Standardization (ISO) and the American Dental Association's Council on Dental Materials, Instruments and Equipment advise the use of a set of *in vivo* and *in vitro* tests to study the biocompatibility of dental materials and, according to their regulations, biocompatibility tests constitute the main category of these tests. The MTT assay is one of the most commonly used tests for evaluating the cytotoxicity of materials from different origins on cell cultures. Cytotoxicity may also be related to the molecules released due to a certain stimulus, which may cause damage to the biologic tissues. Studies have pointed to the presence of nitric oxide as a molecule with cytotoxic potential on the oral tissues and have indicated its involvement in inflammatory diseases.

**Objective:** To present a methodology for assessing the cytotoxicity of dental materials by the MTT assay and the analysis of nitric oxide production, which is related to the materials' action on the induction of inflammatory responses.

**Conclusion:** This methodology shows that the MTT assay can be easily adapted for testing cytotoxicity of materials with different compositions, and that the measurement of nitric oxide production by the Griess method provides additional data for cytotoxicity analysis.

### DESCRIPTORES

Macrófagos; Materiais dentários; Testes imunológicos de

### DESCRIPTORS

Macrophages; Dental materials; Cytotoxicity tests immunologic; Nitric

## INTRODUÇÃO

Um aumento significativo do estudo da biocompatibilidade dos materiais odontológicos é uma realidade para pesquisadores das diversas especialidades. Vários materiais e acessórios utilizados podem causar efeitos adversos em situações clínicas e os mecanismos pelos quais muitas reações são observadas não estão totalmente elucidados. O conhecimento direcionado à composição dos materiais, suas propriedades alergênicas e irritantes e sua toxicidade são essenciais na avaliação das etiologias dos sintomas clínicos e têm por finalidade a obtenção de um diagnóstico correto<sup>1</sup>.

Os testes de biocompatibilidade são essenciais na aceitação do material, juntamente com os testes que avaliam suas propriedades físicas. Todavia, a pesquisa da biocompatibilidade de materiais é complexa e envolve tipos sofisticados de testes biológicos, físicos e análise de risco/benefício<sup>2-4</sup>.

Os testes de citotoxicidade são recomendados para todos os materiais usados na área de saúde. Os modelos de estudo *in vitro* são uma alternativa imprescindível na pesquisa de citotoxicidade de materiais odontológicos nos dias atuais<sup>5</sup>. Estes testes permitem uma rápida avaliação, melhoram os protocolos padronizados, produzem dados quantitativos e comparáveis, e devido à sua sensibilidade, permitem que os materiais tóxicos sejam descartados previamente aos experimentos em animais<sup>6</sup>.

O grande número de produtos lançados no mercado e, conseqüentemente, a serem avaliados, leva a uma urgente necessidade de aprimorar as metodologias e escolher entre elas aquelas que possam responder melhor quanto à presença de possíveis elementos tóxicos. O presente trabalho objetivou apresentar uma metodologia de avaliação da citotoxicidade de materiais odontológicos através do método MTT e da análise da produção de óxido nítrico (NO) que está relacionado com a ação destes materiais na indução da resposta inflamatória.

## REVISÃO DA LITERATURA

O campo dos materiais odontológicos compartilha, com outras esferas da biotecnologia, o problema da biocompatibilidade, isto é, da coexistência dos materiais manufaturados com tecidos corporais e fluidos que devem permanecer no organismo humano, por períodos de tempo variados, sem irritar os tecidos moles. Poucos materiais odontológicos, ou talvez nenhum, são totalmente inertes do ponto de vista fisiológico, pois contém uma variedade de componentes com potencialidades tóxicas ou irritantes<sup>7,8</sup>. Convencionalmente, biocompatibilidade equivale à ausência de interação entre um material e os

atuação do material com uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma aplicação específica<sup>4</sup>. Essa qualidade depende da sua composição, posição e interação com a cavidade bucal, ou seja, se liberam seus componentes e se estes são tóxicos, imunogênicos ou mutagênicos<sup>2</sup>. Quando um material é colocado em um tecido vivo, interações com sistemas biológicos complexos ocorrem e resultam em algum tipo de resposta biológica. Essas interações dependem do material, do hospedeiro e das forças e condições colocadas sobre o material. De qualquer maneira, o material afeta o hospedeiro e o hospedeiro afeta o material<sup>4,9</sup>.

Embora as reações adversas com materiais odontológicos não sejam comuns, elas podem ser locais ou sistêmicas e acontecer com todas as classes de materiais. Todavia, o número de reações adversas nem sempre é totalmente relatado ou apurado, sendo necessário um maior número de documentação e estudos<sup>10,11</sup>. Há um esforço significativo sendo feito para a padronização de testes *in vitro*. Contudo, a tecnologia se move muito mais rápido que a normatização, o que faz o desenvolvimento das normas serem um processo difícil e quase ininterrupto. A *International Organization Standardization* (ISO) e o *Council on Dental Materials, Instruments and Equipment of the American Dental Association* recomendaram o uso de uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo* para estudar a biocompatibilidade dos materiais, visto que se acreditava que nenhum teste seria capaz de definir biocompatibilidade. De acordo com estas normatizações a maior categoria de testes para avaliação de materiais é o teste de citotoxicidade. Esforços têm sido feitos para definir e controlar as variáveis que afetam estes testes<sup>3</sup>. Com relação aos materiais odontológicos, existem reações biológicas divididas em tóxicas, inflamatórias, alérgicas e mutagênicas. A toxicidade foi a primeira resposta estudada, já que os materiais podem ser capazes de liberar substâncias para o corpo dos pacientes. A inflamação é um segundo tipo fundamental de uma complexa resposta biológica envolvendo a ativação do sistema imune do hospedeiro e que pode resultar de alergias, de toxicidade ou pode ainda, preceder esse processo<sup>12</sup>.

A citotoxicidade é um fenômeno complexo *in vivo*, o qual pode resultar em um amplo espectro de efeitos, desde a morte celular até alterações metabólicas, onde ocorrem alterações funcionais ou em alguma via específica. O efeito citotóxico é causado por um irritante primário e as reações podem variar de um eritema a necroses, dependendo da toxicidade do irritante primário, da sua concentração e do tempo de exposição<sup>1</sup>. Testar a citotoxicidade é a primeira etapa para assegurar a biocompatibilidade de um dispositivo médico e pode ser medida através de três tipos de testes: *in vitro*, utilizando-se culturas de células, *in vivo*, utilizando-se experimentos em animais e através de estudos clínicos. Um resultado negativo indicará que o

quantidade é insuficiente para causar efeitos agudos em células isoladas do corpo. Entretanto, apesar do mérito do teste, não podemos afirmar que o material pode ser considerado biocompatível, uma vez que o teste de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para análise do material em estudo. Por outro lado, um teste de citotoxicidade positivo pode ser um sinal que o material contém uma ou mais substâncias lixiviáveis que podem apresentar importância clínica<sup>4,13</sup>.

Os testes *in vitro* são feitos em tubos de ensaio, placas de cultura celular ou em outro local fora do organismo vivo. Estes testes são muito variados e geralmente células ou bactérias são deixadas em contato com o material estudado. O efeito do material normalmente é determinado pela mensuração do número, pela média de crescimento, pela função metabólica, ou outra função das células expostas aos materiais<sup>4</sup>. Os sistemas biológicos usados nos testes de citotoxicidade *in vitro* podem ser de culturas de órgãos, cultura de células ou organelas. O sistema mais utilizado para os testes em materiais odontológicos é o de cultura celular; algumas experiências têm utilizado cultura de órgãos (germes dentários). A cultura de células se refere àquela derivada de células dispersas retiradas do tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular já estabelecida em cultura por desagregação enzimática, mecânica ou química. Esses testes são vantajosos porque são experimentalmente controláveis, permitem uma padronização da metodologia, são rápidos, relativamente baratos e simples. Eles são tidos como éticos e legais podendo substituir experimentos em animais e seres humanos nas pesquisas e, devido ao fato de serem executados longe do contato com o organismo, muitas interações complexas, que mascaram a resposta biológica no corpo, não estão presentes. Conseqüentemente, os resultados dos testes *in vitro*, em relação ao material, podem ser mal conduzidos na resposta biológica final<sup>4,14</sup>.

O contato célula/material pode ser por contato direto, indireto ou através da diluição de extrato. No contato direto, as células crescem ao lado ou sobre o material testado. No contato indireto, material e células são separados por uma barreira permeável (discos de dentina, filtro de Millipore, camada de ágar). Na diluição de extratos os corpos de prova de dimensões padronizadas (inteiros ou fragmentados) são mantidos em contato com meio de cultura e este meio contendo o extrato do material é colocado sobre as células ao invés do próprio material<sup>5,14</sup>. A citotoxicidade avaliada em culturas celulares pode ser determinada através de avaliação quantitativa ou qualitativa. Através da microscopia celular é realizada a avaliação qualitativa: são observadas mudanças na morfologia geral das células, vacuolização, destacamento, lise celular ou de membrana, e, o resultado é numérico (ex. 0, 1, 2, 3) ou pode ser descrito como atóxico, leve, moderado ou severo

a morte celular, a proliferação celular ou a formação de colônias celulares. Meios objetivos quantificam o número de células, a quantidade de proteínas, a liberação de enzimas, a liberação ou redução de corante vital ou algum outro parâmetro de medida<sup>15</sup>.

Vários protocolos têm sido utilizados nos testes de viabilidade e citotoxicidade de materiais, incluindo ensaio de Trypan Blue, liberação de cromo, avaliação da síntese de DNA, avaliação do metabolismo celular (MTT assay), microscopia eletrônica de varredura (MEV). Por ser um ensaio relativamente simples de ser realizado, apesar de criterioso como todos os outros, o experimento de MTT é um dos mais utilizados para se determinar a citotoxicidade de materiais de diversas naturezas sobre células em cultura<sup>5</sup>. Ao se testar a citotoxicidade, os parâmetros a serem analisados são os tipos de células empregados, a duração da exposição, as formas físicas dos dispositivos e os métodos de avaliação. Destes, os tipos de células é que podem ser o fator mais importante, porque cada função e mecanismo celular são basicamente diferentes<sup>16</sup>. A citotoxicidade pode também estar relacionada com moléculas, que, ao serem liberadas a partir de um determinado estímulo, podem ocasionar danos aos tecidos. Recentemente, estudos têm relatado a presença de uma molécula com potencial citotóxico, o óxido nítrico (NO), em tecidos dentais e seu envolvimento em doenças inflamatórias bucais<sup>17,18</sup>.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula reguladora, produzida principalmente por macrófagos ativados, de extrema importância nos processos de resposta imune, inflamação, metabolismo ósseo e apoptose. Esta molécula gasosa pode apresentar efeitos benéficos, tais como atividade antimicrobiana e modulação da resposta imune. Por outro lado, quando presente em altas concentrações, pode atuar como uma influente molécula citotóxica desencadeando prejuízos aos tecidos adjacentes, incluindo osso alveolar<sup>19</sup>. O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina em um processo catalisado por isoenzimas que são globalmente denominadas NO sintases (NOS). Estas enzimas são classificadas em três tipos: NOS endotelial (eNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS induzida (iNOS). A produção destas isoformas parece ser tecido-específica. A NOS endotelial é produzida pelas células endoteliais e osteoclastos e a iNOS é identificada em fibroblastos, macrófagos e células vasculares<sup>19,20</sup>.

Após reconhecer as células-alvo ou outros antígenos, as células fagocíticas são ativadas para ingeri-las e destruí-las com oxidantes reativos e enzimas hidrolíticas. Dois tipos de sinais são importantes para a ativação de células fagocíticas: presença de antígenos-alvo e citocinas específicas. Dentre as citocinas, o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) foi caracterizado como o principal ativador de macrófagos. O IFN- $\gamma$  induz a produção de peróxido de nitrogênio, óxido nítrico e outras moléculas tóxicas

Macrófagos ou células endoteliais produzem NO nas proximidades das células alvo. As células produtoras de NO, por sua vez, são ativadas, induzindo a sua produção em toda parte. Provavelmente, grande parte de NO oxida-se antes que chegue a atingir seus alvos. Por essa razão é impossível afirmar qual é a concentração de NO que leva à toxicidade das células. Além disso, através de sua função citoprotetora o NO age diretamente na diminuição da produção de radicais livres ou interferindo na resposta imune<sup>20</sup>.

O papel do NO na mucosa bucal normal ainda é desconhecido. Os achados sugerem que uma concentração excessiva de NO na saliva exerce um papel potencial nas modificações das doenças da mucosa bucal apresentando um efeito regulador patofisiológico. O aumento de nitrito quantificado na saliva foi encontrado em pacientes com recorrentes ulcerações orais aftosas. Observa-se um aumento do nível de iNOS gengival durante a inflamação periodontal, quando comparada com tecidos gengivais não inflamados<sup>22</sup>.

Altas quantidades de L-arginina e L-citrulina em tecido gengival inflamado *in vivo* e a expressão de iNOS em macrófagos, linfócitos, e polimorfonucleares em periodontites induzidas experimentalmente em ratos, bem como em fibroblastos, células epiteliais, macrófagos e células endoteliais em periodontite humana, revelam a possível participação do NO na doença periodontal. Assim sendo, a presença deste gás na doença periodontal pode refletir a participação de um mediador adicional na regulação da reabsorção óssea, responsável pela progressão da doença<sup>17,19,23</sup>. Nas periodontites os efeitos benéficos da manifestação de iNOS podem incluir atividade antimicrobiana, modulação imunológica, inibição de trombose microvascular, e perfusão tecidual. Por outro lado, os efeitos prejudiciais do NO podem incluir uma ação citotóxica para tecidos e osso alveolar, vermelhidão gengival, explicada pelo aumento da permeabilidade vascular, tendência de aumento do sangramento dos tecidos moles e, ainda, o aumento da reabsorção do osso alveolar. A indução da iNOS pode também inibir a proliferação de fibroblastos e induzir a apoptose celular contribuindo para o desequilíbrio entre destruição e reparo tecidual, característica da periodontite<sup>19,23</sup>.

O NO é um importante regulador na formação e reabsorção óssea. Examinando o papel desta molécula no movimento dentário ortodôntico com inibidores específicos de NOS, verifica-se que o NO é um importante mediador bioquímico na resposta do tecido periodontal em relação à força ortodôntica<sup>24</sup>. Movimentos dentários ortodônticos resultam da resposta do tecido periodontal à força ortodôntica que guia a modelação e a remodelação do osso alveolar adjacente. Precusores não-tóxicos de NO podem ser usados para reduzir o tempo de tratamento ortodôntico visto que diferentes fatores têm o poder de

meio de vários biomedadores, dentre os quais o NO. Considera-se que estas respostas ocorram devido à ativação de sinais padrões específicos e a identificação desses padrões pode guiar a uma intervenção farmacológica para controlar a taxa de movimento ortodôntico dentário. É fundamental que estudos científicos sejam efetuados para que uma avaliação mais detalhada permita aplicações clínicas<sup>24,25</sup>.

## METODOLOGIA

### Materiais

A amostra dos estudos poderá ser constituída de qualquer material utilizado em Odontologia, em proporções padronizadas adequadas aos poços das placas de culturas. Poderão ser utilizados materiais inteiros, em recortes, extratos, pós, substâncias composicionais entre outros. Devem ser obtidos diretamente dos fabricantes e mantidos em suas embalagens originais até o início do experimento.

### Método

O presente protocolo de avaliação utilizando o MTT é o seguido no Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas e no Núcleo de Pesquisa em Ortodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz Fora.

### Esterilização dos Materiais

Os materiais são esterilizados com o intuito de eliminar possíveis contaminações e, conseqüentemente resultados inverídicos. O óxido de etileno pode ser utilizado com segurança para a esterilização de muitos materiais odontológicos. Posteriormente, devem ser manipulados no fluxo laminar ou em um ambiente aonde sejam resguardadas todas as condições de esterilidade.

### Cultura Celular da Linhagem de Macrófagos Murinos J774

Tratando-se de um teste inicial que determina a compatibilidade biológica do material, as culturas celulares são eleitas para a avaliação da citotoxicidade e dos possíveis efeitos sobre as células. Ressalva-se ainda que fragmentos de órgãos ou tecidos também podem ser utilizados. Uma suspensão celular é obtida e cultivada como monocamada aderente em substrato sólido ou em meio de cultura gelatinoso<sup>5</sup>. Uma das linhagens celulares utilizadas é a murina J774 A.1 (ATCC nº. TIB-67) conservada em garrafa plástica (NUNC) com meio de cultura suplementado (5% de soro fetal bovino (FCS), 50UI/ml de Penicilina, 1% de aminoácido não-essencial e 2% de L-Glutamina (Gibco/BRL)). As células são mantidas em incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, numa temperatura de 37°C. Ao iniciar o experimento, é necessário realizar a raspagem



plástica. Após serem transferidas para um recipiente adequado as células são lavadas através de centrifugação a 1200rpm, durante 10 minutos, a 4°C. Na determinação da viabilidade e a contagem celular utiliza-se a técnica padrão de contagem com o corante vital azul de Tripan, em uma proporção de 1/1 (corante/meio de cultura) em câmara de Neubauer.

#### Cultura de Células na Presença dos Materiais

Em placas de 96 poços, cultivam-se  $2 \times 10^4$  células J774/poço, em um volume de 100  $\mu$ l, ressuspensas em meio de cultura RPMI-suplementado. Sobre as células são colocados os materiais, deixados em cultura em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 72 horas) à 37°C, com 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o período de incubação o sobrenadante é coletado para posterior quantificação do NO e as células são submetidas à avaliação de citotoxicidade após a remoção do material (no caso de material sólido).

#### Células Controle

O grupo controle é constituído de macrófagos murinos da linhagem J774, depositados em placas de 96 poços, sem a presença dos materiais a serem testados. As células controle são importantes para acompanhar o desenvolvimento das células em geral, caso exista algum tipo de contaminação ou falhas no processo de incubação, assim como serve de parâmetro de normalidade com relação a citotoxicidade e a produção de NO.

#### Teste com MTT (MTT assay)

Após a retirada dos sobrenadantes, removem-se os materiais com uma pinça estéril. Às células que permaneceram nos poços da placa são acrescentados 90  $\mu$ l de meio RPMI suplementado e 10  $\mu$ l da suspensão de MTT (50mg/ml). As células são incubadas por 4 horas, à temperatura de 37°C em estufa de  $\text{CO}_2$ . Após esse período, a reação de MTT será bloqueada com 100  $\mu$ l/poço de solução álcool-ácido, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e a leitura é feita à 570nm utilizando-se um leitor de microplacas (Spectramax 190 - Molecular Device).

#### Teste da Produção do Óxido Nítrico

Não há um protocolo determinado com relação ao tempo de exposição das células aos agentes tóxicos e nem da concentração dos mesmos. Isto se deve ao fato de cada material ser citotóxico em diferentes níveis. Portanto, os protocolos devem ser adaptados para cada situação<sup>5</sup>. Sugere-se que seja realizada uma cinética de tempo, por exemplo, 24, 48 e 72 horas. Decorridos tais períodos, o sobrenadante coletado será utilizado na análise da produção de NO pelos macrófagos murinos. Uma quantidade pré-determinada de sobrenadante, de cada poço da placa de cultura, é transferida para uma nova placa

quantidade de reagente de Griess (1% sufanilamida, 0,1% N- (1-naftil) – etilina diamina hidrocloreto, 2,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Obtem-se concentrações de nitrito nos sobrenadantes através da análise de regressão linear a partir da curva padrão, empregando-se várias diluições seriadas de nitrito de sódio<sup>26</sup>. A absorbância é determinada a 540nm, através do leitor de microplacas (Spectramax 190-Molecular Device).

## DISCUSSÃO

Os polimorfonucleares de sangue humano e macrófagos murinos, mostraram ser modelos experimentais adequados para a estimativa quantitativa de atividade fagocítica sob a influência de diferentes agentes imunomoduladores. Recentemente, muitos estudos têm relatado que macrófagos ativados podem produzir alta quantidade de NO e exercem sua toxicidade de maneira NO-dependente<sup>21</sup>. A avaliação da citotoxicidade pode ser efetuada através do teste do MTT (3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) – diphenyl tetrazolium bromide) que é um sal de tetrazolium, solúvel em água e que pode ser utilizado em ensaios quantitativos colorimétricos para avaliar a sobrevivência e a proliferação de células de mamíferos. O ensaio detecta as células vivas e o sinal é dependente do grau de ativação dessas células. Esse método pode, portanto, ser usado para medir a citotoxicidade, a proliferação ou a ativação celular<sup>26</sup>.

O MTT, que tem sua estrutura molecular em forma de anel, é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem aos cristais de formazan de coloração violeta e insolúveis. Para que seja possível a leitura do resultado, o produto violeta insolúvel em água deve ser dissolvido em um solvente específico (isopropanol acidificado – HCL 0,04N em isopropanol) e a leitura da intensidade de cor da solução é feita em um leitor de microplacas com um filtro de 570nm<sup>27</sup>. A clivagem do MTT tem várias propriedades desejáveis para a amostragem de sobrevivência e proliferação celular. É clivado por todas as células vivas, metabolicamente ativas, que foram testadas, mas não pelas células mortas ou por eritrócitos. A quantidade de formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células (população homogênea). Células ativadas produzem mais formazan que as células adormecidas o que poderia permitir a mensuração até mesmo na ausência da proliferação<sup>26</sup>.

A principal vantagem do ensaio colorimétrico é a rapidez com que as amostras podem ser processadas. O substrato não interfere com a mensuração do produto e podem ser encontradas condições nas quais os componentes do meio não interferem. Isso permite o ensaio ser lido sem qualquer remoção ou com qualquer passo de lavagem, o que aumenta a velocidade do ensaio e ajuda a

do experimento (adição do MTT, leitura da placa e a impressão dos dados) consome muito menos tempo do que a instalação do mesmo (a mistura das células e a diluição do fator de crescimento). O experimento pode ser lido em poucos minutos após a adição do ácido isopropanolol e a cor torna-se estável em poucas horas na câmara de temperatura. Os resultados também são aparentes visualmente, o que o torna muito útil quando resultados quantitativos rápidos são requeridos<sup>26</sup>.

Somente o reagente adicional é usado no experimento de MTT. Visto que o ensaio colorimétrico é rápido, largas amostras de dados podem ser geradas e ainda, qualquer forma de processamento computadorizado, pode ser usado<sup>26</sup>.

Quanto à análise da produção de óxido nítrico é importante destacar que o tempo médio de vida do NO é curto, o que significa que a permanência do mesmo no organismo é baixa. Isto torna muito difícil alcançar uma monitorização apurada do NO *in vivo*. Desta forma, a produção de NO em cultura de células pode ser estimada através do acúmulo do nitrito (NO<sub>2</sub>), que é o produto de conversão estável do óxido nítrico. Esta mensuração pode ser realizada através de um ensaio colorimétrico para NO, conhecido como método de Griess<sup>28,29</sup>.

O aspecto visual também é imediato. Ao colocar o reagente de Griess já é possível verificar em quais poços ocorreu uma alta produção de NO através da coloração rósea que assume. A baixa produção de NO proporciona pequena ou nenhuma alteração colorimétrica. Tal alteração pode ser quantificada melhor através de valores em absorbância pelo leitor de microplacas. É possível ainda correlacionar os resultados do teste do MTT e o teste de avaliação da produção do óxido nítrico. Nota-se que, uma alta produção de NO frente ao estímulo, pode relacionar-se a uma alta proliferação de macrófagos e, conseqüentemente uma maior citotoxicidade. Do mesmo modo, a baixa produção de NO expressa uma menor citotoxicidade, sugerindo que o material não foi capaz de causar prejuízos às células.

A biocompatibilidade de materiais dentários é especialmente relevante porque os profissionais da odontologia utilizam materiais que permanecem por longos períodos em contato com organismos vivos. Não existem materiais 100% seguros; então a decisão sobre o uso destes materiais deve ser equilibrada nos potenciais riscos e benefícios determinados pelo profissional e se os possíveis benefícios se sobrepõem sobremaneira aos possíveis riscos<sup>4</sup>.

## CONCLUSÕES

1) Os modelos de estudos *in vitro* são alternativas imprescindíveis na pesquisa relacionada à biocompatibilidade de materiais odontológicos, reduzindo

2) O ensaio de MTT pode ser facilmente adaptado para testes de citotoxicidade de materiais de diferentes composições. É um ensaio colorimétrico, quantitativo, que apresenta alto grau de reprodutibilidade, baixo custo e rapidez;

3) A mensuração da produção de NO através do método de Griess, fornece dados adicionais para a análise da citotoxicidade. É um método já bem estabelecido e amplamente utilizado nos estudos relacionados à quantificação do NO.

## REFERÊNCIAS

1. Grimsdottir MR, Henster-Petersen A. Cytotoxicity and antibacterial effects of orthodontic appliances. *Scand J Dent Res* 1993; 101(4):229-31.
2. Craig RG. Restorative dental materials. 9<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1993. p.141-7.
3. Hanks CT, Wataha CJ, Sun Z. *In vitro* models of biocompatibility: a review. *Dent Mater J* 1996; 12(3):186-93.
4. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent* 2001; 86(2):203-9.
5. Costa CAS, Souza PPC. Testes de citotoxicidade em culturas de células. In: Estrela C. Metodologia científica. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2005. p.213-30.
6. Batista AC, Silva TA, Chun JH, Lara VS. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis* 2002; 8(5):254-60.
7. Phillips RW. Materiais dentários. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.35-8.
8. Tsuchiya T, Ikarashi Y, Arai T, Ohashi J, Nakamura A. Improved sensitivity and decreased sample size in a cytotoxicity test for biomaterials: a modified colony microassay using a microplate and crystal violet staining. *J Appl Biomater* 1994; 5(4):361-7.
9. Lemons JE. Dental implant biomaterials. *J Am Dent Assoc* 1990; 121(7):16-9.
10. Hensten-Petersen A. Skin and mucosal reactions associated with dental materials. *Eur J Oral Sci* 1998; 106(2 PT 2):707-12.
11. Hensten-Petersen A, Jacobsen N, Grimsdottir MR. Allergic reactions and safety concerns. In: Brantley WA, Eliades T. Orthodontic materials scientific and clinical aspects. New York: Thieme Stuttgart, 2001. p.287-99.
12. Anusavice KJ. Phillips materiais dentários. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
13. Schmalz G. Materials science: biological aspects. *J Dent Res* 2002; 81(10):660-3.
14. Schmalz G. Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *J Dent* 1994; 2(Suppl22):S6-S11.
15. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat Res* 2003; 6(3):317-9.
16. Park JC, Park BJ, Lee DH, Suh H, Kim DG, Kwon OH. Evaluation of the cytotoxicity of polyetherurethane (PU) film containing zinc diethyldithiocarbamate (ZDEC) on various cell lines. *Yonsei Med J* 2002; 43(4):518-26.
17. Matejka M, Partyka J, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodontol* 1998; 33(8):517-8.
18. Baek HS, Yoo JA, Rah DK, Han DW, Lee DH, Kwon OH, Park JC. Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of

19. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis* 2001; 7(1):2-10.
20. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection – how, why, when and where? *Nitric Oxide* 1997; 1(2):107-20.
21. Stoika R, Kashchak N, Lutsik-Kordovsky ML, Boyko M, Barska M, Tsyurulnyk A. In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. *Med Sci Monit* 2001; 7(4):652-8.
22. Ohashi M, Iwase M, Nagumo M. Elevated production of salivary nitric oxide in oral mucosal diseases. *J Oral Pathol* 1999; 28(8):355-9.
23. Lohinai ZM, Szabo C. Role of nitric oxide in physiology and patophysiology of periodontal tissues. *Med Sci Monit* 1998; 4(6):1089-95.
24. Keigo H, Kaoru I, Kotaro M, Hisashi S, Hideo M. Involvement of nitric oxide in orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2002; 122(3):306-9.
25. Akin E, Gurton AU, Ölmez H. Effects of nitric oxide in orthodontics tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004; 126(5):608-14.
26. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2):55-63.
27. Locci P, Marinucci L, Lilli C, Belcastro S, Staffolani N, Bellocchio S, Damiani F, Becchetti E. Biocompatibility of alloys used in orthodontics evaluated by cell culture tests. *J Biomed Mater Res A* 2000; 51(4):561-8.
28. Green LC, Wagner DA, Glowinski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrite in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126(1):131-8.
29. Reis DS, Souza MA, Mineo JR, Espindola FS. Myosin V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- $\alpha$ . *Braz J of Med Biol Res* 2001; 34(2):221-6.

Recebido/Received: 31/07/07

Revisado/Reviewed: 21/01/08

Aprovado/Approved: 13/03/08

#### **Correspondência/Correspondence:**

Julia Cristina de Andrade Vitral

Av. Barão do Rio Branco, 2595/1603-1604

Juiz de Fora/MG CEP: 36010-907

Telefone: (32) 3232-3596

E-mail: javitral@acessa.com