

## MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE BIOMATERIAIS

### ALTERNATIVE METHODS FOR ASSESSMENT OF CYTOTOXICITY OF BIOMATERIALS

**Dayany Pereira Sehnem<sup>1</sup>; Leticia Benamor<sup>1</sup>; Liliane de Sá de Jesus<sup>1</sup>; Rodrigo de Menezes Valentim<sup>1</sup>; Erika Thuanne Gonçalves de Souza<sup>2</sup>; Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi<sup>3</sup>; Prof. Dra. Esther R. Takamori<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduando em Odontologia da Escola de Ciências da Saúde (ECS), Universidade do Grande Rio - UNIGRANRIO.

<sup>2</sup>Doutoranda em Odontologia da Universidade Federal Fluminense (UFF),

<sup>3</sup>Professor do Programa de Mestrado Profissional em Odontologia da Escola de Ciências da Saúde (ECS), Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO

#### RESUMO

Como o aumento da expectativa de vida da população, observa-se um maior número de perdas ósseas significativas, que podem ocorrer em função de acidentes e/ou patologias como cistos ou tumores. Dependendo da extensão, da localização e das características da lesão, o organismo consegue regenerar o tecido ósseo. Entretanto, em defeitos ósseos extensos ou perenes, o organismo consegue apenas reparar o local com um tecido fibroso que não é compatível com a função do tecido ósseo. Diante disso, muitos biomateriais alternativos e estratégias de tratamento têm sido desenvolvidos, no intuito de auxiliar a regeneração do tecido ósseo. Biomateriais para reparo ósseo são compostos naturais ou sintéticos utilizados nas clínicas médicas e odontológicas, que auxiliam a reparação óssea e apresentam biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica sem riscos trans-operatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação por parte do paciente. Independente do biomaterial desenvolvido, o primeiro nível de testes, dentro da avaliação de biocompatibilidade (International Standardization for Organization, ISO 10993-5, 2009) é a determinação da citotoxicidade, através de testes *in vitro*. Em comparação com as investigações *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados, apresentam melhor reprodutibilidade e constituem uma proposta extremamente razoável. Além disso, os ensaios de citotoxicidade estão em consonância com os princípios dos 3Rs: redução, refinamento e substituição (reducement, refinement e replacement), preconizados por Russel e Burch.

**Palavras-Chaves:** Biomateriais; citotoxicidade; biocompatibilidade

## **ABSTRACT**

As the increase in life expectancy of the population, there is a greater number of significant bone loss that can occur due to accidents and / or pathologies such as cysts or tumors. Depending on the extent, location and characteristics of the lesion, the body can regenerate bone tissue. However, in long or perennials bone defects, the body can repair site with only fibrous tissue that is not compatible with the bone tissue. Given this, many biomaterials and alternative treatment strategies have been developed in order to assist the regeneration of bone tissue. Biomaterials for bone repair are natural or synthetic compounds used in medical and dental clinics, which help bone repair and exhibit biocompatibility, predictability, clinical application without risk trans-operative and postoperative sequelae minimum, and acceptance by the patient. Regardless of the biomaterial developed, the first level of testing in the evaluation of biocompatibility (International Organization for Standardization, ISO 10993-5, 2009) is the determination of cytotoxicity, by in vitro tests. In comparison with the investigations in vivo, in vitro studies are more easily controlled, have better reproducibility, and are proposals extremely reasonable. In addition, cytotoxicity assays are consistent with the principles of the 3Rs: reduction, refinement and replacement, preconized by Russell and Burch.

**Keywords:** Biomaterials, cytotoxicity, biocompatibility

## **INTRODUÇÃO**

Nas próximas décadas, o custo social da saúde no Brasil deverá enfrentar um crescimento potencialmente perigoso. A evolução do perfil demográfico e social aponta para o aumento progressivo da idade média das populações humanas, em particular das urbanas. Impõe-se, assim, cada vez mais, a necessidade de garantir a qualidade da vida, compatível com um custo e uma carga social aceitáveis. O número de habitantes de terceira idade triplicará nos próximos 50 anos e o número de pessoas em senectude avançada será multiplicado por seis. O segundo desses dois grupos consome vinte vezes mais custos da assistência médica e duas vezes mais internação hospitalar do que o primeiro.

As doenças degenerativas são a causa essencial e crescente dessa carga social, causando a deterioração da qualidade de vida e aumento dos custos da assistência médica. Por outro lado, as populações jovens, vivendo em aglomerações de alta densidade, estão a cada dia mais expostas a lesões traumáticas. Embora numericamente menos significativas, essas

lesões têm um altíssimo custo social, gerando pessoas, ainda jovens, debilitadas ou permanentemente incapacitadas para uma vida normal e produtiva.

Em populações urbanas do Brasil, as lesões traumáticas são as primeiras causas tanto da internação hospitalar quanto da morte na segunda e terceira décadas da vida dos jovens. Em 2004, foram gastos no SUS 585 milhões de reais somente com órteses e próteses, sendo 295 milhões referentes à região Sudeste. Somente o procedimento de artroplastia total de quadril cimentada, que tem grande aplicação na população idosa, gerou, no Brasil, um gasto de 17,8 milhões de reais com internações (correspondendo a 5551 internações) dos quais 8 milhões se referem aos gastos com as próteses. Paralelamente, foram gastos mais 4,1 milhões de reais com internações para a realização cirurgias de revisão de quadril (921 internações) no país (DATASUS, 2005). O número mundial de pacientes suscetíveis de receber uma terapia ortopédica associada com bioengenharia foi estimado em 2003 a 11.750.000, com o valor de biomateriais usados em terapias de 3.250.000 U\$ (Medtech Insight Report, 2004). A produção de biomateriais no Brasil é muito limitada e, em muitos casos, inexistente.

Biomateriais para reparo ósseo são compostos naturais ou sintéticos utilizados nas clínicas médicas e odontológicas, que auxiliam a reparação óssea e apresentam biocompatibilidade, previsibilidade, aplicação clínica sem riscos trans-operatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas, além de aceitação por parte do paciente (TAGA, 1996). Os materiais para reconstrução óssea precisam apresentar propriedades mecânicas similares ao osso e dar suporte à regeneração óssea. Além disso, devem possibilitar a adesão, a proliferação e a diferenciação celular (SEAL *et al.*, 2001).

Os biomateriais são classificados como produtos para saúde ou correlatos e o seu registro no Ministério da Saúde, assim como sua regulamentação são coordenados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

Os requisitos a serem atendidos para regulamentação são determinados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA estabeleceu, sob a Resolução RDC n.º 185 de 22 de outubro de 2001, os parâmetros necessários para que as empresas pudessem apresentar todas as informações necessárias sobre os produtos para saúde, definidos como correlatos para obtenção do registro.

Deve contemplar todas as informações necessárias referentes ao produto e o fabricante, incluindo a tecnologia do fabricante. Fazem parte destas informações: descrição detalhada do produto, fundamentos de funcionamento, finalidade e uso a que se destinam,

precauções, restrições, advertências, cuidados especiais, formas de apresentação dos produtos médicos, diagrama de fluxo contendo as informações do processo de fabricação e descrição da segurança e eficácia do produto.

É necessário comprovar que o produto para saúde é eficaz e seguro para utilização em humanos. Porém, outras etapas, dentro do desenvolvimento do produto são necessárias para garantir a validação total do produto, antes que o mesmo possa ser submetido para registro de produto e, posteriormente, para comercialização. De acordo com a Resolução RDC 56, de 06 de abril de 2001, deve-se garantir a Segurança e Eficácia do Produto.

### **OBJETIVO**

Discutir os ensaios biológicos que são necessários para garantir a segurança e eficácia dos biomateriais, através do controle da toxicidade do produto final.

### **DISCUSSÃO**

Os ensaios a serem desenvolvidos, na fase de desenvolvimento, podem variar de acordo com as características do novo produto. Os relatórios e laudos dos Ensaios e Validações devem ser incluídos no Relatório Técnico, encaminhado a ANVISA, assim como demais documento exigidos para o Registro do Produto.

Em se tratando de Biomateriais, normalmente, para o desenvolvimento e registro do produto são necessários ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo* e, dependendo-se das características do material, ensaios clínicos.

Em 1959, com a introdução do conceito dos 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement – Substituição, Redução e Refinamento) por Russel e Burch no livro *The Principles of Humane Experimental Technique* é que se pode vislumbrar a possibilidade de se combinar a manutenção da qualidade científica da pesquisa e a condução ética dos experimentos (HENDRIKSEN, 1996; BALLS & STRAUGHAN, 1996) .

Entretanto, foi somente no final da década de 1970, com a pressão antivivisseccionista exercida contra o uso de animais pelas indústrias de cosméticos, é que as buscas por métodos alternativos se intensificaram.

Apesar de todos os esforços na busca de alternativas, o uso de animais em diversas atividades ainda é uma realidade no mundo inteiro, mesmo na União Europeia (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2007). Cabe ressaltar que o uso de animais de laboratório ainda é muito importante em diversas áreas da pesquisa básica, controle da qualidade, desenvolvimento de fármacos, entre outros.

Em 1991 a Comunidade Europeia constituiu o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos ao Uso de Animais (ECVAM- European Committee for Validation of Alternative Methods), encarregado de promover e validar técnicas e metodologias destinadas à substituição dos ensaios em animais. Uma vez validado, um ensaio é submetido via ESAC (ECVAM's Scientific Advisory Committee) para adoção pela OECD, a qual serve de base para a harmonização destas metodologias entre países signatários. Os Estados Unidos e o Japão também possuem centros de validação de ensaios, que harmonizam as metodologias também via OECD. Isto significa que Estados Unidos, Japão, Comunidade Europeia e outros países membros da OECD adotam métodos alternativos ao uso de animais com fins regulatórios.

O Brasil teve, recentemente, aprovada a Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, que versa sobre o uso de animais na experimentação e no ensino, regulamentada através do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009. Além disso, a referida Lei cria o CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, que entre outras atribuições tem a responsabilidade de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos (BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

O processo brasileiro de validação de métodos alternativos ao uso de animais não está definido. Embora a Resolução no 899/2003 estabeleça um “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (BRASIL, 2003), este é limitado, principalmente, a ensaios físico-químicos.

Os ensaios em animais devem ser executados quando o desenvolvimento realizado exija que a comprovação de segurança e eficácia se realize com a utilização de modelos *in vivo*. Esses ensaios devem ser realizados, seguindo-se os preceitos e normas vigentes para Experimentação animal. Além disso, qualquer trabalho de Pesquisa em animais, independente do modelo utilizado, deve ser submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), antes de ser iniciado.

Dentre os métodos alternativos ao uso de animais, destacam-se os ensaios de citotoxicidade que possibilitam a avaliação do potencial toxicológico do produto, *in vitro*, com cultura de células. Além disso, possibilita-se a análise da interação célula-material. Os ensaios, tipos celulares e parâmetros avaliados dependerão do produto em desenvolvimento analisado.

Diversos protocolos de avaliação de toxicidade *in vitro* foram publicados nos últimos anos por organizações internacionalmente reconhecidas:

- ISO (*International Standardization Organization*) - ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity
- OECD - No. 129: *Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests*
- ICCVAM/NICEATM (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods) - *Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity*

Para que um produto seja classificado como seguro, conforme exige a RDC 56, ele precisa ser biocompatível.

Segundo Willians (1981), biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material de propiciar resposta biológica apropriada numa aplicação específica.

A “American Dental Association” (ADA)/ “American National Standard Institute” (ANSI) e a “International Organization for Standardization” (ISO) são organizações, também, preocupadas em padronizar testes para a avaliação da biocompatibilidade de biomateriais.

Segundo a ADA/ANSI, existem níveis para a avaliação de biocompatibilidade:

1) Inicial: constitui o primeiro nível de avaliação de um material. São realizados testes *in vitro*: ensaios de citotoxicidade, hemólise (lise de hemácias), mutagênese e carcinogênese em cultura celular.

2) Secundário: o material é testado *in vivo*, em animais de pequeno porte para avaliar o potencial imunogênico, como por exemplo, testes de irritação dérmica, implantação subcutânea e intra-óssea.

3) Aplicação: utilização no local a que se destina o material, primeiramente em animais de grande porte, seguida de testes em primatas não-humanos e finalmente em humanos, com a aprovação do Conselho Nacional de Saúde.

O objetivo dos testes de biocompatibilidade *in vitro* é mimetizar as condições biológicas para testar materiais simulando sua implantação nos tecidos do organismo ou sobre eles. Esses métodos visam promover redução do custo no desenvolvimento de novos materiais, minimizando a possibilidade de resultados inesperados quando da realização de testes em animais ou clínicos (Hanks et al., 1996). A realização dos ensaios *in vitro* ainda permite a redução no número de animais utilizados na avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial (ISO 10993-1).

A toxicidade é um evento complexo *in vivo*, podendo haver dano celular direto, efeitos fisiológicos sistêmicos tais como nefrotoxicidade e neurotoxicidade, entre outros,

quase sempre desencadeando resposta inflamatória. Atualmente, ainda é difícil monitorar efeitos sistêmicos e fisiológicos *in vitro*, desta forma a maioria dos ensaios determina os efeitos em nível celular, em termos de citotoxicidade (Freshney, 2000).

A ISO é uma organização internacional, composta de vários comitês, que visa a padronização de procedimentos. A ISO 10993 é uma combinação de vários documentos de padronização, cujo objetivo é estabelecer um guia para a avaliação da biocompatibilidade e respostas biológicas relevantes de materiais e dispositivos médicos.

O primeiro nível de testes, dentro da avaliação de biocompatibilidade (ISO 10993-5, 2--7) é a determinação da citotoxicidade *in vitro*. Em comparação com as investigações *in vivo*, os estudos *in vitro* são mais facilmente controlados e apresentam melhor reprodutibilidade (Schmalz et al., 1994; Freshney, 2000).

Há muitas vias metabólicas que podem ser avaliadas para se medir o efeito citotóxico de biomateriais que estarão em contato com os tecidos vivos. Ensaio padrão devem ser específicos o suficiente para verificar efeitos que são vitais para a função celular, mas ao mesmo tempo gerais e simples o suficiente para serem facilmente reproduzidos em outros laboratórios (Nassiri et al., 1994).

O cultivo de células *in vitro* constitui-se numa valiosa ferramenta para se conhecer os mecanismos pelos quais biomateriais podem produzir reações adversas em nível celular (Wennberg, 1986; Hensten-Petersen, 1988). Assim, citólise e mudanças no crescimento e na permeabilidade da membrana celular podem ser verificadas *in vitro* (Lygre et al., 1995).

Os ensaios de citotoxicidade fornecem informações a respeito da segurança do material estudado (Tang et al., 1999), além de indicar se um material deve ser descartado ou objeto dos outros níveis de avaliação em estudos posteriores *in vivo* (Torabinejad et al., 1996).

Esses estudos normalmente consistem no ordenamento, entre os materiais avaliados, estabelecendo assim uma escala quanto à citotoxicidade observada (Hanks et al., 1996).

Os ensaios de citotoxicidade também podem ser utilizados na fase de desenvolvimento do produto, quando se deseja estabelecer a melhor proporção entre os componentes de um biomaterial (Ramires et al., 2001) ou quando se modifica um material já existente (Griggs et al., 2003).

Normalmente avalia-se a citotoxicidade basal, isto é, aquela que afeta estruturas e funções comuns a todas as células do organismo, como membrana celular, mitocôndria, ribossomos, cromossomos e lisossomos. Alterações nas funções basais geralmente afetam as



específicas (Barile, 1994). Os estudos de citotoxicidade se baseiam, portanto, no estudo de parâmetros relacionados às funções celulares basais.

Existe um vasto número de testes *in vitro* sendo que cada um consiste basicamente de três componentes: (a) o sistema biológico; (b) o contato célula/material (c) o resultado a ser aferido (“endpoint”). Normalmente, o sistema biológico utilizado *in vitro* é o de cultura de células, podendo ser utilizadas células de linhagem permanente ou de cultura primária (Schmalz, 1994).

A ISO 10993-5 recomenda a utilização de células de linhagens permanentes para a realização de ensaios de citotoxicidade, visando-se padronizar os ensaios permitindo a sua reprodutibilidade. Esta norma da ISO recomenda algumas linhagens celulares permanentes da “American Type Culture Collection” (ATCC): L-929, Balb/c 3T3, MRC-5, WI-38, Vero, BHK-21 e V-79.

O preparo do material avaliado constitui um importante passo na tentativa de mimetizar as condições *in vivo*. A ISO 10993-5 sugere três protocolos para testes *in vitro* de materiais: contato direto, contato indireto e extrato do material em diferentes diluições.

No contato direto estuda-se a toxicidade do material, avaliando-se seu efeito nas células semeadas diretamente sobre ele (Ramires et al., 2001; Viana et al., 2003). O contato indireto implica na utilização de uma barreira entre o material e as células, podendo ser utilizados, por exemplo, filtro Milipore (Schuster et al., 1996) e ágar (Vallittu et al., 1999).

A escolha de uma ou mais categorias depende da natureza da amostra a ser avaliada, do local em que o material será utilizado e da finalidade desse uso (ISO 10993- 12).

Os tempos de exposição aos materiais testados podem ser de curta duração, envolvendo períodos de até 4 horas ou de longa duração, correspondendo a períodos de 24 horas ou mais (Barile, 1994). A citotoxicidade aguda é verificada no período de 24h (Hanks et al., 1996).

A avaliação de citotoxicidade pode ser feita através de ensaios qualitativos ou quantitativos. Os ensaios qualitativos consistem na avaliação da morfologia através de descrição ou atribuição de escores. Os quantitativos caracterizam-se pela quantificação do número e atividade celulares após a exposição ao agente teste (ISO 10993-5).

Além da descrição da morfologia frente a um material potencialmente tóxico, diferentes “endpoints” podem ainda ser utilizados como indicadores de dano celular, tais como: efeitos em membrana, na atividade celular e na taxa de proliferação (Schmalz, 1994).



As alterações morfológicas podem ser analisadas, comparando-se as células expostas ao material-teste com células não-expostas (Leyhausen et al., 1998)

A exposição das células a agentes tóxicos pode levar à morte celular alterando, portanto, o número de células e a taxa de proliferação das mesmas. A contagem de células utilizando-se hemocitômetro é um método empregado para avaliar citotoxicidade (Costa et al., 1999). Muitos autores utilizam a taxa de proliferação celular como parâmetro para avaliação de citotoxicidade (Koulaozidou et al., 1998; Fricain et al., 2002).

Mossman (1983) desenvolveu um método para avaliar viabilidade celular verificando a atividade de uma enzima mitocondrial, a succinato desidrogenase. Trata-se de um teste colorimétrico, baseado no uso do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5- difeniltetrazólio (MTT), em que este é reduzido apenas por mitocôndrias viáveis. A redução do MTT, de cor amarelada, a azul de formazana ocorre apenas em células viáveis, sendo sua intensidade diretamente proporcional ao número de células presentes (Denizot e Lang, 1986).

Outro teste de viabilidade celular utilizado é o da captação de vermelho neutro desenvolvido por Babich e Borenfreund (1990) que se baseia na captação do vermelho neutro, um corante fracamente catiônico, pelos lisossomos de células viáveis. Trata-se de um teste colorimétrico que avalia a intensidade de vermelho neutro incorporado e posteriormente extraído dos lisossomos viáveis, a qual é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Repetto e Sans, 1993).

Os estudos da interação célula-material são também de grande importância para avaliar adesão e proliferação das células sobre o material, o que está diretamente relacionado com a citocompatibilidade do mesmo (Bogdanski et al., 2002). A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) constitui-se num método adequado para verificar a interação das células com o material avaliado (Baslé et al., 1998; Marques et al., 2002).

## **CONCLUSÃO**

A realização de um único ensaio não é suficiente para se avaliar a citocompatibilidade de um determinado material, sendo necessária a realização de um conjunto de ensaios para essa finalidade (Gomes et al., 2001)

Na avaliação da citocompatibilidade ou biocompatibilidade *in vitro* de um determinado material pode-se analisar morfologia, viabilidade e função enzimática celular, além de estudar-se a interação da célula com o material.

Os ensaios de citotoxicidade medem somente efeitos finitos nas células durante as primeiras 12-24hs após exposição a substâncias tóxicas, sendo que elas podem sucumbir ou recuperar-se dessa injúria.

Além disso, muitas reações biológicas *in vivo* não são simplesmente citotóxicas, mas se prolongam por mais de 24 horas. Apesar destas limitações, os ensaios de citotoxicidade são amplamente empregados por não possuírem custo elevado, serem facilmente quantificados e reprodutíveis.

Testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*. Além disso, representam uma importante etapa no desenvolvimento de novos produtos para avaliação dos efeitos toxicológicos em células, o que permite adaptação das formulações, quando necessário. Dessa maneira, tem se otimização na fase de desenvolvimento de um novo produto, além de se reduzir e refinar o número de animais necessários para a etapa de avaliação *in vivo*. Alguns ensaios *in vivo*, já validados pela OECD, na área de cosméticos, substituem os estudos *in vivo*.

Dessa maneira, percebe-se a importante relação dos ensaios de citotoxicidade com o princípio dos 3Rs, redução, refinamento e substituição (reducement, replacement e refinement), preconizado por Russel e Burch.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SEAL BL, OTERO TC, PANITCH A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Sci. and Eng.R.* **34**:147-230, 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º 56, de 06 de abril de 2001. Estabelece os requisitos essenciais de segurança e eficácia aplicáveis aos produtos para saúde, referidos no Regulamento Técnico anexo a esta Resolução. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 06 de abril de 2001.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º 185, de 22 de outubro de 2001. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Aprova o Regulamento Técnico que consta no anexo desta Resolução, que trata do registro, alteração, revalidação e cancelamento do registro de produtos médicos na Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Brasília, 06 de novembro de 2001.

BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab. Animals*, v. 28, p. 193-211, 1994.

BORENFREUND, E., and PUERNER, J.A. (1985), Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* 24:119-124.

ICCVAM (2006a), Background Review Document: In Vitro Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: [[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv\\_nru\\_brd.htm](http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_brd.htm)]

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) Guidande n. 129, Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, 2010.

WILLIAMS, D.F. (1981). Biomaterials and biocompatibility. In Fundamentals aspects of biocompatibility vol. I. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

HANKS, C.T.; WATAHA, J.C.; SUN, Z. (1996). In vitro models of biocompatibility: a review. Dent. Mater., May, **12(3)**:186-93.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells. A manual of basic technique. 4.ed. New York: Wiley-Liss.

SCHMALZ, G.(1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials- advantages and limitations. J. Dent., **22 Suppl 2**:S6-11

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods. Dec 16, **65(1-2)**:55-63.

NASSIRI, M.R.; HANKS, C.T.; CAMERON, M.J.; STRAWN, S.E.; CRAIG, R.G. (1994). Application of flow cytometry to determine the cytotoxicity of urethane dimethactylate in human cells. J. of Biomed. and Mater. Res., Feb, **28**: 153-58.

WENNBERG, A.; HASSELGREN. G.; TRONSTAD, L. (1979). A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. J. Biomed. Mater. Res., Jan, **13(1)**:109-20.

LYGRE, H.; MOE, G.; SOLHEIM, E.; GJERDET, N.R. (1995). Biological testing of leachable aromatic compounds from denture base materials. Acta Odontol. Scand., **53**: 397-401.

HANKS, C.T.; FAT, J.C.; CORCORAN, J.F. (1993). Cytotoxicity and dentin permeability of carbamide peroxide and hydrogen peroxide vital bleaching materials, in vitro. J. of Dental Res., May, **72(5)**:931-38.

RAMIRES, P.A.; ROMITO, A; COSENTINO, F.; MILELLA, E. (2001). The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. Biomaterials, Jun, **22(12)**:1467-74.

SCHUSTER, G.S.; LEFEBVRE, C.A.; WATAHA, J.C.; WHITE, S.N. (1996). Biocompatibility of posterior restorative materials. CDA Journal, **24**:17-31.

VALLITU, P.K. E EKSTRAND, K. (1999). In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. J. Oral Rehabilitation, **26**:666-671.

VIANA, R.I. (2003). Estudo in vitro da citocompatibilidade do pool de BMP conjugado à hidroxiapatita utilizado como ósseoindutor. Tese (mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 79p.

WILLIAMS, D.F. (1981). Biomaterials and biocompatibility. In Fundamentals aspects of biocompatibility vol. I. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.

NASSIRI, M.R.; HANKS, C.T.; CAMERON, M.J.; STRAWN, S.E.; CRAIG, R.G. (1994). Application of flow cytometry to determine the cytotoxicity of urethane dimethacrylate in human cells. J. of Biomed. and Mater. Res., Feb, **28**: 153-58.

WENNBORG, A.; HASSELGREN, G.; TRONSTAD, L. (1979). A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. J. Biomed. Mater. Res., Jan, **13(1)**:109-20.

TANG, T.H.A.; LIU, Y.; BJÖRKMAN, L.; EKSTRAND, J. (1999). In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding resins on human oral fibroblasts. Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop., **116**:132-8.

LEYHAUSEN, G.; ABTAHI, M.; KARBAKHSCH, M.; SAPOTNICK, A.; GEURTSSEN, W. (1998). Biocompatibility of various light-curing and one conventional glass-ionomer cement. Biomaterials, Mar, **19(6)**:559-64.

COSTA, C.A.; HEBLING, J.; GARCIA-GODOY, F.; HANKS, C.T. (2003). In vitro cytotoxicity of five glass-ionomer cements. Biomaterials, Sep, **24(21)**:3853-8.

DENIZOT, F.; LANG, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods., May 22, **89(2)**:271-7.

FRICAIN, J.C.; ALOUF, J.; BAREILLE, R.; ROUAIS, F.; ROUVILLAIN, J.L. (2002). Cytocompatibility study of organic matrix extracted from Caribbean coral porites astroides. Biomaterials, Feb, **23(3)**:673-9.

REPETTO, G.; SANZ, P. (1993). Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: in vitro effects of 24 metals. ATLA. 21:501-7.

BOGDANSKI, D.; KOLLER, M.; MULLER, D.; MUHR, G.; BRAM, M.; BUCHKREMER, H.P.; STOVER, D.; CHOI, J.; EPPLE, M. (2002). Easy assessment of the biocompatibility of Ni- Ti alloys by in vitro cell culture experiments on a functionally graded Ni-NiTi-Ti material. Biomaterials, Dec, **23(23)**:4549-55.

GOMES, M.E.; REIS, R.L.; CUNHA, A.M.; BLITTERSWIJK, C.A.; DE BRUIJN, J.D. (2001). Cytocompatibility and response of osteoblastic-like cells to starch-based polymers:

BARILE, F.A. Mechanisms of cytotoxicology. I.Introduction. In: \_\_\_\_\_. Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms of cytotoxicology. Mechanisms and Methods. Boca Raton, Editora CRC Press, 1994. Cap.2, p.27-45.

MARQUES, A.P.; REIS, R.L.; HUNT, J.A. (2002). The biocompatibility of novel starch-based polymers and composites: in vitro studies. Biomaterials, Mar, **23(6)**:1471-8.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-12. Biological evaluation of medical devices-Part 12: Sample Preparation and Reference Materials. Geneva: International Organization for Standardization, 2007.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009.