

Evaluación de algunos aspectos de la biocompatibilidad de biomateriales *in vitro*

LIC. MIRIAM RÍOS HERNÁNDEZ, LIC. JANET CEPERO CAÑAS, TÉC. ANNIA GONZÁLEZ PÉREZ
TÉC. KENYA PÉREZ GARCÉS, DR. JOSÉ LUIS BELLO GÁRCIGA
Instituto de Oncología y Radiobiología. (INOR). Departamento de Ensayos Preclínicos.
Grupo de Inmunofarmacología. Ciudad de La Habana. Cuba.

Resumen

Los biomateriales para uso médico se han ido desarrollando de acuerdo a los avances en los campos de la medicina, bioquímica, farmacia y las ciencias de los materiales. Estos deben ser biocompatibles, por eso es necesario desarrollar un grupo de ensayos biológicos encaminados a este fin.

Las pruebas de citotoxicidad *in vitro* tienen aplicabilidad general y uso extensamente difundido en la evaluación de un amplio rango de materiales. Se ha encontrado cierta relación entre la citotoxicidad no específica del biomaterial *in vitro* y su efecto irritante *in vivo*.

En nuestro laboratorio se aplicó el método descrito por Stanley HR (1985) para la evaluación toxicológica de biomateriales, habiéndose evaluado hasta la fecha diferentes materiales obtenidos en el Centro de Biomateriales de la Universidad de La Habana, entre ellos: el obturante dental **Obtudent Fotocurado (FC)**, el sellante dental **Cubridem Autocurado (AC)**, el adhesivo tisular **Tisuacryl** y los cementos óseos **Biograft-G** y **Apafill-G**.

El **Obtudent FC** resultó citotóxico, sin embargo su citotoxicidad se encontró en el rango de la de sus análogos comerciales. La citotoxicidad del **Cubridem AC** y del **Tisuacryl** no se diferenciaron significativamente de los niveles encontrados para sus controles comerciales, al igual que el **Biograft-G**, aunque en este caso el resultado fue ligeramente citotóxico según la clasificación de Stanley. El **Apafill-G** no resultó citotóxico.

Summary

Biomaterials for medical use have been developed according with the improvement on the fields of medicine, biochemistry, material science and pharmaceuticals. All the materials used in medicine should be biocompatible, that's why it's necessary to develop a biological evaluation to assure this.

In vitro cytotoxicity tests have general application and these assays have had an extensively spread usage in the diversity material's evaluation. Certain relation between *in vitro* inespecific biomaterial's cytotoxicity and its *in vivo* irritant effect has been found.

In the laboratory we applied the *in vitro* biomaterial's cytotoxicity test described by Stanley HR (1985). We have evaluated by the moment some materials of Havana's University Biomaterial Center, such as: dental obturant **Obtudent FC**, dental sealing **Cubridem AC**, tissue adhesive **Tisuacryl** and the bone cements **Biograft-G** y **Apafill-G**.

Obtudent FC was cytotoxic, although its toxicity was similar to the comercial analog. The cytotoxicity of **Cubridem AC** and **Tisuacryl** haven't significant differences in relation to their comercial analogs. **Biograft-G** have a lightly cytotoxicity and **Apafill-G** wasn't cytotoxic.

Keywords: biocompatibility, medical devices, biomaterials, cytotoxicity, *in vitro* assays.

Correspondencia:

Miriam Ríos Hernández

Instituto de Oncología y Radiobiología. Depto. de Ensayos Preclínicos. Grupo de Inmunofarmacología.
29 y E. Vedado. Plaza de la Revolución. CP 10 400. Ciudad de La Habana. Cuba.

Fax: (537) 55 25 86

E-mail: inorbib@infomed.sld.cu

Introducción

Los biomateriales son por definición materiales que asumen las funciones de los tejidos en órganos naturales o partes de ellos, pudiendo ser capaces de imitar en la medida posible las propiedades del tejido natural en su ambiente biológico. Los biomateriales deben reunir los requisitos de factibilidad funcional, bioestabilidad, biocompatibilidad y esterilidad.^{1,2}

Aunque hay disponible un amplio espectro de materiales, la biocompatibilidad y la propiedades mecánicas estándar restringen el número actual de polímeros útiles en medicina. La respuesta natural de un sistema biológico a la presencia de un cuerpo extraño es el rechazo, el sistema responde con una serie de reacciones celulares, en las que influyen el tamaño, la forma y la naturaleza de la superficie del implante.³

El uso tan difundido de los polímeros necesita por lo tanto el conocimiento de las interacciones de los biomateriales con el sistema biológico. Los cultivos de células son modelos toxicológicos alternativos de gran sensibilidad, esto es un beneficio obvio para el tamizaje de toxicidad de rutina de los biomateriales. Para muchas aplicaciones una de las principales atracciones del uso del cultivo de tejidos es la posibilidad de observar el comportamiento de tipos específicos de células vivas en un ambiente bien controlado, aunque las condiciones que pueden reproducirse en cultivo son una parte simplificada de lo que puede ocurrir *in vivo*.⁴

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* es un sistema muy útil para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales implantables, teniendo como ventajas que no requieren el empleo de animales de experimentación, la rapidez con que se realizan los estudios y la relación costo/efectividad de los mismos.

Para la evaluación cuantitativa del daño celular se usa la liberación de trazadores radioactivos por las células expuestas a un agente tóxico. En este caso un sistema de ensayo recomendado son los fibroblastos, ya que son una familia de células presentes en casi todos los tejidos que puede distinguirse por sus productos biosintéticos, los antígenos de superficie o por su comportamiento en la replicación. Estas células están especializadas en el establecimiento y mantenimiento de la estructura de la matriz extracelular, para cuya función son muy importantes las interacciones célula-célula y célula-sustrato.⁵

Materiales y métodos

Se aplicó el método descrito por Stanley HR para la evaluación toxicológica preclínica de biomateriales y equipos médicos implantables⁶. Entre los biomateriales evaluados se encuentra el sellante dental Cubridem AC (resina basada en dimetacrilatos aromáticos tipo Bis-GMA), el adhesivo tisular Tisuacryl (cianoacrilato de n-butilo), el obturante dental Obtudent FC (resina dental de dimecrilatos aromáticos tipo Bis-GMA) y los cementos óseos Apafill-G (granulado denso de hidroxiapatita sintética) y Biograft-G (granulado denso de β -fosfato tricálcico), todos estos del Laboratorio de Biomateriales de la Universidad de la Habana.

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* descrito por Stanley HR emplea células L929 (fibroblasto de ratón), marcadas previamente con cromato de sodio (⁵¹Cr), que se ponen en contacto con el material por diferentes tiempos y se realiza la evaluación cuantitativa del daño celular a partir de la liberación del radioisótopo por las células. Previo a la realización del ensayo las células se subcultivaron en Medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino durante 3-5 días, colectándose en tripsina al 0,25% en solución salina. Las células se marcaron durante 24 h con 1,5 mCi ⁵¹Cr/10⁶ células y se ajustaron a una concentración final de 3 x 10⁵ células/ml, la viabilidad fue del 97%.

Los materiales se depositaron en placas de poliestireno estériles de 24 pozos por 10 réplicas. Como control negativo se empleó 2,0 ml de la suspensión de células y como control positivo 2,0 ml de dicha suspensión a la cual se le añadió 0,2 ml de fenol al 6,4 %, de los controles se pusieron 5 réplicas. En los pozos restantes se añadieron 2,0 ml de cultivo celular y se incubó durante el tiempo establecido a 37°C. Se realizaron 2 series de ensayos, una en la que las células se sembraron a los 30 min del mezclado inicial de los componentes del material en dos placas de cultivo y otra en la que se sembraron a las 24 horas, también en dos placas. Se evaluó la citotoxicidad a las 4 y 24 horas posteriores en ambos casos.

Transcurrido el tiempo se extrajo 1,0 ml del medio sobrenadante de cada pozo y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min, separándose 0,5 ml del sobrenadante para el conteo de la radioactividad durante 10 min/tubo. Se calculó el % de liberación de ⁵¹Cr empleando como valor de referencia de radioactividad total el promedio de los conteos de 4 muestras de 0,5 ml del cultivo celular.

Resultados y discusión

A continuación se presentan y discuten los resultados obtenidos en la aplicación del ensayo de Citotoxicidad *in vitro* descrito por Stanley HR para la evaluación de cinco productos del Centro de Biomateriales.

En la Figura 1 se muestran los porcentajes de liberación de ^{51}Cr en el ensayo con el Apafill-G. Como puede observarse la liberación de ^{51}Cr causada por la cerámica de hidroxiapatita a las 4 horas de exposición no difiere significativamente (1 %) de la provocada por el control negativo tanto con el material fresco como endurecido, mientras que a las 24 horas de contacto fue significativamente menor respecto al control en ambos casos; por lo que según la clasificación de Stanley el producto resulta no citotóxico.

Estos resultados concuerdan con otras experiencias obtenidas en nuestro laboratorio con hidroxiapatitas de diferentes fuentes y con lo reportado por otros investigadores.⁷⁻¹⁰ No hemos encontrado en la literatura ninguna evidencia que refleje citotoxicidad de materiales de hidroxiapatita; de hecho este material es el componente mayoritario de la fase mineral del tejido óseo y dental de los vertebrados y numerosas experiencias preclínicas y clínicas han demostrado que las cerámicas de hidroxiapatita son biocompatibles, bioactivas, bioestables y osteoconductoras¹¹⁻¹³.

Los resultados obtenidos con el Biograft-G, granulado denso de β -fosfato tricálcico, se muestran en la Figura 2. En los ensayos de 4 horas, tanto con el material fresco como endurecido, no hay diferencias significativas en los porcentajes de citotoxicidad de este respecto al control negativo ni al control comercial. En los ensayos de 24 horas el porcentaje obtenido difiere en más de un 1 % del

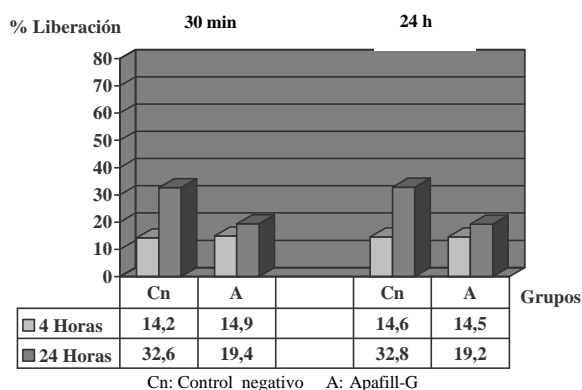


Figura 1. Citotoxicidad *in vitro* del Apafill-G con el material fresco (30 min) y endurecido (24 h). Ensayo a las 4 y 24 horas de contacto.

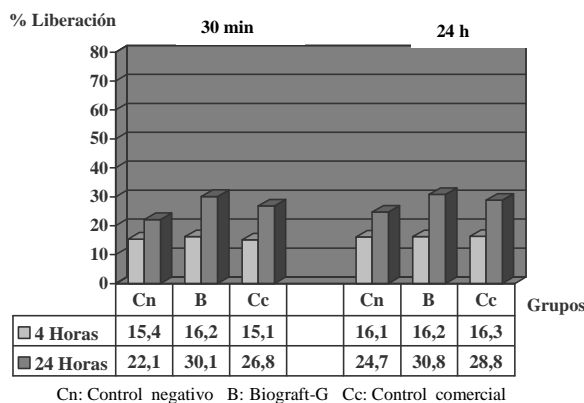


Figura 2. Citotoxicidad *in vitro* del Biograft-G con el material fresco (30 min) y endurecido (24 h). Ensayo a las 4 y 24 horas de contacto.

valor del control negativo, pero no llega a exceder el doble del valor de la media del mismo, siendo este el mismo comportamiento del control comercial, por lo que ambos pueden clasificarse como ligeramente citotóxicos.

En numerosas experiencias preclínicas y clínicas se ha demostrado la excelente biocompatibilidad de las cerámicas de β -fosfato tricálcico, justificándose por el hecho de que está constituido por iones calcio y fósforo, entidades presentes en los fluidos corporales. El β -fosfato tricálcico está presente en un 10 % en el tejido óseo natural, pero su principal atractivo radica en que se ha demostrado por estudios *in vitro* e *in vivo* que este material es más biodegradable que la hidroxiapatita, cualidad que lo convierte en un material muy útil para los implantes temporales que requieren ser sustituidos por tejido óseo en un tiempo relativamente corto.^{14,15}

Los resultados obtenidos con el Cubridem AC y un análogo comercial (Figura 3) indican que ambos son severamente citotóxicos, de acuerdo con la clasificación propuesta, ya que los porcentajes de liberación de ^{51}Cr exceden el doble del valor de la media del control negativo en los ensayos de 24 horas con el material fresco y endurecido y no existe diferencia significativa entre la citotoxicidad del producto y la del control comercial.

Este resultado concuerda con reportes anteriores en la literatura que evidencian que resinas dentales basadas en Bis-GMA y dimetacrilatos de glicoles, como es el caso de las empleadas en este estudio, manifiestan efectos tóxicos significativos sobre cultivos celulares, lo cual se atribuye a la migración de monómeros u oligómeros residuales hacia el cultivo celular^{16,17}.

La liberación de ^{51}Cr a las 4 horas de contacto con el Cubridem AC muestra una disminución sig-

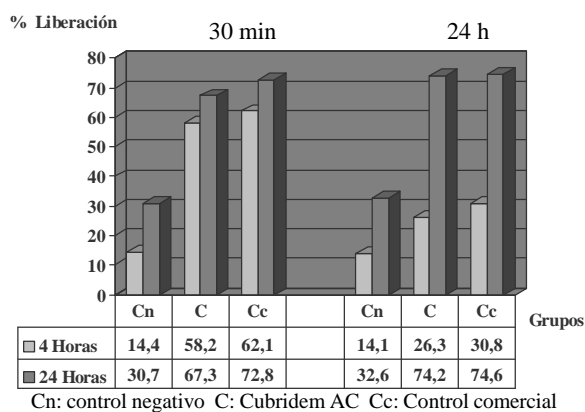


Figura 3. Citotoxicidad *in vitro* del Cubridem AC con el material fresco (30 min) y endurecido (24 h). Ensayo a las 4 y 24 horas de contacto.

nificativa en el ensayo de 24 horas de polimerización del material respecto al de 30 minutos. Esta disminución es causada por la menor cantidad de sustancias migrables al aumentar el tiempo de polimerización del material.

El Obtudent FC también es una resina basada en dimetacrilatos aromáticos tipo Bis-GMA. En el estudio de este producto se empleó un control comercial (Degufill LC), cuyos resultados se muestran en la Figura 4.

Ambos materiales también resultan severamente citotóxicos. Los componentes usuales de las resinas dentales han mostrado acción citotóxica aún en grandes diluciones y se ha demostrado que la extracción previa del material con solventes adecuados provoca reducciones de su citotoxicidad casi en un 90 %¹⁸.

Sin embargo Mjor y Langeland no encontraron relación entre el grado de irritación pulpar *in vivo* y la citotoxicidad *in vitro*^{19,20}. Se ha observado que

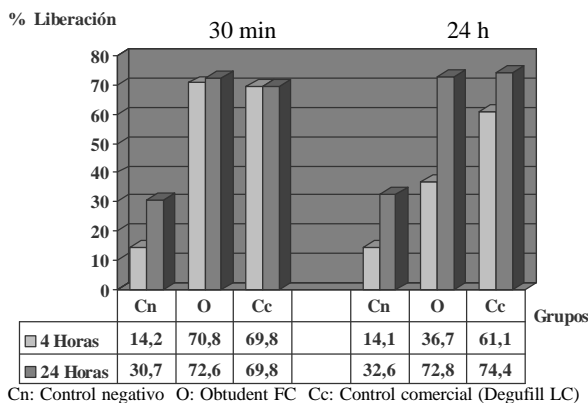


Figura 4. Citotoxicidad *in vitro* del Obtudent FC con el material fresco (30 min) y endurecido (24 h). Ensayo a las 4 y 24 horas de contacto.

resinas dentales colocadas en cavidades dentales profundas con fondo cercano a la pulpa, e incluso con la pulpa expuesta, solo producen una respuesta tóxica muy ligera a pesar de manifestar elevada toxicidad *in vitro*²¹. Este hecho puede atribuirse a que en las técnicas *in vitro* la acción de los migrantes tóxicos sobre las células es constante, mientras que *in vivo* la acción es aguda (temporal), debida a la rápida migración de todo el monómero residual gracias a la acción lixivante y diluyente de la saliva, lo que se apoya en las observaciones de Pham y Ferracane, quienes encontraron que aproximadamente el 60% de los componentes migrables en una resina dental eran eluidos en solución salina durante las 8 horas posteriores al fraguado^{22,23}.

En la Figura 5 se muestran los resultados del estudio del adhesivo tisular Tisuacryl y su control comercial Histoacryl.

Como se observa, el Tisuacryl resulta severamente citotóxico ya que el % de liberación calculado excede el doble del valor de la media de los controles negativos en todos los ensayos, pero se encuentra en el rango del análogo comercial utilizado.

Estos resultados están en correspondencia con lo reportado por Ciapetti y col., quienes encontraron actividades muy citotóxicas en cianoacrilatos evaluados en células L929 por diferentes métodos de tinción²⁴. Se ha demostrado que la citotoxicidad de los polímeros de cianoacrilatos depende de su razón de degradación, que a su vez está dada por el tipo de cadena lateral que posean y por el peso molecular del polímero. Se ha sugerido que los productos de degradación son los responsables de la toxicidad, especialmente el formaldehído²⁵.

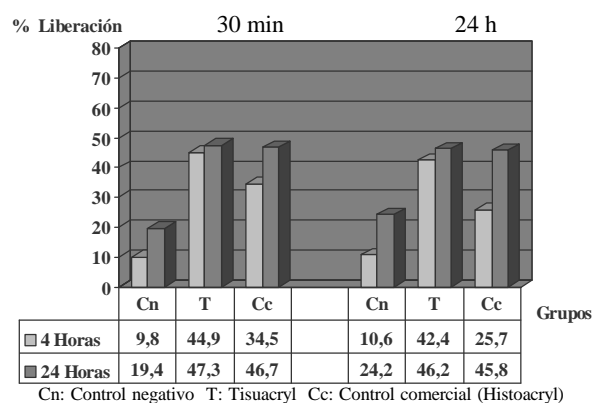


Figura 5. Citotoxicidad *in vitro* del Tisuacryl con el material fresco (30 min) y endurecido (24 h). Ensayo a las 4 y 24 horas de contacto.

Conclusiones

El ensayo de Citotoxicidad *in vitro* es un método sensible, rápido y económico para el tamizaje de biomateriales y equipos médicos implantables. Los niveles de citotoxicidad mostrados por los cinco biomateriales cubanos evaluados estuvieron en todos los casos en el rango de citotoxicidad de sus análogos comerciales. El obturante dental **Obtudent FC** y el sellante dental **Cubridem AC** fueron severamente citotóxicos, de acuerdo a lo reportado para las resinas basadas en dimetacrilatos aromáticos tipo Bis-GMA. El adhesivo tisular **Tisuacryl** resultó severamente citotóxico, lo que se corresponde con lo descrito para los cianoacrilatos. El granulado de β -fosfato tricálcico **Biograft-G** tuvo una ligera toxicidad y la hidroxiapatita **Apafill-G** no resultó citotóxica, lo que está de acuerdo con las características de este tipo de material.

Bibliografía

1. **Bausser H y Chmiel H.** Improvement of the biocompatibility of polymers through surface modification, en: *Polymers in Medicine: Biomedical and Pharmacological Application*, Chiellini E y Giusti P (eds), Plenum Press, New York, (1983), p 297.
2. **Suh H.** Recent advances in biomaterials. *Yonsei Med J.* 1998; 39(2): 87-96.
3. **Vert M, Christel T y Hevay L.** Bioresorbable plastic materials for bone surgery, en: *Macromolecular Biomaterials*, Hastings GW y Ducheyne P (eds), CRC Press, Boca Raton, (1984), p 142.
4. **Trevor Rae.** Tissue culture techniques in biocompatibility testing, en: *Introduction to biocompatibility testing. Techniques of Biocompatibility Testing*, William DF (ed), CRC Series of Biocompatibility, CRC Press, Boca Raton, Florida, (1986), p 81.
5. **Jawequi HO.** Cell adhesion to biomaterials-The role of several extracellular matrix components in the attachment of non-transformed fibroblasts and parenchymal cells. *Trans. Am. Soc. Artif. Inten. Organs*, 1987; 33, 66-74.
6. **Stanley HR** (ed). *Toxicity Testing of Dental Materials*, CRC Press Inc. Boca Ratón, Florida, (1985), p 13.
7. **González R, Melo MC, Rodríguez AC, Pérez A.** Hidroxiapatita forma HAP-200. Principales características físico químicas. *Química Nova.* 1993; 16, 6: 509-512.
8. **González R, Guerra-López J.** Materiales bioactivos para implantes óseos. Características y aplicaciones. Monografía (ed). (1993). CNIC. C. Habana.
9. **Pereda O, González R.** Aplicaciones de la hidroxiapatita Coralina Hap-200 como material de implante óseo en ortopedia. *Biomédica.* 1994; 14: 30-38.
10. **Cabrera H y col.** Efectos histológicos en médula ósea inducido por granulado de hidroxiapatita porosa coralina en ratas aplasiadas. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 1994; 10 (1-2): 17-23.
11. **Costantino PD, Friedman CD, Jones K, Chow LC, Pelzer HJ, Sisson GA.** Hydroxiapatite cement. I. Basic chemistry and histologic properties. *Head Neck Surg.* 1991 Apr; 117 (4): 379-84.
12. **Friedman CD, Costantino Pd, Takagi S, Chow LC.** BoneSource hidroxiapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction. *J.Biomed.Mater.Res.*1998; 43 (4): 428-32.
13. **Fulmer NL, Bussard Gm, Gampper TJ, Edlich RF.** Anorganic bovine bone and analogs of bone mineral as implants for craniofacial surgery: a literature review. *J. Long. Term. Eff. Med. Implants.* 1998; 8 (1): 69-78.
14. **Jarcho M.** Retrospective analysis of hidroxiapatite development for oral implant applications. *Dent. Clinics North Am.* 1992; 36(1): 19-26.
15. **Lu JX, About I, Stephan G, Van Landuyt P, Dejoux J, Fiocchi M, Lemaitre J, Proust JP.** Histological and biomechanical studies of two bone colonizable cements in rabbits. *Bone.* 1999; 25: 41S-45S.
16. **Rathbun, MA y col.** Cytotoxicity of a Bis-GMA dental composite before and after leaching in organic solvents. *J. Biomed. Mater. Res.* 1991; 25: 443-457.
17. **Soderholm KJ, Mariotti A.** Bis GMA-based resins in dentistry: are they safe?. *J. Am Assoc.* 1999; 130(2): 201-9.
18. **Anderson DAF, Zimmerman ER, Ferracane JL.** Cytotoxicity of combinations of dental composite components, *J. Dent. Res.* 1987; 66, 133, Abst. 214.
19. **Mjor IA y Hensten-Pettersen A.** Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation test and pulp studies. *International Dental Journal.* 1977; 27, 124.
20. **Langeland K.** Correlation of screening test to usage test. *J. Endodont.* 1978; 4, 300-3.
21. **Cox CF, Keal HJ, Keal CL.** Biocompatibility of surface sealed dental materials against exposed pulps. *J. Prosthet. Dent.* 1987; 57, 1-8.
22. **Anderson DAF, Ferracane JL, Seale NS.** Pulpar reactions to varably cured and sealed dental composites. *J. Dent. Res.* 1989; 68, 346, Abst 1319.
23. **Pham DC, Ferracane JL.** Leaching from lighth cured . *J. Dental. Res.* 1988; 67,225, Abst 903.
24. **Ciapetti G y col.** Cytotoxicity testing of cianoacrylates using direct contact assay on cell cultures. *Biomaterials.* 1994; 15: 63-67.
25. **Tseng Y, Tabata Y, Hyon S, Ikada Y.** *In vitro* toxicity test of 2-cyanoarylate polymers by cell culture method. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990; 24: 1355-67.