

Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias

Sizue Ota Rogero^{a*}, Ademar Benévolo Lugão^a,
Tamiko Ichikawa Ikeda^b, Áurea Silveira Cruz^b

^aInstituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, 05508-900 São Paulo - SP, Brasil

^bInstituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 335, 01246-902 São Paulo - SP, Brasil

Received: October 10, 2002; Revised: January 8, 2003

A avaliação *in vitro* da biocompatibilidade de diferentes tipos de biomateriais foi realizada pelo teste de citotoxicidade em cultivo de células de tecido conectivo de camundongos, NCTC Clone 929 da American Type Culture Collection. O estudo comparativo do ensaio de citotoxicidade foi realizado com duas metodologias: 1) ensaio de difusão em ágar e 2) ensaio de incorporação do vermelho neutro. Os resultados obtidos demonstraram que ambas as metodologias podem ser utilizadas, de acordo com o tipo de amostra a ser analisada.

Palavras-chaves: *citotoxicidade in vitro, ensaio incorporação vermelho neutro, ensaio difusão em ágar*

1. Introdução

Com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, há a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que possam detectar a toxicidade de dispositivos para uso em seres humanos, principalmente aqueles de aplicação clínica, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada a sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório.

Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação

de colônias celulares¹⁻⁴. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular⁵.

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente em uso em clínicas.

Estudos com estes métodos demonstraram que os testes com culturas celulares podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade

*e-mail: sorogero@baitaca.ipen.br

Trabalho apresentado no 1º Congresso da Sociedade Brasileira em Materiais, Rio de Janeiro, Julho de 2002.

in vitro.

Como a variedade de produtos a serem avaliados tem crescido e muito, há necessidade de se estudar novas metodologias e escolher entre elas a que possa responder melhor quanto à presença de possíveis elementos tóxicos. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade de diferentes biomateriais, comparando duas metodologias: difusão em ágar e incorporação do corante vital vermelho neutro.

2. Materiais e Métodos

Foram utilizadas amostras de biomateriais poliméricos, cerâmicos e metálicos denominados como:

1. Biomateriais poliméricos: P1, P2 e P3
2. Biomateriais cerâmicos: C1, C2 e C3
3. Biomateriais metálicos: M1, M2 e M3

Esses biomateriais estão relacionados na Tabela 1.

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau PA, da marca Merck ou Carlo Erba.

Cultura Celular

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular NCTC Clone 929, células de tecido conectivo de camundongo, (ATCC CCL 1)⁶ na avaliação das duas metodologias. Esta linhagem foi cultivada em meio mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) da Laborclin, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais e 1 mM de piruvato de sódio e mantidas a 37 °C. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,20% (Sigma) e versene 0,02% (ATV) e a suspensão celular foi semeada em quantidades adequadas e em recipientes próprios para cada metodologia.

A determinação da citotoxicidade pode ser através de avaliação qualitativa ou quantitativa. A avaliação qualitativa é realizada pelo exame microscópico das células para verificação de mudanças na morfologia geral, vacuolização, destacamento, lise celular ou de membrana e o resultado é relatado como atóxica, leve, moderada ou severa cito-

toxicidade, que também pode ser numérico (ex. 0, 1, 2, 3). Na avaliação quantitativa é realizada medida de morte celular, proliferação celular ou formação de colônias celulares. O número de células, quantidade de proteínas, liberação de enzimas, liberação ou redução de corante vital ou outro parâmetro de medida pode ser quantificado por meios objetivos.

2.1 Citotoxicidade pelo método de difusão em ágar^{1-3,7,8}

A linhagem celular NCTC Clone 929, na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/ml foi semeada em placa de Petri (15 × 60 mm), no volume de 5 ml e incubada durante 48 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado 5 ml do meio “overlay” em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (Difco) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção com o MEM duas vezes concentrado, ambos a uma temperatura de 44 °C. Fragmentos, com cerca de 0,25 cm² de área superficial dos biomateriais foram colocados sobre o ágar antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% CO₂ a 37 °C por 24 h.

Foram utilizados como controle positivo fragmentos de látex e como controle negativo discos de papel de filtro de natureza comprovadamente atóxica, respeitando a dimensão de área superficial. As amostras foram avaliadas em triplicata.

As placas foram analisadas macroscopicamente quanto a presença de halo e microscopicamente quanto a integridade celular ao redor da amostra. A característica de toxicidade foi constatada pela presença de um halo claro ao redor do material testado. Este halo é observado quando há lise e morte das células, liberando o corante vermelho neutro incorporado nas células, dando um aspecto transparente ao local. A citotoxicidade foi avaliada pela medida do diâ-

Tabela 1. Tipos de biomateriais utilizados para testar duas metodologias no ensaio de citotoxicidade.

Amostra	Polímero	Cerâmica	Metal
P1	Membrana PVP	-	-
P2	Gel PVP - F2C	-	-
P3	Gel PVP - F2K	-	-
C1	-	Cerâmica - C2-10	-
C2	-	Cerâmica - C2-12	-
C3	-	Biovidro	-
M1	-	-	Aço inoxidável 316L
M2	-	-	Aço inox 316L PIM
M3	-	-	Aço inox 17.4 PH PIM

metro deste halo claro formado, medido com uma régua milimétrica.

2.2 Citotoxicidade pelo método de incorporação do vermelho neutro^{5,9,10}

Neste método foram utilizados os extratos das amostras preparados de acordo com a norma ISO 10993-5⁹. Estes extratos foram diluídos em série (50; 25; 12,5 e 6,25%), com o meio de cultura utilizado na manutenção da linhagem celular. Como controle negativo foram utilizados: *pellets* de PVC [poli (cloreto de vinila) estabilizada com estanho, atóxico, da Dacarto SA Indústria de Plásticos] para polímeros; placas de Ti (Multi Alloy Ltda) para metais e alumina (Carlo Erba) para cerâmicas e como controle positivo solução de fenol 0,02%. O controle negativo é utilizado para demonstrar na prática a resposta celular no ensaio e o controle positivo para comprovar uma resposta apropriada do sistema no teste.

Volumes de 0,2 ml de uma suspensão, com $2,5 \times 10^5$ células/ml da linhagem NCTC Clone 929, foram distribuídos nos poços da microplaca com 96 orifícios. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C em estufa úmida com 5% de CO₂ para a formação da monocamada celular. O meio de cultura foi substituído pelas diluições seriadas dos extratos das amostras e dos respectivos controles, em triplicatas. A microplaca foi novamente incubada a 37 °C.

Após 24 h o extrato foi substituído por 0,2 ml de meio MEM contendo 50 µg de vermelho neutro/ml. A incorporação do vermelho neutro pelas células vivas foi verificada após 3 h, incubadas a 37 °C. O meio foi removido e as células lavadas com tampão fosfato-salina (PBS), seguida de outra lavagem com uma solução de CaCl₂ em formaldeído (1% de CaCl₂ em formaldeído 0,5%). Após descarte, cada poço recebeu 0,2 ml da solução de ácido acético em etanol (1% ácido acético em etanol 50%). A placa foi agitada por 10 min e a leitura das densidades ópticas (DO) foi realizada num espectrofotômetro Organon Teknika Reader 530 version 1.24, em 540 nm. Com os valores obtidos calculou-se a média da porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle de células (100%), que foi colocada em função da concentração do extrato em gráfico para obter as curvas de viabilidade celular. Através desta curva pode-se encontrar o índice de citotoxicidade (IC_{50%}) que significa a concentração do extrato que induz 50% de lise ou morte celular e como consequência a inibição de incorporação do vermelho neutro.

3. Resultados e Discussão

Nenhum dos biomateriais poliméricos, cerâmicos e metálicos analisados neste estudo apresentaram efeito tóxico pelo método de difusão em ágar. Não foi observado halo de toxicidade ao redor ou sob as amostras e as células se

mostraram integras sem nenhuma alteração morfológica, apresentando comportamento idêntico ao controle negativo. Quanto ao controle positivo foi observado um halo com diâmetro de 21 mm ao redor da amostra, confirmando a toxicidade inerente ao material e o desempenho do método, como pode ser observado na Tabela 2.

Na Fig.1 são apresentadas as curvas de viabilidade celular dos biomateriais poliméricos. Todas as amostras poliméricas apresentaram comportamento semelhante ao controle negativo, não tóxico, com IC_{50%} maior que 100. Nas duas metodologias estudadas os biomateriais poliméricos apresentaram resultados semelhantes, como materiais não tóxicos.

As curvas de viabilidade celular dos biomateriais cerâmicos no teste pela incorporação do vermelho neutro estão apresentadas na Fig. 2. A amostra C3 comportou-se de maneira semelhante nas duas metodologias, sendo que

Tabela 2. Resultados do teste de citotoxicidade dos biomateriais pelo método de difusão em ágar.

Amostras	Diâmetro do halo em mm
Controle negativo	0,0
Controle positivo	21,0
P1	0,0
P2	0,0
P3	0,0
C1	0,0
C2	0,0
C3	0,0
M1	0,0
M2	0,0
M3	0,0

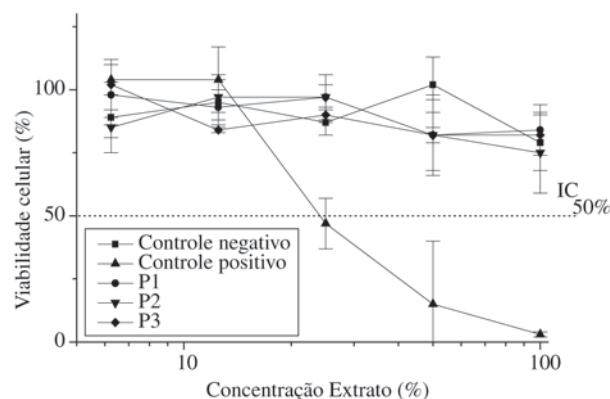


Figura 1. Curvas de viabilidade celular dos biomateriais poliméricos no teste de citotoxicidade pela incorporação do vermelho neutro.

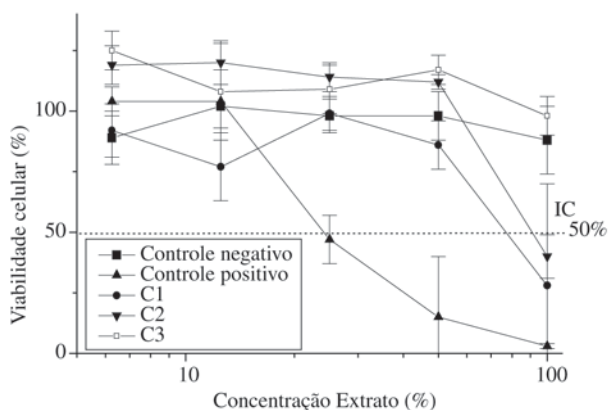


Figura 2. Curvas de viabilidade celular dos biomateriais cerâmicos no teste de citotoxicidade pela incorporação do vermelho neutro.

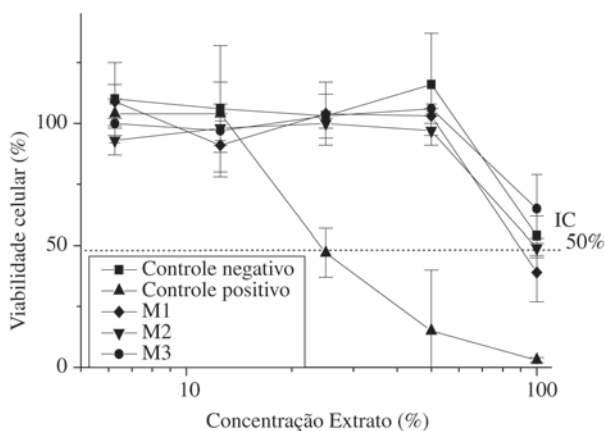


Figura 3. Curvas de viabilidade celular dos biomateriais metálicos no teste de citotoxicidade pela incorporação do vermelho neutro.

as amostras C1 e C2 demonstraram leve toxicidade no método de incorporação do vermelho neutro com $IC_{50\%}$ de 82 e 93 respectivamente. No teste de difusão em ágar todas as cerâmicas mostraram-se atóxicas. As diferenças dos resultados obtidos nos materiais cerâmicos podem ser explicadas pela diferença de tempo de extração dos possíveis elementos tóxicos existentes. Na difusão em ágar esses elementos se difundem através da camada de ágar até atingirem as células, em 24 h, sendo que na outra metodologia esses elementos foram extraídos num período de 48 h e o extrato obtido foi colocado diretamente na camada celular, podendo assim provocar maior efeito.

Na Fig. 3 temos as curvas de viabilidade celular dos biomateriais metálicos e os resultados foram concordantes nas amostras M2 e M3 nos dois métodos, atóxicas. A amostra M1, não tóxica no método de difusão em ágar, apresentou leve toxicidade no teste de incorporação do vermelho

neutro com $IC_{50\%}$ de 92. Esta pequena diferença de toxicidade pode ser devida ao tempo de extração de 10 dias no ensaio de incorporação e o tempo de difusão de 1 dia no ensaio de difusão. A extração por 10 dias pode resultar numa lixiviação de elementos químicos para a solução.

4. Conclusão

O teste de citotoxicidade pela difusão em ágar é uma técnica qualitativa que pode ser utilizado para materiais de diferentes constituições físicas, inclusive para materiais oleosos como os cosméticos, devido sua praticidade e conveniência. Por outro lado, o teste, pelo método de incorporação do vermelho neutro apesar de ser um ensaio quantitativo, podendo ser calculado o índice de citotoxicidade, a extração dos possíveis elementos ou compostos tóxicos é realizada em meio aquoso, dificultando a análise de certos materiais.

De um modo geral podemos afirmar que as duas metodologias são equivalentes e a escolha do método de ensaio mais adequado deve ser feita de acordo com o tipo e uso da amostra a ser analisada e a disponibilidade de equipamentos de cada laboratório. As pequenas diferenças de resultados observados nas duas metodologias podem estar relacionadas com o tempo de extração.

Agradecimento

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

1. Cruz, A.S.; Cuppoloni, K.M.; Martinez, C.H.O.; Gomes, L.F.S. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, v. 47, n. 1/2, p. 51-57, 1987.
2. Guess, W.L.; Rosenbluth, S.A.; Schmidt, B.; Autian, J. *J.Pharm Sci*, v. 54, p. 1545-1547, 1965.
3. Rogero, S.O.; Souza-Bazzi, A.; Ikeda, T.I.; Cruz, A.S.; Fernandes, K.C.; Higa, O.Z. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, v. 59, n. (1/2), p. 1-5, 2000.
4. Rogero, S.O.; Higa, O.Z.; Saiki, M.; Correa, O.V.; Costa, I. *Toxicology in Vitro*, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.
5. Ciapetti, G.; Granchi, D.; Verri, E.; Savarino, L.; Cavedagna, D.; Pizzoferrato, A. *Biomaterials*, v. 17, p. 1259-1264, 1996.
6. American Type Culture Collection: Catalogue of Cell Lines & Hybridomas. 8th ed. Rockville, 1994.
7. Cell Culture Test Methods. ASTM-STP 810 S.A. Brown ed. American Society for Testing and Materials, 1983.
8. United States Pharmacopeia, USP XXIII, Rockville, Twinbrook Parkway, v. 23, p. 97-99, 1995.
9. International standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10993-5, 1992.
10. Borenfreund, E.; Babich, H.; Martin-Alguacil, N. *Toxicology in vitro*, v. 2, p.1-6, 1988.