



RELATÓRIO DE PESQUISA

Determinação *in vitro* da citotoxicidade através do método de difusão em Ágar

Contato: Eduardo Van Roost

Empresa Contratante: RES Brasil S/S Ltda.

Endereço: Av. Pedro Celestino Penteado, nº 66 – Cj 7

CEP: 0770-000

Cidade: Jordanésia – Município de Cajamar

UF: SP

Fone: (19) 8111-1311

Fax: (11) 3611-0957

Orçamento Nº: DosABi 0061/2007

Data de Início do Teste: 05/11/2007

Data de Emissão do Relatório: 22/11/2007

Amostra:	Lote:	Código Interno:
Aditivo Oxi-biodegradável d2w93224	Não consta	07-0061-01
Envelope plástico em pebd com 1% de aditivo oxi-biodegradável d2w93224 em estado de degradação	Não consta	07-0061-02

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	2
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	2
3.1. Materiais e equipamentos.....	2
3.2. Preparação das culturas de células.....	2
3.3. Preparação e aplicação das amostras.....	3
3.4. Detecção da viabilidade celular pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro.....	3
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	4
4.1. Determinação da citotoxicidade das amostras.....	4
5. CONCLUSÃO.....	6
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7

1. INTRODUÇÃO

Métodos “in vitro” que utilizam culturas celulares têm sido padronizados para avaliação da toxicidade de biomateriais, principalmente aqueles de aplicação clínica, que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente. Estes testes de citotoxicidade consistem em adicionar 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 celulares.

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 passam 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 sendo possível distinguir entre células vivas e danificadas ou mortas, pela medida de intensidade de cor da cultura celular.

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. Podem ainda serem utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade.

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 citotoxicidade, que também pode ser numérico. 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.

Para o presente estudo, foi realizado um ensaio de citotoxicidade por difusão em Ágar em cultura de células de fibroblastos de camundongo (3T3). Essa linhagem foi selecionada pois já encontra-se estabelecida e é bastante utilizada em experimentos de citotoxicidade por apresentar reprodutibilidade nos resultados em vários laboratórios que utilizam este método.

O ensaio em questão, é apropriado para avaliação de materiais de diferentes tamanhos e densidades, que poderiam danificar as células em um contato direto. Além disso, este teste pode ser utilizado para amostras não estéreis, materiais e formulações em desenvolvimento, principalmente aqueles de aplicação clínica, como parte de um controle de qualidade da empresa responsável.

2. OBJETIVO

Determinar a citotoxicidade das amostras **Aditivo oxi-biodegradável d2w93224** e **Envelope plástico em pebd com 1% de aditivo oxi-biodegradável d2w93224 em estado de degradação fabricado pelo empresa VISUART EMBALAGENS**, através do método de difusão em **Ágar para fibroblastos de camundongo (3T3)** mantidos em cultura, encaminhadas pela empresa **RES Brasil S/S Ltda.**

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais e equipamentos

- Culturas de fibroblastos de camundongo (3T3) mantidas em Garrafas T-75
- Meio de cultura: Modified Eagle Medium (MEM)
- Ampicilina + Estreptomicina
- Soro fetal bovino (SFB)
- Tripsina 0,25%
- Ágar 3%
- Discos de Filtro de papel
- Solução de Hanks
- Neutral Red
- Placas de cultura de 6 poços
- Tubos de 50 mL
- Tubos de 15 mL
- Pipetas de 5 e 10 mL descartáveis
- Pipetas de vidro tipo Pasteur
- Pipetas automáticas monocanal
- Câmara de Neubauer
- Régua milimetrada
- Estufa de CO₂
- Microscópio invertido
- Fluxo laminar vertical
- Estufa para esterilização
- Autoclave

3.2. Preparação das culturas de células

As culturas de fibroblastos de camundongos (3T3) mantidas em garrafas T-75 foram tripsinizadas. A suspensão celular obtida foi usada para semear culturas de células em placas de 6 poços. Cada poço recebeu cerca de 5×10^4 células. As culturas foram mantidas em meio MEM/10%SFB incubadas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 48 horas.

3.3. Preparação e aplicação das amostras

Após este período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado 1 ml do meio “overlay” em cada poço. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (Difco) a 3%. 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. O meio foi deixado gelificar.

As amostras a serem testadas foram cortadas em discos (diâmetro de 5mm) e colocadas sobre o ágar. As placas foram incubadas novamente em estufa com CO₂ 5% a 37°C por 24 h.

Foram utilizados como controle positivo disco de papel de filtro (diâmetro de 5mm) embebidos com Fenol. Como controle negativo, foram utilizados apenas discos de papel de filtro, de natureza comprovadamente atóxica, na mesma dimensão. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata.

3.4. Detecção da viabilidade celular pelo ensaio de incorporação do vermelho neutro

Após 24 horas as amostras foram retiradas do contato com o gel. Foi então adicionado 2mL do corante vermelho neutro (0,01%) em cada poço e as placas foram incubadas por 1 h.

Após esse período, 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 diâmetro deste halo claro formado (Tabela 1), medido com uma régua milimétrica, bem como pela análise da morfologia celular (Tabela 2).

Tabela 1: Descrição do tamanho do Halo formado.

Classificação (índice)	Descrição do Halo
0	Não detectado formação de Halo
1	Halo somente abaixo da amostra
2	Halo expandido (< 0,5 cm) ao redor da amostra
3	Halo expandido (0,5 -1cm) ao redor da amostra
4	Halo expandido (>1cm) ao redor da amostra
5	Halo envolvendo todo poço

Tabela 2: Descrição da quantidade de células mortas no Halo.

Classificação (índice)	Descrição de Lise Celular
0	Não detectado citotoxicidade
1	< 20% da área afetada (halo)
2	20-39% da área afetada (halo)
3	40-59% da área afetada (halo)
4	60-80% da área afetada (halo)
5	> 80% da área afetada (halo)

A partir das classificações acima, pôde ser calculada a resposta final de citotoxicidade, (índice de resposta (IR)), representada através da fração:

$$\text{IR} = \text{índice do Halo} / \text{índice de Lise celular no Halo}$$

Quanto maior IR, maior a citotoxicidade da amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da citotoxicidade das amostras

As amostras foram testadas quanto a capacidade de induzir a morte (citotoxicidade) em fibroblastos de camundongo (3T3) mantidos em cultura. Para isso as culturas de células presentes em placas de 6 poços foram expostas, em contato indireto, às amostras e o efeito citotóxico verificado pelo ensaio de incorporação do Vermelho Neutro. Os resultados de citotoxicidade podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição do Halo

Amostras	Halo	Lise Celular	IR
Controle positivo (Filtro de papel)	0	0	0/0
Controle negativo (Filtro de papel +Fenol)	1	5	1/5
DosABi0061-01	0	0	0/0
DosABi0061-02	0	0	0/0

O resultado foi baseado em dados observacionais. Macroscopicamente as amostras Aditivo oxi-biodegradável d2w93224 (DosABi 0061-01) e Envelope plástico em pebd com 1% de aditivo oxi-biodegradável d2w93224 em estado de degradação (DosABi 0061-02) não apresentaram citotoxicidade visto que não foram observados halos ao redor ou sob as mesmas. Microscopicamente, para ambas as amostras, as células se mostraram integras sem nenhuma alteração morfológica, apresentando comportamento idêntico ao controle negativo.

Quanto aos controles positivos (duplicata) foram observados halos com diâmetro de 5 e 7mm sob a amostra, confirmando a toxicidade inerente ao material e o desempenho do método. Foi observado ainda nestes poços, alterações na morfologia celular. As células antes aderidas em sua forma original, tornaram-se arredondadas, indicando a morte das mesmas.

5. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada para avaliar a citotoxicidade das amostras: Aditivo oxi-biodegradável d2w93224 e Envelope plástico em pebd com 1% de aditivo oxi-biodegradável d2w93224 em estado de degradação, encaminhadas pela empresa RES Brasil S/S Ltda., pôde-se concluir que, nas condições usadas no teste:

As produtos Aditivo oxi-biodegradável d2w93224 e Envelope plástico em pebd com 1% de aditivo oxi-biodegradável d2w93224 em estado de degradação não apresentaram efeito citotóxico.

Este relatório destina-se exclusivamente ao uso interno da empresa RES Brasil S/S Ltda., não podendo ser utilizado em quaisquer veículos de comunicação sem autorização por escrito do autor.

Coordenador da Pesquisa (Alexandre Hamilton P. Ferreira)



22/11/2007



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- GUESS, W.L.; Rosenbluth, S.A.; Schimidt, B; Autian, J. Agar difusion method for toxicity screening of plastic on cultured cell monolayers, J.Pharm Sci, v. 54, p. 1545-1547, 2006.
- 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.
- ROGERO, S.O.; Higa, O.Z.; Saiki, M.; Correa, O.V.; Costa, I. Toxicology in Vitro, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.
- CIAPETTI, G.; Granchi, D.; Verri, E.; Savarino, L.; Cavedagna, D.; Pizzoferrato, A. Biomaterials, v. 17,p. 1259-1264, 1996.
- AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION: Catalogue of Cell Lines & Hybrydomas. 8th ed. Rockville , 1994.
- CELL CULTURE TEST METHODS. ASTM-STP 810 S.A. Brown ed. American Society for Testing and Materials, 1983.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP XXIII, Rockville, Twinbrook Parkway, v. 23, p. 97-99, 1995.
- INTERNATIONAL STANDARD: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods.
- ROGERO, S.O.; Lugão, A.B.; Ikeda, T.I; Cruz, A.S. Teste in vitro de citotoxicidade: Comparação entre duas metodologias. Material Research,v.6,n.3, p.317-320, 2003.