

## ANÁLISE COMPARATIVA DE DIFERENTES MÉTODOS DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

A. O. Masson\*, M.H.M. Nascimento\*, C. B. Lombello\*

\*Universidade Federal do ABC, Santo André, Brasil  
e-mail: anand.masson@gmail.com

**Resumo:** A avaliação biológica é etapa fundamental no desenvolvimento de todo biomaterial que visa aplicação clínica, como arcabouços em Engenharia de Tecidos, por exemplo. Atualmente, os testes de citotoxicidade compõem a fase inicial de análise de biocompatibilidade cujo objetivo primário é determinar a segurança do biomaterial e servir como critério de exclusão. Utilizando amostras de *Bioglass*® 45S5 e vitrocerâmica do sistema 3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO fez-se um estudo comparativo dos ensaios de citotoxicidade empregando os métodos de difusão em ágar e de extração, e ensaio quantitativo de MTT, além de análises morfológicas via microscopia óptica. Os resultados em todos os métodos, morfológico e quantitativo, utilizados foram análogos e mostraram comportamento não citotóxico das amostras.

**Palavras-chave:** Testes de citotoxicidade, Biovidro e vitrocerâmica, Biomaterial, Engenharia de Tecidos.

**Abstract:** *The biological evaluation is a critical stage in the development of all biomaterial that aims clinical use, such as scaffolds in tissue engineering. Currently, the cytotoxicity tests represent the starting point in every biocompatibility analysis, whose primary objective is to determine the safety of the biomaterial and serve as exclusion criteria. By using samples of Bioglass® 45S5 and glass-ceramics from the 3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO system it was possible to do a comparative study of the cytotoxicity assay employing the agar overlay and extraction methods, and the quantitative MTT assay, besides morphological analysis through optical microscopy. The results for all methods employed, morphological and quantitative, were similar and showed that the samples had no cytotoxic effects.*

**Keywords:** *Cytotoxicity tests, Bioglass and glass-ceramic, Biomaterial, Tissue engineering.*

### Introdução

Diversos biomateriais têm sido desenvolvidos e aplicados na Engenharia de Tecidos, no intuito de sustentar e guiar o reparo e/ou a regeneração tecidual [1-4]. Área esta rica para a pesquisa e desenvolvimento, uma vez que nenhum biomaterial é apropriado a todas as aplicações intencionadas, e novas aplicações surgem continuamente conforme as ciências avançam.

Sabe-se que tanto a morfologia, quanto a atividade metabólica e o comportamento das células (i.e. adesão,

proliferação, diferenciação) são influenciados pelos biomateriais, quando na aplicação clínica. Logo, a avaliação da interação destes com o tecido hospedeiro, e da resposta biológica desencadeada devido a esta interação é essencial para a biocompatibilidade [5-7].

De acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO 10993-5, 2009) [8], o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é etapa primária e imprescindível na caracterização de biocompatibilidade de qualquer biomaterial a ser utilizado como produto para a saúde, ou parte deste; não apenas como critério de exclusão, mas para que seja estabelecido um maior nível de segurança referente à resposta biológica *in vivo* [6-9].

Diante deste cenário, percebe-se a relevância e necessidade de estudos voltados para a avaliação biológica de biomateriais, bem como o desenvolvimento e padronização dos testes que compõem a avaliação biológica *in vitro*, especialmente diante das questões éticas quanto ao uso de experimentação animal e ensaios *in vivo*.

O objetivo deste estudo foi comparar ensaios de citotoxicidade *in vitro*, pelos métodos de difusão em ágar e extração, em amostras de *Bioglass*® 45S5 e vitrocerâmica do sistema 3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO, biomateriais com potencial de aplicação como arcabouços em Engenharia de Tecidos.

### Materiais e métodos

**Amostras** – Os biomateriais utilizados foram o *Bioglass*® 45S5 e vitrocerâmica do sistema 3CaO.P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO obtida por tratamento a 775°C - 4 horas, cujo processamento é descrito em [10], ambas amostras de formato cilíndrico ( $\phi$ 12 mm x 3 mm).

**Linhagens Celulares** – Foram utilizadas duas linhagens celulares recomendadas para ensaios de citotoxicidade: NCTC Clone 929 (ATCC/CCL-1) e Vero (ATCC/CCL-81) [11], fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL) foram cultivadas em Meio Mínimo de Eagle - MEM (fonte: IAL) e em meio de cultura Ham F-10 (Sigma-Aldrich), respectivamente, suplementados com 10% de soro fetal bovino (SBF) (Cultilab), 100µg/ml de penicilina/estreptomicina e aminoácidos não essenciais (fonte: IAL), mantidas em estufa a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> (Sanyo/Modelo HC 17AC).

**Método de difusão em ágar** – As amostras foram posicionadas sobre camada de meio *overlay* - ágar, meio

de cultura MEM e corante vermelho neutro (Merck) - quase solidificada, que recobria a monocamada de células. Foi utilizada a linhagem NCTC Clone 929, previamente semeada com 5ml de suspensão de  $3 \times 10^5$  células/ml em placas de Petri. Como controle positivo utilizou-se fragmento de látex, e como positivo papel filtro (Away), ambos com cerca de 5 mm de diâmetro.

Após 24 horas de incubação as placas de Petri foram analisadas macroscopicamente e microscopicamente, sendo a citotoxicidade avaliada pela presença de um halo claro sob ou ao redor das amostras e dos controles [8,12]. O diâmetro do halo indicativo da citotoxicidade foi medido em estereomicroscópio (Leica/Modelo MDG33).

**Método de extração** – Os extratos de cada amostra foram preparados no meio de cultura Ham F-10 [8], e adicionados a cada poço de duas microplacas de cultura de 24 poços (TPP) contendo, respectivamente, monocamadas de células das linhagens NCTC Clone 929 e Vero, previamente semeadas. As culturas foram incubadas por 24 horas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Como controle negativo utilizou-se o próprio meio de cultivo, e como positivo, fragmentos de látex incubados em meio (para as células NCTC Clone 929), e solução de fenol 0,25% (Synth) (para as células Vero).

Após incubação por 24 horas os extratos e controles foram removidos e substituídos de acordo. Na microplaca contendo a linhagem NCTC Clone 929, foi adicionado meio MEM (Sigma-Aldrich) contendo vermelho neutro. A captura do corante pelas células vivas foi avaliada após incubação a 37°C por 3 horas. As células foram fixadas com formaldeído 4% (Sigma-Aldrich) e coradas com Azul de Toluidina 0,1% (Sigma-Aldrich). A microplaca contendo células da linhagem Vero foi fixada em glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich), e corada com Giemsa 2% (Dinâmica). As análises morfológicas foram realizadas ao microscópio de luz invertido (ZEISS/Modelo AxioVert A1).

**Ensaio de MTT** – Foi utilizada solução de 5mg/ml de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich) durante 4 horas, nas microplacas de 96 poços (TPP) contendo monocamadas da linhagem Vero. As células foram previamente incubadas por 24 horas em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a 37°C nos extratos de cada amostra e controles, positivo (fenol 0,25%) e negativo (Ham F-10), como descrito no método anterior. O ensaio foi realizado em triplicata. Após incubação por 24 horas em estufa nas mesmas condições, o MTT foi removido e adicionou-se 50µl de Dimetilsulfóxido (Synth) a cada poço. A absorbância das soluções resultantes foi medida em leitor de Elisa (SpectraMax/ Modelo M5) em  $\lambda = 570\text{nm}$ , e por conseguinte a viabilidade celular pôde ser quantificada pela diferença entre o valor médio de absorbância das amostras e controles, para com a do branco, sendo o resultado obtido para o controle negativo considerado como 100% de células viáveis.

## Resultados

A Figura 1 ilustra as placas de cultura submetidas ao teste de citotoxicidade por difusão em ágar, referentes ao controle positivo (látex) e amostras de biovidro e vitrocerâmica, cujas localizações foram demarcadas nas placas de Petri antes de sua remoção de cima da camada de ágar. Em primeira análise, macroscópica, apenas o controle positivo apresentou a formação de halo sob e ao redor da amostra (Fig.1A). No entanto, ao submeter as placas de cultura à análise microscópica foi identificada região de moderada descoloração sob a vitrocerâmica (Fig.1C), e de diâmetro inferior a esta.

Na mesma figura são apresentados os diâmetros das zonas claras, representativo de citotoxicidade, medidos em estereoscópio. O controle positivo apresentou um halo de 7,63 mm, descontado o valor do raio da amostra (2,5 mm). Já a vitrocerâmica apresentou uma zona clara de 4,87 mm de diâmetro.

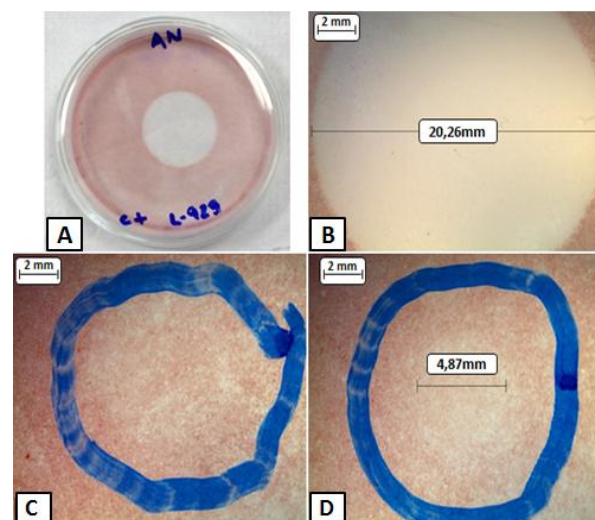


Figura 1: Visão macroscópica da placa de cultura de células NCTC Clone 929, do controle positivo (A) e fotomicrografias em estereoscópio das monocamadas de células do mesmo controle (B), amostra de *Bioglass*® (C) e vitrocerâmica (D), e respectivos diâmetros de halo, se presentes.

Quanto ao aspecto morfológico analisado por microscopia de luz, constatou-se a presença de células lisadas e morfológicamente alteradas no interior do halo do controle positivo. Já a monocamada celular sob a vitrocerâmica, em sua zona mais clara, apresentou comportamento e morfologia compatíveis ao controle negativo e encontrado nas regiões mais fortemente coradas sob e ao redor da demarcação. O *Bioglass*® não apresentou qualquer alteração visível, por qualquer análise, no método de difusão em ágar.

As monocamadas celulares resultantes do teste de extração por captura de vermelho neutro, das amostras e controles, são apresentadas pela Figura 2.

De maneira geral as culturas submetidas aos extratos de biovidro e vitrocerâmica neste ensaio apresentaram morfologia compatível à do controle negativo, ou seja,

células poliédricas, que não chegam ao formato fusiforme, núcleo íntegro arredondado, além da ausência de lise celular e debris. Há ainda células que aparentam estar em divisão, com formato arredondado em meio à cultura celular. Este comportamento diferindo muito do encontrado no controle positivo, onde há densidade celular menor e morfologia diferente daquela tida como padrão. Além disso, há ausência de células coradas, o núcleo de difícil visualização, e muitas células arredondadas e em destacamento.

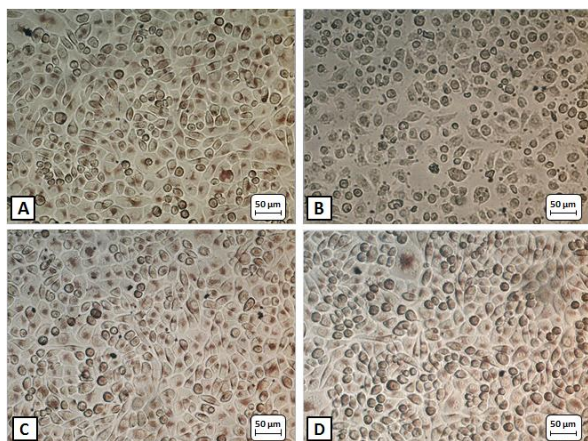


Figura 2: Fotomicrografias da linhagem NCTC Clone 929 submetidas ao teste de extração com captura de vermelho neutro, para os controles negativo (A) e positivo (B), e amostras de *Bioglass*® 45S5 (C) e vitrocerâmica (D), ilustrando as células coradas e lisadas.

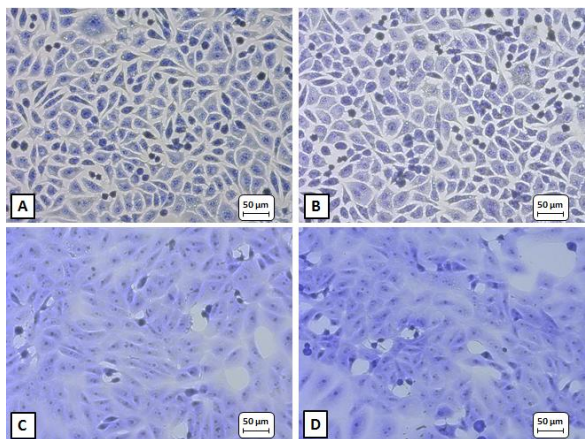


Figura 3: Fotomicrografias das monocamadas de controle negativo e vitrocerâmica das linhagens NCTC Clone 929 (A e B) e Vero (C e D) submetidas ao teste de extração e coradas com Azul de Toluidina e Giemsa, respectivamente.

O mesmo padrão morfológico descrito acima pôde ser identificado nas monocamadas da linhagem NCTC Clone 929 coradas com Azul de Toluidina em ensaio de extração. A Figura 3, em seus itens A e B, ilustra a morfologia obtida pelo controle negativo e amostra de vitrocerâmica, respectivamente, para esta linhagem. Já

os itens C e D da mesma figura fazem a comparação das monocamadas resultantes da linhagem Vero corada com Giemsa após contato com os extratos das mesmas amostras (controle e vitrocerâmica).

Fica evidente o caráter não citotóxico da vitrocerâmica, dada a similaridade morfológica e de confluência celular entre amostra e controle negativo de uma mesma linhagem, reforçado pelo comportamento fibroblástico apresentado e inerente a ambas as linhagens.

Os resultados de viabilidade celular para cada um dos grupos de amostras, calculados a partir da média dos valores de absorbância, são representado, em porcentagem, na Figura 4.

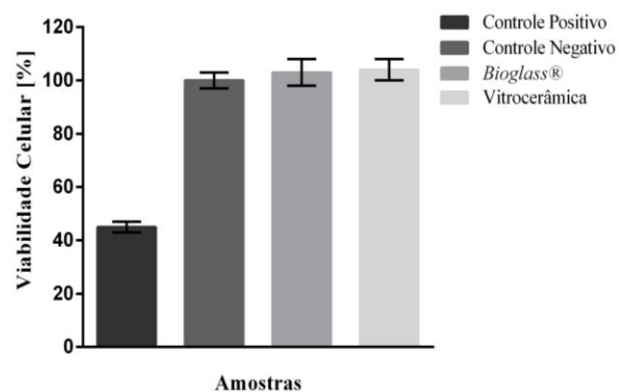


Figura 4: Gráfico de viabilidade celular

O padrão citotóxico (controle positivo) correspondeu a 45% de células viáveis, enquanto os resultados provenientes das amostras de *Bioglass*® e da vitrocerâmica do sistema  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$  não resultaram em diferença estatisticamente significativa quando comparado ao controle negativo, não citotóxico, considerado como parâmetro de 100% de viabilidade celular.

## Discussão

Como já mencionado, uma das propriedades mais importantes de se conhecer na avaliação biológica de um biomaterial, é o efeito inicial e potencialmente tóxico do mesmo para as células. Os testes de citotoxicidade têm por base a exposição de uma cultura de linhagem celular recomendada, ou linhagem primária (se pertinente), ao contato direto ou indireto com determinada substância ou material alvo de análise, avaliando-se as alterações celulares resultantes da interação por tempo e condições apropriadas de exposição com o mesmo [7,8].

Os principais métodos utilizados são os indiretos; difusão em ágar e de extração, pois previnem o dano mecânico às células, presente no método de contato direto, enquanto permitem a difusão de substâncias presentes no biomaterial em teste através do ágar ou para o extrato durante incubação [9,13]. Para tais ensaios, o parecer de citotoxicidade é baseado nas alterações morfológicas das células como, por exemplo,

lise celular, vacuolização, destacamento, inibição de proliferação e integridade da membrana. Este último por meio de corantes vitais como o vermelho neutro, que indica a viabilidade celular [7-9,12], e pode ser aplicado tanto no método de difusão em ágar quanto no de extração com incorporação de vermelho neutro.

Foi observada zona mais clara no teste com ágar sob a vitrocerâmica, proveniente da capacidade deste material em absorver o corante e não resultante de qualquer efeito citotóxico do mesmo. A análise microscópica desta mesma região evidencia células de comportamento e morfologia análogos ao encontrado no controle negativo e de acordo com o esperado para a linhagem celular NCTC Clone 929 [8,9,13].

Ademais, ambas as linhagens celulares submetidas ao contato com o extrato da vitrocerâmica exibiram comportamento atóxico, cuja morfologia e viabilidade foram também análogas aos controles negativos empregados, ou seja, sem lise celular e presença de monocamadas aderidas. Logo, é possível classificar a vitrocerâmica do sistema  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$  como não citotóxica. Isto é reforçado ainda pela similaridade com os resultados obtidos por todos os métodos, com o *Bioglass*®, já que este biomaterial tem sua não-citotoxicidade amplamente abordada em literatura [1, 2,14].

O ensaio de MTT é um teste colorimétrico que analisa a viabilidade ou proliferação celular de acordo com a atividade metabólica das enzimas da mitocôndria de células vivas, que reduzem o sal solúvel de tetrazólio (de coloração amarela), em cristais de formazan (azul/violeta). A intensidade de coloração refere, portanto, ao número de células viáveis, sendo possível aferir a citotoxicidade por meio da medida de absorbância em espectrofotômetro [6,8].

Vale ressaltar que todos os métodos discutidos, até então, se baseiam principalmente em parâmetros qualitativos, relacionados a observações e análises descritivas da morfologia celular. Sendo assim, o ensaio quantitativo de MTT se apresenta como uma técnica complementar aos outros testes de avaliação *in vitro* de citotoxicidade.

Em se tratando do ensaio quantitativo de MTT, os resultados obtidos para cada uma das amostras, mais uma vez reforçam o caráter atóxico dos biomateriais testados. Atualmente este ensaio consta, inclusive, em norma ISO [8], e é amplamente usado na avaliação de citotoxicidade de biomateriais [6-8].

## Conclusão

A análise de citotoxicidade por diferentes métodos *in vitro* permitiu a observação de um caráter não citotóxico das amostras utilizadas. Vale ressaltar, no entanto que a determinação da segurança e biocompatibilidade da vitrocerâmica em teste, requer a realização de ensaios adicionais de avaliação biológica.

Do ponto de vista comparativo, todos os métodos são válidos, mas cabe ao pesquisador escolher aquele de menor interferência dependendo do material utilizado.

Ademais, o ensaio de MTT é importante na avaliação de citotoxicidade, pois complementa a análise morfológica, em razão de seu caráter quantitativo.

## Agradecimentos

À Profa. Mariselma Ferreira pelo suporte técnico e Profa. Juliana Daguano pelas amostras de biomateriais. Os autores agradecem também à UFABC e ao Instituto Adolfo Lutz pela estrutura fornecida.

## Referências

- [1] Gerhardt LC, Boccaccini AR. Bioactive glass and glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. *Materials*. 2010; 3(7): 3867-3910.
- [2] Rahaman MN et al. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta biomaterialia*. 2011; 7(6): 2355-2373.
- [3] Hutmacher DW, et al. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2007; 1(4): 245-260.
- [4] Liu X, Ma PX. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*. 2004; 32(3):477-486.
- [5] Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS. Biomateriais: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.
- [6] Freshney RI. Culture of animal cells: a manual of basic techniques. 6ª ed. New Jersey: Wiley, 2010.
- [7] Bumgardner JD et al. Biocompatibility testing. Em: G.E. Wnek, G.L. Bowlin, editors. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*, vol.1. 2ª ed. New York: Informa Healthcare, 2008.
- [8] International Organization for Standardization. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. 2009.
- [9] Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz, AS. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*. 2003; 6(3): 317-320.
- [10] Daguano JK, Rogero SO, Crovace MC, Peitl O, Strecker K, Santos C. Bioactivity and cytotoxicity of glass and glass-ceramics based on the  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{SiO}_2 \cdot \text{MgO}$  system. *J of Materials Science: Materials in Medicine*. 2013; 24(9):2171-2180.
- [11] American Type Culture Collection. Catalogue of Cell Lines & Hybridomas. 8ª ed. Rockville; 1994.
- [12] American Society for Testing and Materials. F895-2011. Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity. Philadelphia: ASTM, 2011.
- [13] Cruz AS. Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vitro* de draize na avaliação de produtos cosméticos [tese]. São Paulo: Universidade

de São Paulo; 2003.

- [14]Hench LL. The story of Bioglass®. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2006; 17(11): 967-978.