



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia
(*PPBI*)

Mirian Noemi Pinto Vidal

“Avaliação crítica de métodos normalizados para teste de
citotoxicidade de próteses mamárias de silicone”

Tese de Doutorado submetida à
Universidade Federal Fluminense
visando à obtenção do grau de Doutor
em Ciências e Biotecnologia

Orientador:

Prof. Dr. Jose Mauro Granjeiro

Niterói

2017

Mirian Noemi Pinto Vidal

“Avaliação crítica de métodos normalizados para teste de citotoxicidade de próteses mamárias de silicone”

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Farmacologia/ Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ)

Tese de Doutorado submetida à
Universidade Federal Fluminense
visando à obtenção do grau de Doutor
em Ciências e Biotecnologia

Orientador:

Prof. Dr. Jose Mauro Granjeiro

Vidal, Mirian Noemi Pinto

Avaliação crítica de métodos normalizados para teste de citotoxicidade de próteses mamárias de silicone / Mirian Noemi Pinto Vidal. – Niterói: UFF, 2017.

129 f.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2017.

Orientador: José Mauro Granjeiro

1. Implantes de Mama. 2. Elastômeros de Silicone. 3. Géis de Silicone. 4. Citotoxicidade In Vitro. 5. Vigilância Sanitária. I. Título

Mirian Noemi Pinto Vidal

“Avaliação crítica de métodos normalizados para teste de citotoxicidade de próteses mamárias de silicone”

Tese de Doutorado submetida à
Universidade Federal Fluminense
visando à obtenção do grau de Doutor
em Ciências e Biotecnologia

Banca Examinadora:

Professor Dr. Jose Mauro Granjeiro-INMETRO-UFF (Orientador/Presidente)

Professora Dr^a Helena Pereira da Silva Zamith- INCQS- FIOCRUZ

Professora Dr^a Shirley de Mello Pereira Abrantes- INCQS-FIOCRUZ

Professor Dr. Gutemberg Gomes Alves - UFF – PPBI

Professora Dr^a Janete Teixeira Duarte - INCQS - FIOCRUZ (suplente)

Professor Dr. Paulo Emilio Correa Leite – UFRJ (suplente)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais (*in memoriam*), Elias e Maria Loanda, que Deus me deu e que sempre lutaram por minha educação.

AGRADECIMENTOS

- A Deus pela vida e a certeza que Ele está sempre comigo em todos os momentos e situações da minha vida;
- A minha irmã Sandra Loeli e a amiga Marlene Nóbrega, pelo total apoio e segurança para vencer os obstáculos da minha vida;
- Aos amigos (a) do INCQS e da Fiocruz, em especial, a Helena Zamith, Shirley Abrantes e a Ângela Pinhão pela ajuda e incentivo para continuar e não desistir e também aos amigos (a) da UFF em geral;
- A Claudete do Santo Ribeiro (in memoriam), pela amizade e ajuda nas cuidadosas tarefas do trabalho;
- Ao Professor Dr. Alexandre Pinto Corrado, Departamento da Farmacologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, pelo incentivo e apoio;
- Ao meu orientador Professor Dr. Jose Mauro Granjeiro pela consideração por aceitar-me como aluna.

Lembre-se sempre daquilo que aprendeu. A sua
educação é a sua vida; guarde-a bem.

Prov. 4:13

RESUMO

Uma grande variedade de produtos de saúde vem sendo continuamente desenvolvida sendo necessária a avaliação da segurança para o consumidor final e o apoio ao desenvolvimento tecnológico de produtos para a saúde. Segundo a ISO 10993-5:2009, há vários métodos normatizados para a determinação da citotoxicidade de dispositivos médicos implantáveis, porém, diferente sensibilidade dentre os métodos vem sendo reportada. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente os ensaios de citotoxicidade *in vitro* recomendados pela ISO 10993-5:2009 em células L929 de fibroblastos de camundongo para a análise de material de prótese mamária de silicone visando identificar o método mais sensível e reprodutível. Foram utilizadas dezesseis (16) amostras de próteses mamárias de silicone de diferentes marcas e lotes e duas (2) amostras de silicone comercial (suporte de seio de silicone natural e protetor antiaderente de silicone industrial). O controle negativo utilizado foi um plástico atóxico – USP (Farmacopeia Americana) que é comprovadamente atóxico, e o controle positivo utilizado foi um garrote de látex tóxico. Foram analisados quatro métodos para determinação da citotoxicidade descritos na ISO 10993-5:2009: a) difusão em ágar; b) contato direto; c) eluição; d) captura de vermelho neutro. Os métodos testados foram considerados válidos, tendo o controle negativo mostrado ausência de reação citotóxica e o controle positivo mostrado forte reação citotóxica. Todas as amostras de prótese mamária (P1 a P16) mostraram ausência de reação citotóxica similar ao controle-negativo. Contudo, a toxicidade do controle positivo (látex), do suporte de seio de silicone natural e protetor antiaderente industrial não foram identificadas igualmente pelo método de difusão em ágar. Para o suporte de seio esse método identificou grau zero de toxicidade contra grau 4 dos outros métodos; para o látex e o protetor antiaderente industrial, a diferença para a toxicidade prevista foi de 3 no método de difusão contra 4 nos outros. Deste modo, destaca-se a menor capacidade preditiva do método de difusão em ágar nas condições testadas no presente estudo. Embora seja inegável a importância dos testes com culturas celulares podendo ser utilizados com sucesso, por serem reproduzíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis para a execução do estudo de biocompatibilidade *in vitro*, a escolha do método *in vitro* mais adequado ao teste de toxicidade de materiais como próteses mamárias tem um papel fundamental na segurança dos usuários sem deixar de lado a execução de uma ciência mais ética e confiável. Com base nos resultados obtidos em relação aos quatro testes de citotoxicidade *in vitro* utilizados foi possível concluir que as próteses mamárias testadas foram atóxicas, porém, para o polímero utilizado no suporte de seio, houve diferença significativa entre os resultados no método de difusão em ágar e de captura de vermelho neutro em relação aos métodos de contato direto e de eluição.

Palavras-chaves: Biotecnologia; Polímeros; Próteses mamárias de silicone; Ensaio de citotoxicidade *in vitro*; Células L929.

ABSTRACT

Wide variety of health products has been continuously developed, requiring the assessment of safety for the end consumer and supporting the technological development of health products. According to ISO 10993-5: 2009, there are several standardized methods for determining the cytotoxicity of implantable medical devices, however, different sensitivity among the methods has been reported. Thus, the objective of this work was to comparatively evaluate the *in vitro* cytotoxicity assays recommended by ISO 10993-5: 2009 in mouse fibroblast L929 cells for the analysis of silicone breast implant material in order to identify the most sensitive and reproducible method. Sixteen (16) samples of silicone breast implants of different brands and lots and two (2) samples of commercial silicone (natural silicone breast support and industrial silicone nonstick protector) were used. The negative control used was a non-toxic plastic (USP) that is demonstrated to be non-toxic, and the positive control used was a toxic latex stick. Four methods for determining the cytotoxicity described in ISO 10993-5: 2009 were analyzed: a) diffusion in agar; B) direct contact; C) elution; D) capture of neutral red. The methods tested were considered valid, the negative control showed absence of cytotoxic reaction and the positive control showed strong cytotoxic reaction. All samples of mammary prosthesis (P1 to P16) showed absence of cytotoxic reaction similar to the control-negative one. However, the toxicity of the positive control (latex), natural silicone breast support and industrial nonstick protector were also not identified by the agar diffusion method. For breast support this method identified grade zero toxicity against grade 4 of the other methods; for the latex and the industrial nonstick protector, the difference for the predicted toxicity was 3 in the diffusion method against 4 in the others. Thus, the lower predictive capacity of the diffusion method in agar under the conditions tested in the present study stands out. While the importance of cell culture testing can be undoubtedly successful and reproducible, rapid, sensitive and financially accessible for the *in vitro* biocompatibility study, the choice of the most appropriate *in vitro* method for the test of material toxicity As breast prostheses plays a fundamental role in the safety of users without leaving aside the execution of a more ethical and reliable science. Based on the results obtained in relation to the four *in vitro* cytotoxicity tests used, it was possible to conclude that the mammary prostheses tested were nontoxic, however, for the polymer used in the breast support, there was a significant difference between the results in the agar diffusion method and of neutral red uptake in relation to direct contact and elution methods.

Keywords: Biotechnology; Polymers; Silicone breast prostheses; *In vitro* cytotoxicity assay; L929 cells.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. DISPOSITIVOS MÉDICOS E BIOMATERIAIS	2
1.2. MATERIAIS POLIMÉRICOS E PRÓTESES MAMÁRIAS.....	3
1.3. RISCOS E VIGILÂNCIA DE DISPOSITIVOS MÉDICOS.....	6
1.4. A IMPORTÂNCIA DE TESTES TOXICOLÓGICOS	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1. ABORDAGEM ENTRE A BIOTECNOLOGIA E OS BIOMATERIAIS	10
2.2. BIOCMPATIBILIDADE.....	11
2.3. SEGURANÇA E EFICÁCIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE.....	12
2.4. REGULAMENTAÇÃO E NORMALIZAÇÃO DOS PRODUTOS PARA SAÚDE	13
2.5. AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE BIOMATERIAIS E DOS DISPOSITIVOS MÉDICOS.....	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. GERAL.....	17
3.2. ESPECÍFICOS	17
4. METODOLOGIA	18
4.1. PREPARO DA AMOSTRA	18
4.2. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	18
4.2.1. Teste in vitro pelo método de difusão em ágar	18
4.2.2. Teste in vitro pelo método de Contato Direto.....	20
4.2.3. Teste in vitro pelo método de Eluição	20
4.2.4. Teste in vitro pelo método de captura de Vermelho Neutro	21
4.3. INTERPRETAÇÃO E VALIDADE DOS RESULTADOS.....	22
4.3.1. Difusão em ágar, contato direto e de eluição	22
4.3.2. Captura de vermelho neutro	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
9. APÊNDICES	47

9.1 - MANUAL TÉCNICO LABORATORIAL PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO – MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR BASEADO NO PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO (POP) DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (INCQS/FIOCRUZ) E NA FARMACOPEIA AMERICANA (USP).....	47
9.2. MANUAL TÉCNICO LABORATORIAL PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO – MÉTODO DE CONTATO DIRETO BASEADO NA FARMACOPEIA AMERICANA (USP)	66
9.3. MANUAL TÉCNICO LABORATORIAL PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO – MÉTODO DE ELUIÇÃO BASEADO NA FARMACOPEIA AMERICANA (USP)	86
9.4. MANUAL TÉCNICO LABORATORIAL PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO – MÉTODO DE CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO UTILIZANDO AS CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO L929	108

Lista de Siglas

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATCC	American Type Culture Collection
CONMETRO	Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
FDA	Agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos da América
ICT	International Electrotechnical Commission
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	International Organization for Standardization
MBT	Metiltiobenzotiazol
MBTS	2-metiltiobenzotiazol
MEM	Meio Essencial Mínimo de Eagle
MS	Ministério da Saúde
MTT	Brometo de (4,5-dimetiltiazol-2-IL)2,5difeniltetrazólio
NBR	Normas Brasileira
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
OMS	Organização Mundial da Saúde
PE	Polietileno
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetilmetacrilato
POP	Procedimento Operacional Padronizado

PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Poli (cloreto de vinila)
RAC	Requisitos de Avaliação da Conformidade
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA
SBAC	Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade
SINMETRO	Sistema Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
TBBS	N-terbutilbenzotiazol2sulfenamida
USP	United States Pharmacopeia
VISA	Vigilância Sanitária

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do Polidimetilsiloxano (C_2H_6OSi) _n , número CAS: 63148-62..	4
Figura 2. Células fibroblásticas de camundongo Clone L929. Aum. 400X.....	19
Figura 3. Medição da área descorada (Células mortas). (Fonte: VIDAL, M).....	22
Figura 4. Fotografias exibindo a ausência ou presença de halo, respectivamente, para o controle negativo e positivo pelo método de difusão em ágar. (Fonte: VIDAL, M).....	25
Figura 5. Fotografias exibindo a ausência ou presença de halo, respectivamente, para o controle negativo e positivo pelo método de contato direto. (Fonte: Vidal, M.).....	26
Figura 6. Microfotografias das células L-929 normais e danificadas expostas aos extratos dos respectivos controles negativo e positivo. (Fonte: VIDAL, M).....	26
Figura 7. Células Clone L929, viáveis coradas com vermelho neutro e células descoradas indicando potencial citotóxico. (Fonte: VIDAL, M).....	30
Figura 8. Microplacas de culturas com diferentes amostras de silicone pelo método de captura do vermelho neutro (Fonte: VIDAL, M)	30
Figura 9. Efeito de diferentes amostras de silicone na captação de vermelho neutro em células L929. As barras representam as médias individuais \pm desvio padrão das seis (6) réplicas do experimento. O controle negativo mostrou uma percentagem padrão, ou seja, 100% de negatividade de citotoxicidade. As linhas indicam corte de viabilidade celular que classifica um material como citotóxico, ou seja, menor que 70% de viabilidade, o material é citotóxico (ISO 10993-5:2009). O asterisco indica diferença significativa com relação a todos os outros grupos experimentais, (p,0,05), determinado através de Teste de Kruskal-Walis com pós-teste de Dunn (Fonte: VIDAL, M).....	31

LISTA DE ILUSTRAÇÕES (Quadros)

Quadro 1. Graus de Citotoxicidade para os Ensaio de Difusão em Ágar e o de Contato Direto.....	23
Quadro 2. Graus da Citotoxicidade para Ensaio de Eluição.....	23
Quadro 3. Resultados das três Metodologias dos Ensaio de Citotoxicidade <i>in vitro</i>	28

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia pode ser definida como a área do conhecimento que utiliza sistemas celulares para a obtenção de produtos e desenvolvimento de processos e está associada ao emprego das técnicas modernas da biologia molecular e celular (KUMAR, 2015). A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), por sua vez, define que a biotecnologia pode ser aplicada aos princípios científicos e de engenharia para o processamento de materiais por agentes biológicos proporcionando produtos ou serviços de qualidade.

No Brasil, a percepção da necessidade de estímulo a avanços no tema levou à criação de uma Política de Desenvolvimento da Biotecnologia (PDB) (BRASIL, 2007), tendo como objetivo principal:

“Promover e executar ações com vistas ao estabelecimento de ambiente adequado para o desenvolvimento de produtos e processos biotecnológicos inovadores, estimular o aumento da eficiência da estrutura produtiva nacional, a capacidade de inovação das empresas brasileiras, absorção de tecnologias, a geração de negócios e a expansão das exportações”.

Na área de saúde humana a biotecnologia é utilizada para estimular a geração e controle de tecnologias e a consequente produção nacional de produtos estratégicos que contribuam para posicionar competitivamente a bioindústria brasileira na comunidade biotecnológica internacional. O desenvolvimento de uma indústria biotecnológica voltada à saúde tem potencial para gerar novos negócios, expandir suas exportações, integrar-se à cadeia de valor e estimular novas demandas por produtos e processos inovadores, levando em consideração as políticas de saúde (FLORIANI, 2008). Dentre os diferentes produtos biotecnológicos que se enquadram nesse contexto, podemos destacar os biomateriais e dispositivos médicos.

1.1. Dispositivos médicos e biomateriais

Dispositivos médicos são produtos para saúde, destinados ao uso no corpo humano para prevenção, controle, diagnóstico ou tratamento de uma doença, através de meios que não sejam alcançados por mecanismos farmacológicos, metabólicos ou imunológicos, sendo esta a sua diferença em relação aos medicamentos, pois ambos contribuem para uma melhoria da saúde e da qualidade de vida dos seus usuários (TRINDADE et al, 2010). Dentre eles incluem-se os biomateriais, os quais podem ser definidos como “substância que foi projetada para assumir uma forma que é usada para dirigir, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico” (WILLIANS, 2009). São, para efeitos legais, produtos submetidos ao regime da responsabilidade do produtor, ou seja, cabe ao produtor demonstrar e garantir, para fins de registro, sua segurança e eficácia. Porém, assumem uma particularidade pela sua função e pelo específico contexto em que são utilizados: são produtos (material ou artigo similar) destinados a finalidades médicas (de diagnóstico, prevenção, controle, tratamento ou atenuação de uma doença ou sofrimento) não realizáveis mediante meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos (INFARMED, 2013 a).

A Organização Mundial de Saúde define dispositivo médico como: “qualquer instrumento, aparato, utensílio, material ou outro artigo, intencionado pelo fabricante para ser usado em humanos, com a proposta de diagnóstico, prevenção, monitoramento, tratamento ou alívio de doença ou agravo, investigação, substituição ou modificação da anatomia ou processo fisiológico ou controle de concepção e nos quais não se realiza sua ação principal dentro ou sobre o corpo humano por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos” (ALVES, 2013).

No Brasil, acumulam-se evidências de que a população é exposta a numerosos riscos e danos evitáveis, demonstrando práticas negligentes e até criminosas de agentes econômicos e também de deficiências no controle sanitário a ser exercido pelo Estado. Esta situação aponta para a necessidade de qualificação da capacidade operativa do sistema de saúde, em particular, do sistema de vigilância sanitária; e sugere a atuação dos serviços de saúde no uso das tecnologias médicas (SILVA, 2013).

As aplicações de biomateriais se estendem a diversas áreas, que incluem a cardiovascular (válvulas cardíacas e vasos), odontologia (membranas e biocerâmicas), oftalmologia (membranas protetoras e cicatrizantes), ortopedia e traumatologia (membranas, biocerâmicas e próteses), entre outras (RODAS et al, 2011). O uso cada vez mais constante de materiais artificiais para restaurar partes do corpo humano tem exigido o desenvolvimento de tecnologia diferenciada na fabricação de produtos que atendam às solicitações de materiais implantáveis (BRASIL, RDC 3385, 2006). Dentre os diferentes tipos de biomateriais implantáveis encontram-se os metais, as cerâmicas, os vidros e os polímeros.

1.2. Materiais poliméricos e próteses mamárias

Os materiais poliméricos vêm despertando crescente interesse ao longo dos séculos XX e XXI, por terem sido usados em um vasto número de aplicações médicas e farmacêuticas, como em implantes ortopédicos, dentários ou mamários, órgãos artificiais, marca-passos, suturas, enxertos vasculares, válvulas cardíacas, lentes intraoculares e de contato, dialisadores renais e outros dispositivos, sistemas de liberação controlada de fármacos e sistema de reconstrução de tecidos (HANDEL e colaboradores, 2006).

Os polímeros podem ser naturais ou sintéticos. Os naturais que são extraídos da natureza incluem a borracha natural (látex), polissacarídeos, celulose, seda e proteínas. Os sintéticos produzidos pela ação do homem, através de processos de transformação, como reações químicas, incluem: o polietileno (PE), o polipropileno (PP), o polimetilmetacrilato (PMMA), o poliestireno (PS), poli (cloreto de vinila) (PVC), poliéster, politetrafluoretileno (PTFE) ou teflon, policarbonatos, poliamidas ou nylons, silicones e poliuretanos (PARK e colaboradores, 2007).

Os polímeros de silicone foram descobertos no final do século XIX, e podem ser substâncias orgânico-inorgânicas com estrutura química constituída de unidades alternadas de silício e oxigênio. Os fluidos de silicone são formados por cadeias lineares de polidimetilsiloxano, ou PDMS (Figura 1), que possuem terminação com grupos trimetilsilil. Fluidos de PDMS apresentam distintas viscosidades, sendo essencialmente

insolúveis em água e podem ser modificados com adição de grupos organofuncionais em qualquer ponto da cadeia polimérica. Hoje, esses fluidos encontram-se dentre os mais utilizados em produtos de uso biomédico, incluindo implantes mamários (PARK e colaboradores, 2007).

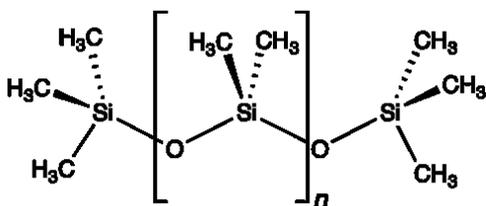


Figura 1. Estrutura química do Polidimetilsiloxano (C_2H_6OSi)_n, número CAS: 63148-62.

O uso de implantes mamários continua sendo um dos procedimentos em cirurgia plástica mais frequentemente realizado. O desejo por alcançar uma autoimagem anatomicamente perfeita e seios perfeitamente formados levou à alta incidência de cirurgias de aumento dos mesmos (FDA, 2011). O aumento mamário por causas estéticas é a causa mais frequente para a colocação de implantes mamários. Este procedimento deriva habitualmente das seguintes razões: ausência congênita ou deformidade de uma ou de ambas as mamas, desejos de aumentar o volume mamário após perda de conformação, na correção de assimetria mamária ou de insatisfação com o volume ou forma mamária. Este tipo de intervenção procura melhorar na maioria das situações o bem-estar e a sensação de autoestima do paciente, melhorando assim a sua qualidade de vida. Também é importante destacar o grande número de procedimentos reparadores decorrentes do tratamento de tumores mamários (STEIERT e colaboradores, 2013).

O gel comumente usado em implantes mamários contém PDMS de matriz levemente reticulada contendo um fluido de silicone viscoso (óleo) que não está quimicamente ligado dentro da fase gel. Os géis são formados através do enchimento do invólucro exterior do implante com uma combinação de óleos de silicone quimicamente reativos e não reativos, selando a casca com um adesivo de secagem (aquecimento durante um tempo especificado) em todo o implante (TGA, 2012). Para que o silicone forme as ligações cruzadas e uma estrutura tridimensional, ocorre o acoplamento de cadeias através de ligações químicas primárias nos locais de mais amplo

distanciamento, sendo este processo chamado de vulcanização, na presença de catalizadores e de aquecimento.

A vulcanização ocorre a partir da sua combinação química com os chamados agentes vulcanizantes, fazendo com que o polímero adquira a propriedade de poder sofrer deformações, podendo retomar as suas dimensões iniciais. É através da vulcanização que conseguimos transformar as propriedades plásticas do polímero, eliminar a sua sensibilidade ao calor, e obter um corpo elástico capaz de retomar as suas dimensões iniciais depois de uma deformação, mesmo em condições extremas de temperatura. A vulcanização é o resultado de uma reação química que pode ser processada a frio e a quente.

Os aceleradores de vulcanização são as substâncias químicas também chamadas de agentes de vulcanização, adicionadas à borracha que servem para acelerar tanto a velocidade como a elasticidade, durante a vulcanização. O metilbenzotiazol (MBT), e seus derivados como o 2-metiltiobenzotiazol (MBTS), e o N-terc-butilbenzotiazol-2-sulfenamida (TBBS), são em termos toxicológicos as classes mais importantes de aceleradores usados industrialmente na manufatura de produtos de borracha por causar alergias, reações cutâneas, e também provocar náusea, dor de cabeça e vômitos. É perigoso se ingerido, inalado ou absorvido através da pele.

Devido à produção e a comercialização de uma grande variedade de produtos dirigidos aos consumidores, com a finalidade de promoção de consumo, o mundo atual parece cada vez mais exposto aos riscos e perigos principalmente em relação à produção, circulação e consumo destes produtos, que muitas vezes podem trazer ameaças à saúde da população. Recentemente, a denúncia de falha na produção de próteses de silicone francesas afetou milhares de pacientes no Brasil, e reabriu a discussão na questão sobre a segurança da cirurgia cosmética mais popular entre as mulheres (BRASIL, RDC 185, 2006).

1.3. Riscos e vigilância de dispositivos médicos

Os riscos e danos relacionados com o consumo de produtos, tecnologias e serviços de interesse sanitário podem ser decorrentes de defeitos ou falhas de fabricação, falhas de diagnóstico, inadequação da prescrição e de ilicitudes intencionais de fabricantes, comerciantes ou prestadores de serviços. Determinados produtos e serviços já contêm, por si mesmos, certo grau de risco ou certa periculosidade, que impõem a observância rigorosa de cuidados na produção, distribuição e uso e na disposição de seus resíduos no ambiente. Com a produção em grande escala e a intensa circulação das mercadorias numa economia globalizada, os riscos à saúde decorrentes de produto defeituoso colocado no mercado podem afetar a saúde da população em dimensões que extrapolam as fronteiras de um país (COSTA, 2013).

No Brasil, acumulam-se evidências de que a população é exposta a numerosos riscos e danos evitáveis, demonstrando práticas negligentes e até criminosas de agentes econômicos e também deficiências no controle sanitário a ser exercido pelo Estado. Esta situação aponta para a necessidade de qualificação da capacidade operativa do sistema de saúde, em particular, do sistema de vigilância sanitária; e a importância da atuação dos serviços de saúde no uso das tecnologias médicas (SILVA, 2013). Uma das grandes inovações na legislação brasileira sobre Dispositivos Médicos foi a criação de um Sistema Nacional de Vigilância de Dispositivos Médicos (SNVDM), que implica para os fabricantes em obrigações no sentido de reportar efeitos adversos.

O SNVDM visa monitorizar o dispositivo logo após a sua entrada no mercado, com o objetivo de assim evitar danos aos pacientes, especialmente os danos recorrentes. Não obstante, os vários testes e ensaios a que são sujeitos os dispositivos médicos na fase pré-comercialização, torna-se impossível controlar como se irá comportar o dispositivo na sua efetiva utilização no dia-a-dia, nem prever todos os possíveis danos derivados de falhas técnicas, de disfunções ou imprecisões dos dispositivos, ou mesmo de erros e lacunas na respectiva rotulagem e instruções de utilização (TIRONI, 2014).

O SNVDM opera mediante o incentivo à notificação de incidentes, e a consequente efetivação de medidas preventivas e corretivas, sem intuito

responsabilizador, mas somente delimitador de futuros prejuízos. Entre estas medidas incluem-se em recolha do produto, a sua troca ou destruição, a reformulação da rotulagem. As notificações impostas dizem respeito a mortes, risco de vida, incapacidade de uma função orgânica, lesão duradoura, incapacidade permanente ou significativa, perigo de lesão apenas evitável mediante intervenção médica, sofrimento ou morte fetal, anomalia congênita ou má-formação em recém-nascido, e dano indireto na sequência de um diagnóstico errado. Assim, a pesquisa na área de biomateriais, mais especificamente em próteses mamárias de silicone, visa promover a qualidade de vida do indivíduo, principalmente das mulheres buscando o desenvolvimento de produtos de saúde cada vez mais adequados às finalidades a que se destinam.

1.4. A importância de testes toxicológicos

O registro dos produtos para saúde é realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com base em dossiês demonstrando a segurança e a eficácia do produto que se pretende registrar. Nesta avaliação é essencial que se tenha o conhecimento sobre a sua composição, as condições de fabricação e armazenamento, entre outras informações que qualifiquem o produto. O risco em consumir produtos sem registro ou sem notificação corresponde à exposição do organismo a níveis tóxicos de seus componentes ou contaminantes com repercussões no organismo e comprometendo, assim, a segurança biológica quanto à ocorrência de efeitos que possam causar agravos à saúde (ANVISA, 2012). Os produtos para saúde devem apresentar segurança e eficácia para o objetivo que se propõem e sujeitos à vigilância sanitária precisam ser registrados ou notificados pela ANVISA.

No contexto dos produtos de saúde, normas técnicas como as da série 10993 da (ISO) oferecem referências para a classificação, especificação, método de ensaio, procedimento, padronização, simbologia e terminologia dos produtos. A normalização proporciona uma série de vantagens aos fabricantes, comerciantes e consumidores, que vão desde a eliminação de barreiras comerciais à segurança do usuário (NOTA TÉCNICA, 2006). Essas normas podem abranger desde o atendimento ao consumidor até a realização de testes de citotoxicidade.

Os métodos referentes aos testes de citotoxicidade propostos pela ISO 10.993-5:2009 buscam avaliar a compatibilidade biológica dos dispositivos médicos implantáveis em relação às células em cultura. Estes métodos são realizados para determinar a resposta biológica de células de mamíferos *in vitro* usando parâmetros biológicos apropriados (ISO, 2009).

Devido ao fato de que uma grande variedade de produtos de saúde vem sendo continuamente desenvolvida, junto a uma importante incidência de não conformidade principalmente nas análises envolvendo próteses mamárias, torna-se necessária uma avaliação de sua segurança biológica empregando ensaios *in vitro* ao invés de testes *in vivo* com animais de laboratório (ISO, 2009).

Os métodos *in vitro* apresentam algumas vantagens em relação aos *in vivo* por levarem à substituição ou redução no número ao uso de animais de experimentação, pela obtenção de dados significativos mais facilmente. Em alguns casos, há maior preditividade do teste, além do período de teste ser usualmente mais curto, com consequente redução de custos. Em resumo e de modo geral, estudos empregando métodos alternativos *in vitro* em culturas de células, em substituição aos métodos *in vivo*, podem ser utilizados com sucesso, pois são reprodutíveis, rápidos, sensíveis e financeiramente acessíveis.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* pelo método de difusão em ágar se enquadra perfeitamente na regra dos 3Rs que preconiza o Refinamento (*Refinement*), a Redução (*Reduction*) e a eventual Substituição (*Replacement*) de testes *in vivo* por ensaios *in vitro* sendo de rápida execução, alta reprodutibilidade, baixo custo, e por apresentar alta sensibilidade, reproduzindo o máximo possível as condições fisiológicas *in vivo* (VIDAL et al, 2010).

Deste modo, o estudo de possíveis efeitos tóxicos induzidos por esses produtos de saúde deve merecer a atenção da ANVISA e do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), no sentido de minimizar ou mesmo proibir seu uso ao máximo, caso venham a apresentar comprovadamente efeitos citotóxicos.

O INMETRO, por demanda da ANVISA e do Ministério da Saúde, elaborou os Requisitos de Avaliação da Conformidade para as Próteses Mamárias (RAC-Portaria Inmetro nº162 de 05/04/2012), o qual estabelece que os ensaios de toxicidade devam

seguir a ISO 14607, a qual, por sua vez, indica que os ensaios de citotoxicidade devem seguir a ISO 10993-5:2009 (ISO, 2009). Entretanto, por essa norma, os ensaios de citotoxicidade podem ser realizados empregando-se metodologias, que não são necessariamente equivalentes. Tendo em vista a segurança do consumidor final e o apoio ao desenvolvimento tecnológico de produtos para a saúde, a identificação do método mais adequado para a avaliação da citotoxicidade de próteses implantáveis poliméricas é relevante para o país e indústria nacional (INMETRO, 2012).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Abordagem entre a Biotecnologia e os Biomateriais

O Decreto Federal nº 6041 de 08 de fevereiro de 2007 ao institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia (PDB), considera a área de Biomateriais uma das prioridades do governo federal (Brasil, 2007). Na área de biomateriais, são objetivos específicos:

- estimular a produção nacional de equipamentos médicos implantáveis;
- estimular a criação de mecanismos de investimentos específicos para o incentivo à inovação e à transferência de tecnologia, principalmente com relação à terapia celular, engenharia tecidual, polímeros carreadores de proteínas e fármacos e a nanotecnologia;
- estimular a amplificação de Parques Tecnológicos para colocar à disposição da rede privada e pública de saúde produtos e serviços relacionados à cirurgia reparadora (próteses mamárias) e a manipulação de células para transplantes de medula óssea, terapia de células tronco em cardiologia e outras doenças crônicas;
- agilizar os procedimentos de concessão de patentes nesta área e introduzir mecanismos de gestão da inovação e propriedade intelectual na relação – empresas;
- estimular a criação de base normativa para certificação (nacional e internacional) de biomateriais;
- ampliar a formação de recursos humanos (nível técnico e nível superior) para suprir as demandas da área de biomateriais;
- definir programas de médio e longo prazo para dar continuidade ao financiamento de P.D&I e criar mecanismos de avaliação e monitoramento dos resultados para aperfeiçoamento contínuo dos programas.

Os biomateriais podem ser definidos como “substâncias que foram projetadas para assumir uma forma que é direcionada ao controle de interações com componentes de

sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico” (WILLIAMS, 2009). Trata-se de um campo de aplicação dos materiais poliméricos que possuem uma interface com os sistemas biológicos e que são empregados com a finalidade de avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (PLESIS, 2012).

O principal objetivo do uso de biomateriais é a restauração de funções dos tecidos e órgãos do corpo humano. Quando se trabalha com biomateriais, é importante o entendimento da correlação entre propriedades, funções e estruturas dos materiais biológicos.

Uma definição complementar essencial para a ciência dos biomateriais é a biocompatibilidade, que pode ser definida como a capacidade de o material apresentar uma resposta apropriada numa aplicação específica, com o mínimo de incidência de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos (DA SILVA et al, 2012).

2.2. Biocompatibilidade

A biocompatibilidade compreende as interações dos tecidos humanos e fluidos, incluindo sangue, com um implante ou material. As interações podem ser do meio fisiológico sobre o material ou da ação do material no corpo, sendo difícil separar estas duas interações. Um biomaterial deve ser biocompatível numa aplicação específica, assim, as especificações da biocompatibilidade devem incluir as condições de utilização e de avaliação (WILLIAMS, 2014). Considerando esses aspectos, o biomaterial ideal para implante é aquele que não causará riscos aos tecidos; não deverá conter substâncias tóxicas causadoras de reações sistêmicas indesejáveis e agentes sensibilizantes que induzam reações alérgicas (MASSON, 2014).

O uso cada vez mais constante de materiais artificiais para restaurar partes do corpo humano tem exigido o desenvolvimento de tecnologias diferenciadas na fabricação de produtos que atendam às solicitações de materiais implantáveis. Atualmente, se busca desenvolver materiais específicos para aplicações nas diversas

áreas da medicina. A necessidade de desenvolvimento de novos materiais e adaptação de materiais já existentes para o uso médico levou ao desenvolvimento de uma nova área de pesquisa em tecnologia e ciência dos materiais e dos biomateriais (PLESIS, 2012; REDDY, 2012). Nesta área da ciência, o biomaterial a ser implantado pode ser analisado sob vários aspectos, tanto físico-quimicamente quanto fisiologicamente e quanto às suas interações com o organismo como um todo e suas particularidades, como os tecidos, órgãos ou sistemas.

2.3. Segurança e Eficácia de Produtos para Saúde

Os produtos para saúde devem ser projetados e fabricados de forma que seu uso não comprometa o estado clínico e a segurança dos pacientes, nem a segurança e saúde dos operadores ou, quando for o caso, de outras pessoas, quando usados nas condições e finalidades previstas. Os possíveis riscos existentes devem ser aceitáveis em relação ao benefício proporcionado ao paciente e devem ser reduzidos a um grau compatível com a proteção à saúde e a segurança das pessoas (BRASIL, RDC 3385, 2006).

Os produtos para saúde devem ser projetados e fabricados de forma que sejam garantidas as suas características e desempenho, por conseguinte, especial atenção deve ser dada quanto:

a) a seleção dos materiais utilizados, particularmente quanto à toxicidade e, quando for o caso, a inflamabilidade;

b) quanto à compatibilidade entre os materiais utilizados e entre os materiais e os tecidos biológicos, células e fluidos corporais, considerando a finalidade prevista do produto médico.

Os produtos para saúde devem ser projetados, fabricados e embalados de forma que seja minimizado o risco apresentado por contaminantes e resíduos para as pessoas que participem do transporte, armazenamento e uso, assim como para os pacientes, considerando a finalidade prevista do produto. Especial atenção deve ser considerada dada aos tecidos expostos e a duração e frequência da exposição (COSTA, 2013).

2.4. Regulamentação e Normalização dos Produtos para Saúde

Os princípios norteadores que tangem a regulamentação de artigos médicos e biomateriais, para qualquer país, incluem a adoção de um sistema de qualidade para a fabricação, e a aplicação de padrões técnicos de segurança e eficácia baseados em uma abordagem harmonizada mediante o emprego de normas e práticas técnicas aceitas internacionalmente (WILLIAMS, 2008).

Normas são documentos que representam uma padronização de testes, métodos, materiais, artigos ou procedimentos amplamente validados científica e tecnologicamente. A maior parte das organizações normativas revisam seus documentos a cada cinco anos para verificar sua atualização (ISO, 2009).

Normas internacionais tais como da *American Society for Testing and Materials* (ASTM), ISO, OECD da *Organization for Economic Co-operation and Development* ou da *Associação Brasileira de Normas Técnicas*, descrevem testes e ensaios, parâmetros, metodologias, condições e como os dados obtidos com a amostra teste devem ser analisados. A validação Interlaboratorial dos testes implica na repetição do método por diversos laboratórios que concordam com seu grau de precisão. Uma vez padronizado, tal método pode ser utilizado em qualquer outro laboratório, pois o detalhamento é suficiente para garantir que diferentes instalações consigam resultados similares para as mesmas amostras.

As informações técnicas disponíveis em tais documentos são resultado da publicação científica acadêmica e do desenvolvimento tecnológico, e devem ser fruto do consenso entre todas as partes interessadas na atividade objeto, as quais devem ser aprovadas por um organismo de normalização reconhecido. As Normas são documentos de orientação e de uso voluntário, e qualquer pessoa pode fazer uso delas. No entanto, indústrias, laboratórios, pesquisadores e alunos, além dos órgãos regulatórios governamentais podem ter de seguir os requisitos e ou as legislações obrigatórias que envolvam a utilização destas normas como diretivas de processos de pesquisa, desenvolvimento, certificações e creditações.

Existem diversas organizações nacionais e internacionais de normalização. Independentemente de sua abrangência, são constituídas por representantes envolvidos

com o setor formando os Comitês Técnicos, que estudam e organizam as necessidades de cada setor, elaboram e aprovam os projetos de normas que depois são publicadas. A aprovação final prevê a circulação provisória do projeto de norma entre todos os possíveis interessados, possibilitando observações. Depois de ler e analisar os comentários, o comitê redige o texto final, que será aprovado, registrado e publicado como norma. No âmbito internacional os principais organismos de normalização são a ISO e o ICE. A adoção das normas internacionais não é obrigatória para os países membros destas organizações, diferente do que ocorre com os documentos regionais produzidos pelas diferentes nações (ISO, 2006).

Desde o surgimento dos biomateriais no mercado, é evidente a necessidade de regulamentações para garantir a segurança e eficácia dos mesmos. Os dados de segurança são obtidos a partir de ensaios que avaliam os artigos médicos e biomateriais de acordo com parâmetros biológicos, físico-químicos e mecânicos. Esses ensaios seguem diretrizes das agências reguladoras, tais como o *FDA*, nos Estados Unidos, e a ANVISA, no Brasil. Essas diretrizes são orientadas pelas guias e normas específicas de órgãos e agências normalizadoras como a *ISO*, a *ASTM*, *Farmacopeia Americana (USP)*, e demais Farmacopeias pertinentes.

2.5. Avaliação Biológica de Biomateriais e dos Dispositivos Médicos

A maior parte das atividades normativas no âmbito dos biomateriais é hoje associada a ISO 10.993 referente à avaliação biológica de dispositivos médicos e às considerações do Comitê Técnico 194 como são denominados o conjunto de organizações que participam da elaboração e atualização desta ISO (ISO, 2009).

A norma “ISO 10.993-1: *General Principles*” é o ponto de partida mais recomendado para a avaliação da biocompatibilidade, pois apresenta os princípios fundamentais que governam a avaliação biológica de biomateriais e dispositivos biomédicos. Em 1992, a ISO publicou a norma que é uma harmonização das diretrizes

anteriormente publicadas: pela *Tripartite Agreement* (Canadá, Inglaterra e USA), pela ASTM, *British Standards Institute* e outros.

A ISO 10.993 “Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos” é uma série de normas que é continuamente atualizada, revisada e ampliada, e contém atualmente 20 partes atualizadas até 2010. Ela engloba as diretrizes desde a caracterização de cada material ou dispositivo médico, até a seleção adequada de ensaios necessários e dos requisitos técnicos específicos para cada ensaio de biocompatibilidade, como apresentados abaixo. A parte 1 refere-se à orientação na seleção dos testes, a parte 2 aborda as exigências relativas ao bem-estar animal, e nas partes 3 a 20 estão os guias de procedimentos de ensaios específicos (ISO, 2009).

Partes da Norma ISO 10.993 (Avaliação Biológica de Dispositivos Médicos) referentes aos Ensaios de Biocompatibilidade.

- Parte 1: Avaliação e testes dentro de um processo de gestão de risco
- Parte 2: Requisitos de bem-estar animal
- Parte 3: Os testes de genotoxicidade, carcinogenicidade e de toxicidade reprodutiva
- Parte 4: Seleção de ensaios para interações com sangue
- Parte 5: Ensaios de citotoxicidade *in vitro*
- Parte 6: Ensaios de efeitos locais após implantação
- Parte 7: Resíduos da esterilização por óxido de etileno
- Parte 9: Sistema para identificação e quantificação dos potenciais produtos de degradação
- Parte 10: Ensaios de irritação e sensibilização da pele
- Parte 11: Testes de toxicidade sistêmica
- Parte 12: Preparação de amostras e materiais de referência
- Parte 13: Identificação e quantificação de produtos de degradação dos dispositivos médicos poliméricos
- Parte 14: Identificação e quantificação de produtos de degradação de cerâmicas
- Parte 15: Identificação e quantificação de produtos de degradação de metais e ligas
- Parte 16: desenho do estudo toxicocinéticos para produtos de degradação lixiviáveis
- Parte 17: Estabelecimento de limites toleráveis das substâncias lixiviáveis
- Parte 18: Caracterização química de materiais
- Parte 19: físico-química, caracterização morfológica e topográfica de materiais
- Parte 20: Princípios e métodos para testes imunotoxicologia de dispositivos médicos

Segundo a norma, os ensaios devem ser realizados nos materiais ou produtos finais em condições de uso, e qualquer modificação na matéria prima, processamento, esterilização ou indicação clínica há necessidade de se reavaliar o biomaterial. No caso dos produtos finais, os resultados referentes aos ensaios dos componentes individuais também são importantes e devem ser realizados, já que na ocorrência de algum efeito adverso a rastreabilidade será possibilitada, e o componente problema identificado.

A avaliação é realizada por meio de ensaios específicos que são agrupados em modelos animais e em técnicas *in vitro*, que são complementares, de maneira a oferecer um resultado seguro.

De acordo com a Norma 10.993 o ensaio de citotoxicidade '*in vitro*' é o primeiro teste a ser realizado para avaliação biológica de dispositivos ou artigos médicos.

E também, com o controle cada vez mais rigoroso em relação ao uso de animais de laboratório, houve a necessidade de desenvolver e padronizar testes *in vitro* que pudessem detectar a toxicidade de produtos para uso em seres humanos, como os biomateriais que não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Avaliar comparativamente os ensaios de citotoxicidade '*in vitro*' recomendados pela ISO 10993-5:2009 para a análise de material de prótese mamária de silicone visando identificar o método mais sensível e reprodutível.

3.2. ESPECÍFICOS

- Realizar ensaio de citotoxicidade '*in vitro*' pelo método indireto de difusão em ágar de material de prótese mamária de silicone;
- Realizar ensaio de citotoxicidade '*in vitro*' pelo método direto de material de prótese mamária de silicone;
- Realizar ensaio de citotoxicidade '*in vitro*' pelo método de eluição de material de prótese mamária de silicone;
- Realizar ensaio de citotoxicidade '*in vitro*' pelo método de captação de vermelho neutro de material de prótese mamária de silicone;
- Elaborar Manuais Técnicos Laboratoriais para os ensaios de citotoxicidade;
- Avaliar comparativamente os ensaios de citotoxicidade da ISO 10993-5:2009 quanto sua sensibilidade na avaliação de próteses mamárias;
- Correlacionar o resultado dos diferentes ensaios biológicos com o efeito citotóxico.

4. METODOLOGIA

4.1. Preparo da Amostra

Foram utilizadas dezesseis (16) amostras de próteses mamárias de silicone de diferentes marcas e lotes e duas (2) amostras de silicone comercial (suporte de seio de silicone natural e protetor antiaderente de silicone industrial). Todas as amostras foram codificadas para a realização dos testes.

O controle negativo utilizado foi um plástico atóxico, lote G-8 CAT.Nº 54500 – USP (Farmacopeia Americana) que é comprovadamente atóxico, e o controle positivo utilizado foi um garrote de látex tóxico (Lemgruber T200). As próteses de silicone mamárias foram cortadas em pedaços pequenos não maiores que áreas de aproximadamente de 100mm^2 (10 mm x 10 mm) em placa de culturas com 3,5 cm de diâmetro. Todos os procedimentos para preparo dos controles positivo e negativo, bem como das amostras seguiram as recomendações da ISO 10993-5:2009 (ISO,2009).

4.2. Ensaio de Citotoxicidade

Foram analisados quatro métodos para determinação da citotoxicidade descritos na ISO 10993-5:2009: a) difusão em ágar; b) contato direto; c) eluição; d) captura de vermelho neutro, os quais são descritos a seguir.

4.2.1. Teste *in vitro* pelo método de difusão em ágar

De acordo com a ISO 10993-5, o ensaio de citotoxicidade por difusão em ágar propõe-se a determinar a reatividade biológica de culturas celulares de mamífero a partir do contato com plásticos, borrachas ou elastômeros e outros materiais de uso médico hospitalar.

O ensaio foi realizado de acordo com as diretrizes estabelecidas no POP INCQS nº 65.3330.010 referente ao ensaio de citotoxicidade *in vitro*- método de difusão em ágar, realizado em laboratório do INCQS. O ensaio encontra-se acreditado pelo INMETRO segundo os requisitos estabelecidos na ABNT NBR ISO/IEC 17025. Foram utilizadas as células fibroblásticas de camundongo – Clone L929 – ATCC (*American*

Type Culture Collection, Rockville, MD, USA), cultivadas em meio de cultura MEM (meio essencial mínimo com sais de Earle, Sigma, USA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco, Alemanha), 2 mM de glutamina, 10^2 UI/ml de penicilina e 10^2 µg/ml de sulfato de estreptomicina mantidas por 48 horas a 37°C com 5% de CO₂. Quarenta e oito horas anteriores à aplicação da amostra as culturas foram estabelecidas preparando-se uma suspensão contendo 1×10^5 células por ml de MEM completo por placa de cultura. No ensaio foram utilizadas as culturas que apresentaram uma camada celular uniforme e com confluência superior a 80%.

Uma camada de ágar (0,9% ágar Bacto-ágar, Difco, Brasil) contendo corante vermelho neutro 0.005% (Merck, Alemanha) foi adicionada sobre a cultura celular. A camada de ágar protege as células do dano mecânico durante a colocação do produto, e também, permite a difusão de agentes químicos que migram dos produtos.

Vinte e quatro horas após a aplicação das amostras, o grau de citotoxicidade foi avaliado para o ensaio de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar. A morfologia e a coloração das células sob e ao redor da amostra-teste e dos controles foram observadas microscopicamente e macroscopicamente.

Todos os detalhes para a realização do ensaio, os reagentes, preparo das soluções, realização e análise estão descritos no apêndice 9.1.



Figura 2. Células fibroblásticas de camundongo Clone L929. Aum. 400X. (Fonte: Vidal, M).

4.2.2. Teste in vitro pelo método de Contato Direto

De acordo com a ISO 10993-5:2009, o ensaio é designado para materiais plásticos e também para produtos químicos, mas não é apropriado para materiais de alta densidade molecular, pois podem causar danos mecânicos na colocação sobre as células. A metodologia é similar ao do ensaio de difusão em ágar e a sua diferença é que as amostras também podem ser substâncias químicas que são colocadas em papel de filtro direto sobre as culturas celulares. O ágar nesta metodologia não é utilizado. No ensaio pelo método de contato direto, a amostra foi colocada sobre as culturas celulares e para a medida de viabilidade celular foi adicionado 0,8 ml de meio de cultura MEM 1XC e solução aquosa de vermelho neutro a 0,01% a cada orifício da placa.

Vinte e quatro horas após a aplicação das amostras, as células ao redor da amostra, do controle negativo e do controle positivo cultura foram examinadas microscopicamente e macroscopicamente.

Todos os detalhes para a realização do ensaio, os reagentes, preparo das soluções, procedimento com as células L929 e análise estão descritos no apêndice 9.2.

4.2.3. Teste in vitro pelo método de Eluição

De acordo com a ISO 10993-5:2009, esse ensaio é apropriado para a avaliação de extratos de materiais poliméricos. O procedimento possibilita a extração de amostras em intervalos de tempo variados e em temperaturas fisiológicas e não fisiológicas. É apropriado para materiais de alta densidade e possibilita o estabelecimento de curvas dose-resposta (USP 40, 2017).

Nesta metodologia, a amostra foi preparada como indicado em Preparação de extratos, utilizando meio de cultura livre de soro (USP 40, 2017) seguindo as proporções descritas na ISO 10993-12:2012.

Vinte e quatro horas após a aplicação das amostras, o grau de citotoxicidade foi avaliado para o ensaio de eluição. Cada cultura foi examinada microscopicamente observando-se a morfologia das células na monocamada.

Todos os detalhes para a realização do ensaio, os reagentes, preparo das soluções, procedimento com as células L929 e análise estão descritos no apêndice 9.3.

4.2.4. Teste in vitro pelo método de captura de Vermelho Neutro

Suspensões da linhagem celular NCTC clone L929, na densidade de $2,5 \times 10^5$ células/ml em meio MEM completo foram semeadas em volumes de 0,2ml em microplacas de cultura de 96 poços de fundo chato. Estas foram então incubadas por 24 horas, a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para a formação da monocamada celular. Depois deste período, o meio de cultura foi desprezado e adicionado a cada poço 0,2ml de meio contendo diluições seriais das amostras a serem testadas e dos respectivos controles, cujos extratos foram obtidos como descrito em 4.2.3. Todas as amostras e os controles foram testados em seis réplicas. As placas foram novamente incubadas em estufa com 5%CO₂ a 37°C por 24 horas.

Após o período de incubação o meio contendo as amostras foi desprezado e 0,2ml de meio MEM sem soro, contendo 50µg de vermelho neutro/ml foi adicionado a cada poço. Seguiu-se a incubação das microplacas por três horas a 37°C para permitir a captação do vermelho neutro pelas células vivas. Este meio foi preparado 24 horas anteriores ao uso e mantido em estufa a 37°C durante a noite, sendo imediatamente antes do uso centrifugado a 1500 r.p.m. durante 15 minutos para eliminar os cristais formados. Decorrido o tempo de captura, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com 0,2ml de PBS aquecido a 37°C e uma vez com 0,2ml de solução aquosa a 40% de formaldeído e 1% de CaCl₂, para remover o corante não incorporado. Esta solução foi descartada e 0,2ml de solução aquosa de 1% de ácido acético e 50% de etanol foram adicionadas para extrair o corante. Após 10 minutos de agitação, as placas foram levadas para leitura da densidade óptica num leitor de microplacas com filtro de 540nm (ROGERO et al, 2003).

4.3. Interpretação e Validade dos Resultados

A validade dos ensaios foi testada a partir das respostas das células ao tratamento pelo controle negativo e pelo controle positivo, onde o controle negativo deverá mostrar ausência de reação citotóxica, e o controle positivo deverá mostrar reação citotóxica.

4.3.1. Difusão em ágar, contato direto e de eluição

As análises da citotoxicidade foram, portanto, realizadas através da medida das áreas descoradas com o auxílio de um paquímetro digital, com sensibilidade de 0,01 mm a 150 mm. Para os métodos de difusão em ágar e contato direto (figura 3) e pela morfologia celular nos quadros 2 e 3. Os graus de citotoxicidade foram quantificados numa escala de 0 a 4 como mostrados nos quadros 2 e 3.

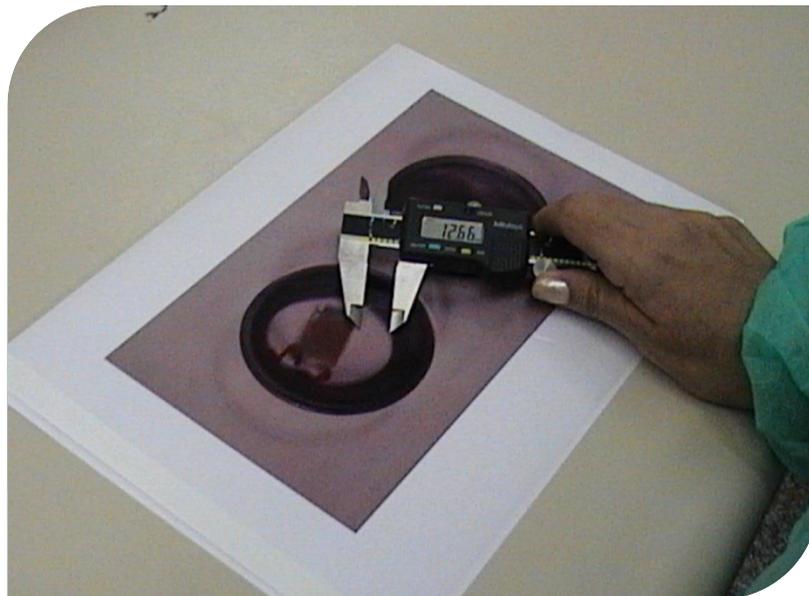


Figura 3. Medição da área descorada (Fonte: VIDAL, M)

Quadro 1: Graus de Citotoxicidade para os Ensaio de Difusão em Ágar e Contato direto

Grau	Citotoxicidade	Descrição da Zona de Citotoxicidade
0	Ausência	Ausência de descoloramento ao redor da amostra.
1	Leve	Zona de descoloramento limitada à área sob a amostra.
2	Branda	Tamanho da zona de descoloramento a partir da amostra menor que 0,45 cm.
3	Moderada	Tamanho da zona de descoloramento a partir da amostra compreendido entre 0,45 cm a 1,0 cm.
4	Severa	Tamanho da zona de descoloramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira.

Fonte: Adaptado da *THE UNITED States Pharmacopeia*; 2016.

Quadro 2: Graus de Citotoxicidade para o Ensaio de Eluição

Grau	Citotoxicidade	Condição das Culturas
0	Ausência	Grânulos intracitoplasmáticos descontínuos; sem lise celular.
1	Leve	Até 20% das células são redondas, vagamente unidas, sem grânulos intracitoplasmáticos; células lisadas estão ocasionalmente presentes.
2	Branda	Até 50% das células são redondas e desprovidas de grânulos citoplasmáticos; sem lise celular extensiva e áreas vazias entre as células.
3	Moderada	Até 70% das camadas contém células arredondadas ou lisadas.
4	Severa	Destruição quase integral das camadas celulares.

Fonte: Adaptado da *THE UNITED States Pharmacopeia*; 2016

4.3.2. Captura de vermelho neutro

O teste de viabilidade celular utilizando a captação de vermelho neutro desenvolvido por Babich; Borenfreund em 1990, se baseia na captação do vermelho neutro, um corante fracamente catiônico, pelos lisossomos celulares. Trata-se de um teste colorimétrico que avalia a intensidade do vermelho neutro incorporado e posteriormente extraído dos lisossomos viáveis, que é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O ensaio de vermelho neutro é uma análise quantitativa de citotoxicidade. Para a realização da viabilidade celular aplica-se a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade (\%)} = 100 \times \text{OD extrato} / \text{OD controle}$$

Onde: OD extrato = médias das densidades ópticas das amostras testes incubados com 100% de extrato.

E onde: OD controle = média das densidades ópticas das amostras incubadas com meio de cultura. Para que a amostra teste seja considerada não citotóxica, tem que ter o valor obtido maior que 70% em relação ao controle. O índice de citotoxicidade (IC50) que é a concentração da amostra teste, isto é que mata 50% das células do ensaio, é determinado pela curva concentração dose resposta.

A porcentagem de viabilidade celular foi obtida com a divisão da média da densidade óptica de cada amostra pela média da densidade óptica do controle de células multiplicado por 100.

A partir dos dados paramétricos obtidos será realizada a análise estatística descritiva, média e desvio padrão, e havendo comportamento normal dos dados, os mesmos serão submetidos à análise de variância de um fator e teste de Tukey, considerando significativas as diferenças para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

A Tabela 1 resume os resultados para os Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* utilizando as células L929, para os métodos de difusão em ágar (Figura 4), contato direto (Figura 5) e eluição (Figura 6) obtidos para as 16 amostras de próteses mamárias de silicone (P1 a P16), 1 amostra de protetor para seio de silicone natural e 1 amostra de silicone de uso industrial (protetor antiaderente).

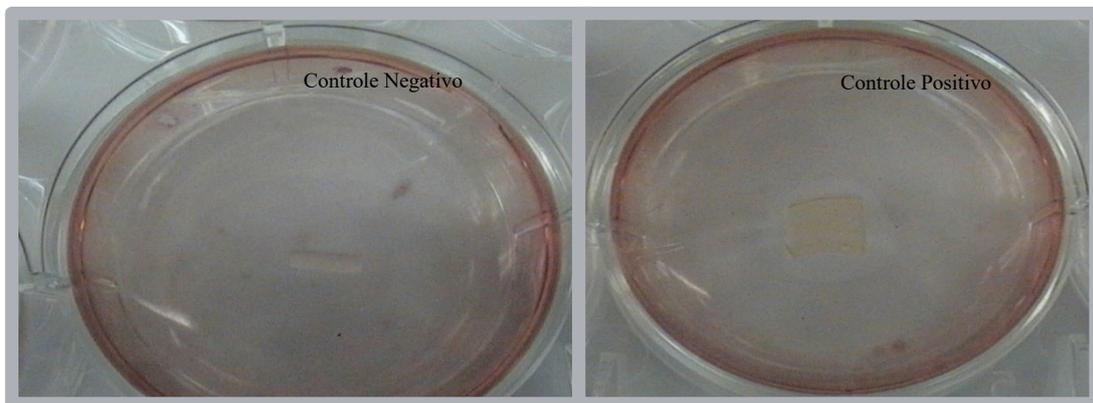


Figura 4. Fotografias de placas contendo células L929 no ensaio de citotoxicidade *'in vitro'* exibindo a ausência ou presença de halo, respectivamente, para o controle negativo e positivo pelo método de difusão em ágar. (Fonte: VIDAL, M).

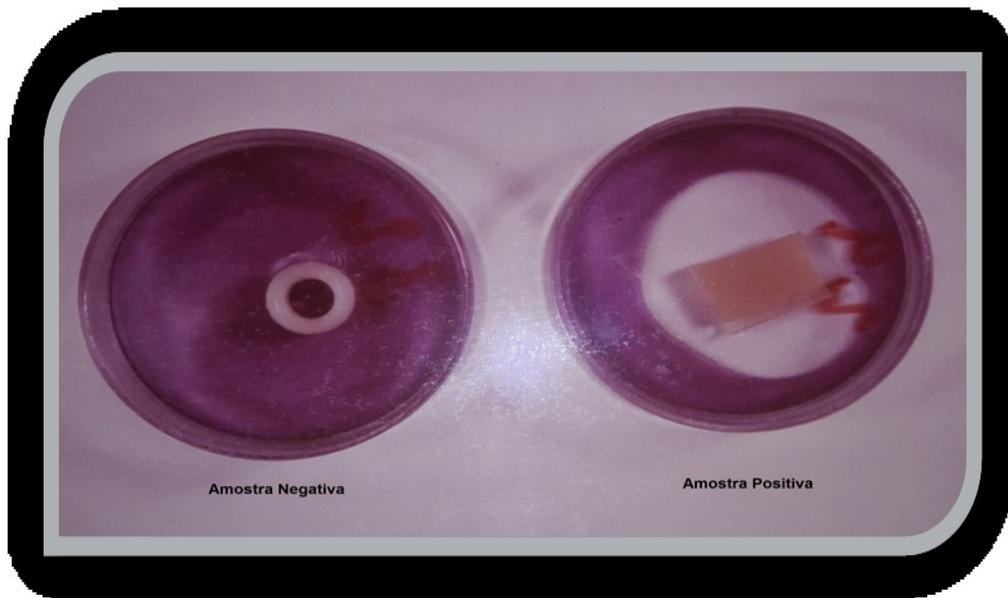


Figura 5. Fotografias de placas de cultura de células L929 no ensaio de citotoxicidade “*in vitro*” exibindo a ausência ou presença de halo, respectivamente, para o controle negativo e positivo pelo método de contato direto. (Fonte: Vidal, M.)

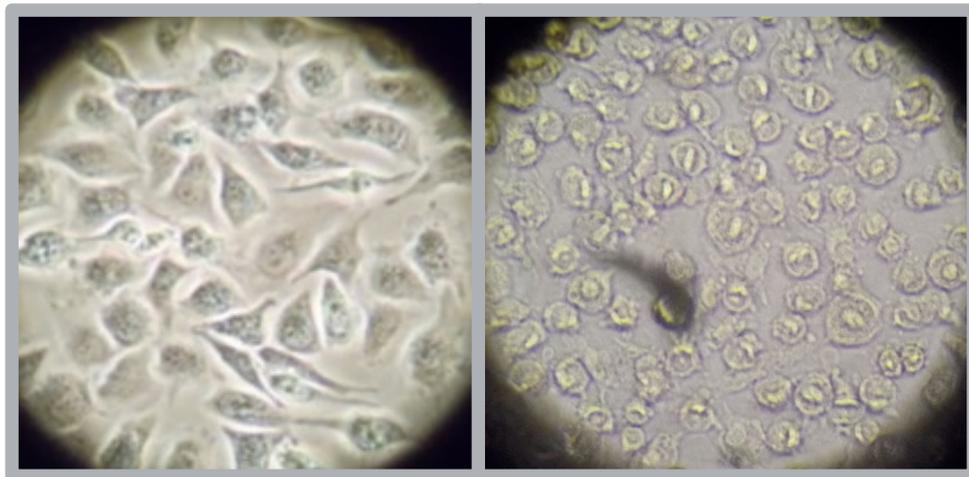


Figura 6. Microfotografias das células L-929 normais e danificadas expostas aos extratos dos respectivos controles negativo e positivo no ensaio de citotoxicidade ‘*in vitro*’ – método de eluição (Fonte: VIDAL, M).

No método de eluição, todos os materiais foram testados a partir de seus extratos obtidos em 3 diferentes condições de extração empregando: meio de cultura MEM

completo a 37°C; a 70°C e a 121°C durante 24hs. O material padrão de referência biologicamente não reativo fornecido pela Farmacopeia Americana (plástico atóxico-USP) e o látex para garrote biologicamente reativo adquirido comercialmente foram empregados como controles negativo e positivo, respectivamente.

Os testes pelos 3 métodos foram considerados válidos, pois o controle negativo mostrou ausência de reação citotóxica (grau 0) e o controle positivo mostrou uma nítida reação citotóxica, ou seja, um grau de citotoxicidade igual ou superior a 3. Todas as amostras de prótese mamária (P1 a P16) mostraram ausência de reação citotóxica (grau 0) nos 3 métodos empregados semelhantemente ao controle-negativo.

Quando comparados ao método de difusão em ágar, os métodos de contato direto e de eluição foram mais sensíveis na detecção do efeito tóxico em amostras do controle positivo, do protetor de seio de silicone e de protetor antiaderente de silicone. O controle positivo apresentou maior citotoxicidade (severa ou de grau 4) pelos métodos de contato direto e de eluição, quando comparado à citotoxicidade moderada ou de grau 3 obtida a partir método de difusão em ágar.

Comportamento semelhante ao controle positivo ocorreu para a amostra de protetor antiaderente. A citotoxicidade do protetor de seio de silicone não foi detectada pelo método de difusão em ágar (grau 0). No entanto, uma reação citotóxica severa (grau 4) foi detectada quando a amostra foi testada nos métodos de contato direto e de eluição com os 3 diferentes extratos da amostra.

Quadro 3: Resultados dos três métodos (difusão em ágar, contato direto e eluição) de Ensaio de Citotoxicidade ‘*in vitro*’

Descrição de Materiais	Ensaio de Difusão em Ágar		Ensaio de Contato Direto		Ensaio de Eluição (temperatura de extração: 24 h)						
	Médias (cm)		Médias (cm)		Médias (%)						
	37°C	70°C	121°C	(cm)	grau	(cm)	grau	(%)	grau	(%)	grau
Controle negativo (plástico atóxico-USP)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0	0	0	0	0	0
Controle positivo (garrote de látex tóxico)	0.8	3 (moderada)	2.5	4 (severa)	>70%	4 (severa)	>70%	4 (severa)	>70%	4 (severa)	
Prótese Mamária P1	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	
Prótese Mamária P2	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	
Prótese Mamária P3	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	
Prótese Mamária P4	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	
Prótese Mamária P5	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	
Prótese Mamária P6	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	

Prótese Mamária P7	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P8	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P9	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P10	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P11	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P12	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P13	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P14	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P15	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Prótese Mamária P16	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)	0	0 (ausência)
Suporte de seio de silicone natural	0	0 (ausência)	1.5	4 (severa)	>70%	4 (severa)	>70%	4 (severa)	>70%	4 (severa)
Protetor antiaderente	0.5	3 (moderada)	2.5	4 (severa)	>70%	4 (severa)	>70%	4 (severa)	>70%	4 (severa)

A incorporação do vermelho neutro pelas células L-929 pode ser observada na Figura 7, na qual se verifica células mortas (não coradas) e células viáveis, coradas, após exposição com controle positivo – extrato de fragmentos de látex. A Figura 8 exhibe as placas de 96 poços ao final do ensaio, onde é possível verificar a diminuição da coloração provocada pela toxicidade dos grupos controle positivo e silicone industrial (placa da esquerda) e ausência de toxicidade para as próteses mamárias. O gráfico exibido na Figura 9 apresenta as médias e desvios-padrão para cada grupo testado.

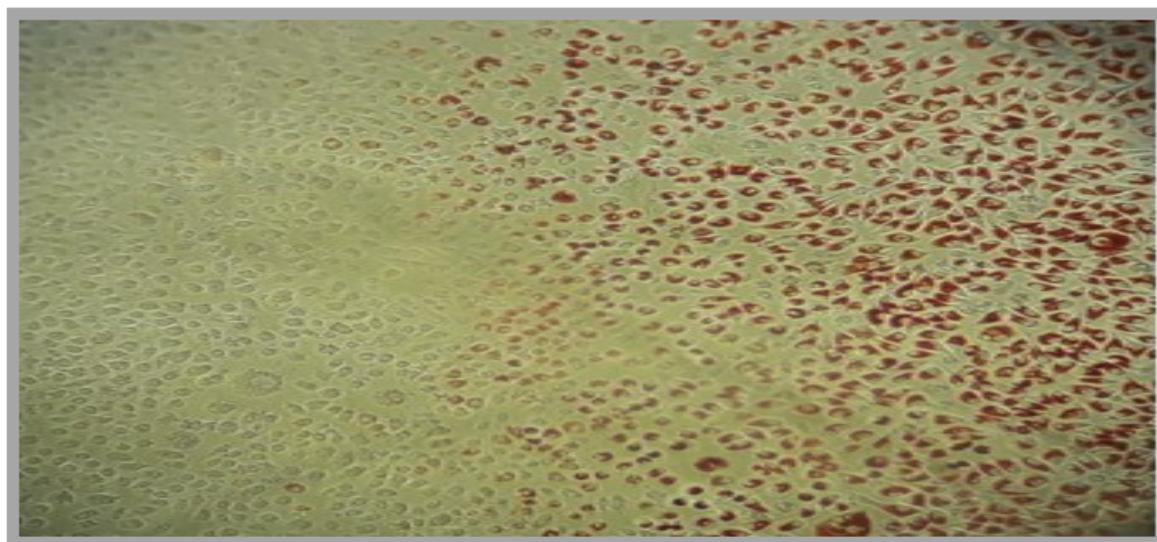
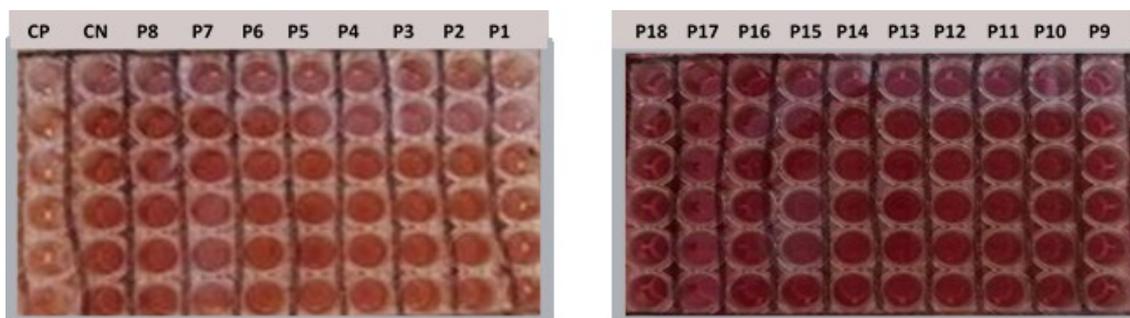


Figura 7. Células Clone L929, viáveis coradas com vermelho neutro e células descoradas indicando potencial citotóxico. (Fonte: VIDAL, M).



Legenda: CN - Controle negativo; CP - Controle positivo; P1 a P16 – Próteses mamárias de silicone; P17 – Suporte de seios de silicone (“sutiã”); P18 – Protetor Antiaderente de silicone.

Figura 8. Microplacas de culturas de células L929 com diferentes amostras de silicone pelo método de captura do vermelho neutro (Fonte: VIDAL, M)

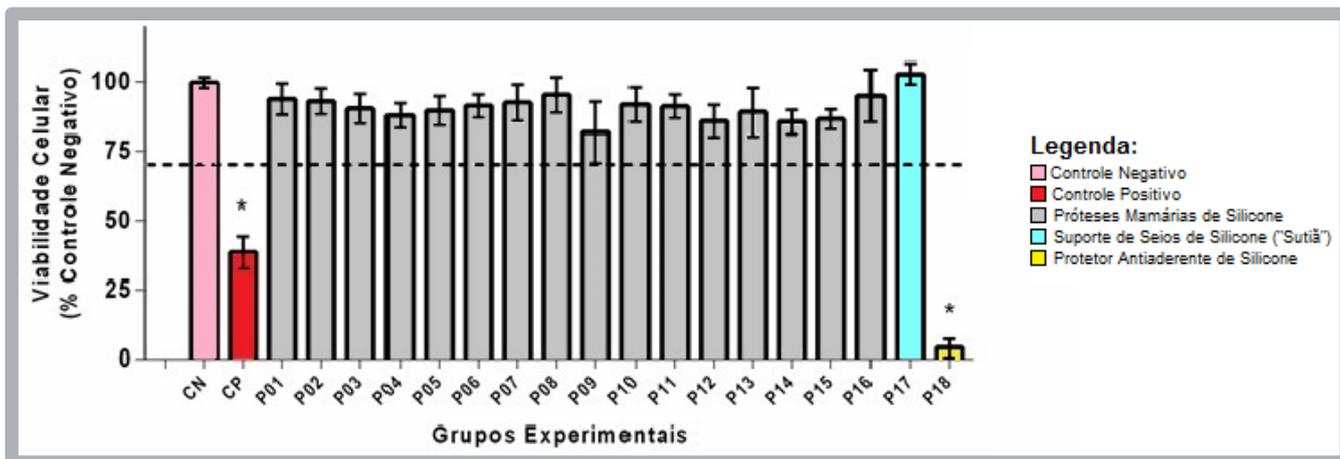


Figura 9. Efeito de diferentes amostras de silicone na captação de vermelho neutro em células L929. As barras representam as médias individuais \pm desvio padrão das seis (6) réplicas do experimento. O controle negativo mostrou uma percentagem padrão, ou seja, 100% de negatividade de citotoxicidade. As linhas indicam corte de viabilidade celular que classifica um material como citotóxico, ou seja, menor que 70% de viabilidade, o material é citotóxico (ISO 10993-5:2009,2009). O asterisco indica diferença significativa com relação a todos os outros grupos experimentais, ($p,0,05$), determinado através de Teste de Kruskal-Walis com pós-teste de Dunn (Fonte: VIDAL, M)

Em resumo, os dados obtidos no teste de incorporação de vermelho neutro confirmam a ausência de toxicidade do controle negativo e dos extratos das próteses mamárias em oposição à toxicidade do látex e do silicone industrial.

6. DISCUSSÃO

A partir do 2º semestre de 2011, o escândalo com as próteses mamárias do fabricante francês Poly Implant Prothèse - PIP causou comoção mundial em função da morte de uma paciente francesa por câncer. Essa se deu pela ruptura da prótese utilizada, e o consequente contato direto do organismo com o gel, classificado como cancerígeno por conter silicone para aplicação industrial.

Este evento ilustrou a necessidade da realização de testes de segurança e eficácia dos produtos para a saúde. Do ponto de vista da segurança, um dos aspectos mais importantes é a biocompatibilidade, a qual vem sendo discutida há mais de 50 anos. Um dos expoentes nesta discussão é David Willians, editor do periódico *Biomaterials*. Em 2009, ele redefiniu o termo biomaterial, propondo que “um biomaterial é uma substância que foi projetada para assumir uma forma que é usada para dirigir, por controle de interações com componentes de sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico” (WILLIANS, 2009). Entretanto, discute-se que o termo biocompatibilidade deva ser entendido em um contexto mais amplo, não como uma propriedade intrínseca do material, mas como uma propriedade do sistema, que envolve a interação do biomaterial com os diversos tipos celulares com os quais ele entra em contato, seja este direto ou indireto. Os principais mediadores da biocompatibilidade são: a composição dos biomateriais, os mecanismos de internalização, os mediadores mecânicos e biofísicos das interações e os mediadores materiais das interações (WILLIANS, 2014). Torna-se, portanto, importante o estabelecimento de estratégias analíticas que permitam identificar a segurança do biomaterial para o uso humano ou animal. Em um contexto amplo, espera-se que, em última análise, o biomaterial apresente efeitos clínicos aceitáveis, sendo tolerado pelo paciente.

Do ponto de vista da pesquisa regulatória, o registro de produtos para a saúde no Brasil está a cargo da ANVISA. Para tanto, dependendo do tipo de produto, um conjunto de evidências é necessário para demonstrar a segurança e eficácia de determinada classe de produtos. Por exemplo, o registro de medicamento novo na ANVISA segue a RDC 60 de 2014

(<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/29265>, acessado em 08/07/2017), enquanto o registro de produtos biológicos novos e produtos biológico é feito com base na RDC n° 55 de 2010 (http://portal.anvisa.gov.br/documents/33840/324316/Registro_Produtos_Biologicos_Hemoterapicos_10102011_WEB.pdf/047d205a-8b17-4316-9dd5-a6def6589e8b, acessado em 08/07/2017). Já o registro de produtos médicos, dentre entre eles os produtos médicos implantáveis, segue a RDC n° 185, de 22 de outubro de 2001 (http://www.anvisa.gov.br/anvisaegis/resol/2001/185_01rdc.htm, acessado em 08/07/2017).

A segurança de um implante é fundamental e deve iniciar um estudo de desenvolvimento dos processos que incluem o controle de qualidade do produto, com foco no paciente que irá receber, garantindo assim, a sua confiabilidade. Para sua segurança, o implante deve mostrar ausência de fatores tóxicos presentes ou liberados pelo material implantado que comprometem os tecidos ou células vizinhas ao implante. Portanto, todo o processo de registro exige a realização de testes pré-clínicos, os quais incluem os testes de biocompatibilidade. A ISO 10993 contém o conjunto de normas para avaliação da segurança dos dispositivos médicos implantáveis, a qual inclui os testes de citotoxicidade. Contudo, esta norma aceita diversas estratégias para avaliação da citotoxicidade, como o teste em extratos, teste por contato direto e teste por contato indireto. Destes, o teste do extrato de eluição e o de contato direto permitem análises qualitativas e quantitativas, em oposição ao teste de contato indireto, apenas qualitativo, não sendo indicado para lixiviáveis que não difundam através da camada de ágar. A análise da toxicidade pode ser mensurada pela incorporação de vermelho neutro, redução do MTT ou XTT e teste de citotoxicidade por formação de colônias. Estes métodos possuem sensibilidades e mecanismos de ação distintos, e nem sempre apresentam a mesma especificidade e sensibilidade, podendo potencialmente levar a obtenção de resultados falsos positivos ou falsos negativos.

Em 2012, a ANVISA e o INMETRO regulamentaram a certificação compulsória dos implantes mamários. Considerando os fatores abordados, revela as regras para certificação compulsória estabelecidas no Brasil pelos órgãos regulador e executivo; ANVISA e INMETRO, respectivamente (RAC-Portaria Inmetro n°162 de 05/04/2012).

Para avaliação biológica, são requeridos ensaios de citotoxicidade, que visam verificar a compatibilidade do implante mamário com o organismo humano. Os ensaios são realizados de acordo com a norma ISO 14607, item 7.2.4, que faz referência a norma ISO 10993-1. Com relação ao gel de silicone, o único ensaio previsto é o de coesão, que visa avaliar a dispersão do gel em condições críticas.

Na circunstância em que o teste em animais não possa ser substituído por um único método alternativo, o desenvolvimento de esquema de avaliação que envolva uma bateria de testes deve ser levado em consideração. A OECD 405 recomenda um sistema hierárquico no qual os animais somente sejam utilizados para a confirmação da ausência de toxicidade, reduzindo ao máximo o risco desses animais sofrerem quaisquer efeitos adversos (ABREU, 2008). Tais métodos são aplicáveis ao controle da qualidade de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária e, via de regra, apresentam boa especificidade, sensibilidade e precisão.

Os testes são baseados em normas internacionais, o que permite a padronização dos requisitos técnicos e a realização de ensaios acessíveis em todo o mundo, facilitando o processo de adequação do produto por parte do fabricante. Os ensaios são realizados em amostras coletadas por um Organismo de Certificação de Produto (OCP), acreditado pelo INMETRO, o que reduz os riscos de “direcionamento de amostras com qualidade diferenciada”, pelo fabricante, para a realização dos ensaios. Os testes abrangem a avaliação da integridade física do produto, a verificação da coesão do gel e a realização de análises químicas e biológicas, considerando os métodos e parâmetros das normas. Com relação à avaliação biológica, a Portaria n.º 323 de 25 de junho de 2012 não apresenta a exigência da realização dos ensaios de verificação biológica no gel de silicone. No entanto, trata-se de um requisito de suma importância nas análises, pois a realização desse ensaio permite avaliar o risco que o produto pode causar ao usuário final quando da ocorrência de ruptura e contato direto do gel com o organismo. Deste modo, torna-se relevante determinar a adequação dos testes para a avaliação da toxicidade de dispositivos médicos implantáveis a fim de evitar o registro de produtos falso-negativos quanto ao teste de citotoxicidade.

No presente estudo foram consideradas quatro (4) metodologias para avaliação da toxicidade *in vitro* recomendadas pela ISO 10993-5, no intuito de avaliar as próteses mamária de silicone, visando identificar o método mais sensível e reprodutível. Os

testes utilizados foram: difusão em ágar, contato direto, eluição (em 3 temperaturas de extração) e incorporação de vermelho neutro. As análises foram realizadas comparando-se os dados obtidos a partir da comparação do material teste (próteses mamárias) com controles negativo (plástico atóxico-USP) e positivo (garrote tóxico e silicone industrial).

A toxicidade dos controles positivos (protetor de seio de silicone natural e protetor antiaderente industrial) não foi identificada corretamente pelo método de difusão em ágar. Para o protetor de seio esse método identificou grau zero de toxicidade contra grau 4 dos outros métodos; para o protetor antiaderente industrial, a diferença para a toxicidade prevista foi de 3 no método de difusão contra 4 nos outros. Deste modo, fica evidente a menor capacidade preditiva do método de difusão em ágar nas condições testadas.

Quando comparadas, todas as amostras de próteses mamárias de silicone analisadas (P1 a P16, Tabela 1), apresentaram ausência de toxicidade (grau 0) independente da metodologia empregada semelhante ao resultado do controle negativo (grau 0). Estes resultados corroboram o estudo realizado por DE AZEVEDO; CRUZ; PINTO (2006), os quais avaliaram a toxicidade implantes mamários de silicone esterilizados por calor seco e pelo óxido de etileno, não observando efeito tóxico dos implantes, mas severa toxicidade do controle positivo utilizando fragmentos de látex (0,1g de látex/ml de meio de cultura).

Segundo a INFARMED, as amostras de próteses mamárias de silicone médico não podem apresentar qualquer toxicidade, uma vez que, ainda na fase de concepção dos dispositivos médicos, o fabricante deve avaliar os riscos associados à utilização do produto e elaborar um plano de gestão de risco, de forma a garantir a máxima segurança e verificação do seu risco/benefício do dispositivo, quando usado de acordo com a sua finalidade (INFARMED, 2013).

Segundo a ISO 10993-5:2009, teste de incorporação de vermelho neutro, para que a amostra seja considerada citotóxica, a viabilidade celular deve apresentar valor inferior a 70% em relação ao controle. No presente trabalho, a amostra de protetor de seio de silicone natural apresentou resultado negativo nos citotóxicos, e a amostra antiaderente de silicone industrial apresentou resultado positivo, ou seja, menor que 70% de viabilidade.

Através deste estudo foram obtidos resultados interessantes, pois quando usados os quatros métodos nas 18 amostras testadas, são similares aos resultados prévios obtidos quando testaram dispositivos médicos para verificação da citotoxicidade, embora que estes autores nem sempre trabalham com a mesma linhagem celular (CRUZ et al,1998; ROGERO et al, 2003).

Segundo PITHON (2016), os testes de citotoxicidade têm por base a exposição de uma cultura de linhagem celular 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. Os principais métodos utilizados são a difusão em ágar e de extração, pois estes previnem os danos mecânicos ocorridos com o método de contato direto. Bruce, Mc Donald e Sydiskis (1993), enfatizaram a importância da utilização de materiais com baixo potencial de citotoxicidade para como controles positivos nestes testes. Para o teste de citotoxicidade de materiais biocompatíveis, a citotoxicidade foi determinada pela modelo do halo de inibição celular criado em torno dos materiais testados.

Segundo Masson (2014), a citotoxicidade é baseada nas alterações morfológicas das células como, por exemplo, lise celular, vacuolização, destacamento, inibição de proliferação e integridade da membrana. Este último pode ser observado por meio de corantes vitais como o vermelho neutro, que indica a viabilidade celular e pode ser aplicado tanto no método de difusão em ágar quanto no de extração com incorporação de vermelho neutro.

O método de extração e captura do vermelho neutro foi utilizado com o objetivo de verificar seu desempenho e investigar se apresentaria uma melhor correlação com os testes de difusão em ágar, contato direto e de eluição. Este método vem sendo utilizado por vários autores nos estudos de citotoxicidade '*in vitro*', para estimar a avaliação da segurança de componentes e produtos biocompatíveis, entre outras aplicações. Também se tem observado que o método de captura do vermelho do vermelho é sensível, rápido e barato e pode ser considerado promissor na seleção de substâncias que causem toxicidade.

Contudo, é surpreendente a similaridade de resposta entre o método de difusão em ágar e o de captura de vermelho neutro para o suporte de seios, uma vez que este último tem boa sensibilidade ao avaliar o extrato do biomaterial em meio aquoso sem e com

diluição seriada. A hipótese inicial era de que o método de captura de vermelho neutro apresentasse resultados semelhantes ao teste de eluição.

Segundo Teixeira 2010 e Stellet Lourenço e colaboradores (2015), ensaios como contato direto e difusão em ágar são capazes, apenas, de fornecer uma avaliação qualitativa da citotoxicidade. Essas avaliações são preliminares, devendo-se seguir uma avaliação quantitativa da citotoxicidade. De um modo geral podemos afirmar que as metodologias são equivalentes, e a escolha do método de ensaio mais adequado deve ser feita de acordo com o tipo da amostra a ser analisada e a disponibilidade de equipamentos de cada laboratório.

Importante destacar que as diferenças de resultados observados nas metodologias podem estar relacionadas com a degradação dos produtos químicos desprendidos durante a extração das amostras, a lixiviação do biomaterial, e sua solubilidade no meio de extração, bem como o tempo de exposição ao extrato. Rogero e colaboradores (2003) compararam o método de difusão em ágar e o método de incorporação de vermelho neutro utilizando como amostra polímeros, cerâmicas e metais. Os autores concluíram pela equivalência das duas metodologias e atribuindo ao tempo de extração as pequenas diferenças observadas. No presente estudo, a principal diferença observada é a ausência de toxicidade para o polímero presente no suporte de seio utilizando os métodos de difusão em ágar e incorporação em vermelho neutro, em oposição à toxicidade severa para o mesmo material utilizando os métodos de contato direto e eluição a 37, 70 e 121°C por 24 horas. A possível explicação para tal diferença pode ser, especificamente, o contato direto e o regime de extração, potencialmente como maior capacidade de extração.

A escolha e interpretação das metodologias empregadas serão indispensáveis para análise e predição de sucesso ou fracasso do produto. Provavelmente por este motivo ainda existem dados controversos em literatura.

Neste sentido, a ISO 10993 oferece um conjunto de normas particulares para avaliar a biocompatibilidade de um dispositivo médico, e deste modo, poderemos alertar aos consumidores sobre novos produtos médicos ou mesmo próteses mamárias para a saúde da população.

No Brasil, a preocupação em validar métodos alternativos para a redução, substituição e refinamento do uso dos animais em estudos toxicológicos iniciou em outubro de 2011. A ANVISA em conjunto com o INCQS, da FIOCRUZ, criou o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), o primeiro centro de validação de metodologias alternativas da América do Sul (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAUDE, 2011). O BraCVAM foi inspirado em um órgão similar que existe na Europa (PRESGRAVE, 2009).

Internacionalmente, além dos centros de validação o Laboratório de Referência da União Europeia para Métodos Alternativos (ECVAM desde 1991) e o Comitê de Coordenação Interagências sobre Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM desde 1997), há presença de leis que propõem a redução do número de animais em experimentação desde 1986. Temos como exemplo, a diretiva 86/609/CEE na União Europeia e a Diretiva 2003/15/CE que definiu a proibição da comercialização dos produtos cosméticos que apresentam a formulação final e ingredientes testados em animais (UNIÃO EUROPEIA, 2003). O regulamento N° 1107/2009, de 21 de outubro de 2009, propõe que os ensaios em animais vertebrados só podem ser realizados se não houver métodos alternativos disponíveis autorizando o acesso e a partilha dos resultados dos estudos em animais entre as empresas (UNIÃO EUROPÉIA 2009).

No contexto nacional, a filosofia dos 3R's pode ser observada nos “Princípios Éticos na Experimentação Animal” editado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), em junho de 1991 e na Lei n° 11.794, ou Lei Arouca, adotada em 2008, que estabelece, entre outras disposições, a tarefa de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa através da criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (BRASIL 2008). Em 3/07/2012, por meio da Portaria n° 491, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação instituiu a Rede Nacional de Métodos Alternativos – RENAMA. Tal rede tem como objetivo a implantação de ensaios alternativos, promovendo o desenvolvimento, a validação e a certificação dos novos métodos (BRASIL 2012). E mais recentemente, a Lei Estadual N° 15.316/2014, aprovada no estado de São Paulo, proíbe o desenvolvimento, experimento e testes de produtos cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal em animais.

Deste modo, a escolha do método in vitro mais adequado ao teste de toxicidade de materiais como próteses mamaria tem um papel fundamental na segurança dos usuários sem deixar de lado a execução de uma ciência mais ética e confiável.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos dos quatro testes de citotoxicidade utilizados foi possível concluir que as próteses mamárias testadas são atóxicas, porém, para o polímero utilizado no suporte de seio, houve diferença significativa entre os métodos de difusão em ágar e captação de vermelho neutro em relação aos métodos de contato de direto e eluição.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Clarice Lima do Canto. **Avaliação de citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em células 3T3**. 2008. 104 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

ALVES, Eurico Castro. Investigação clínica em dispositivos médicos. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, Lisboa, n. 24, p. 65-68, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 14949: Implantes para cirurgia: elastômeros de silicone curados por adição de dois componentes**. Rio de Janeiro, 2011.

ASTOLFI FILHO, Spartaco; SILVA, Carlos Gustavo Nunes da; BIGI, Maria de Fátima Mendes Acácio. Bioprospecção e Biotecnologia. **Parcerias Estratégicas**, Brasília, v. 19, n. 38, p. 45-80, 2015.

AZEVEDO, Janice Campos de; CRUZ, Áurea Silveira; PINTO, Terezinha de Jesus Andreoli. Avaliação da biocompatibilidade de implantes mamários de silicone esterilizados por calor seco e pelo óxido de etileno. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 259-263, 2006.

BABICH, H; BORENFREUND, E. Application of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. **ATLA**, Nottingham, v.8, p.129-144, 1990.

BADOLE, G.P. et al. A Comparative Evaluation of Cytotoxicity of Root Canal Sealers: an in vitro study. **Restorative dentistry & endodontics**, Korea, v. 38, n. 4, p. 204-209, 2013.

BAEK, Hyun Sook et al. Evaluation of the extraction method for the cytotoxicity testing of latex gloves. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 46, n. 4, p. 579-583, 2005.

BALLS, M. et al. The principles of weight of evidence validation of test methods and testing strategies: the report and recommendations of ECVAM workshop 58. **ATLA**, Nottingham, v. 34, p. 603-20, 2006.

BERRY, M.C.; DAVIES, D.M. Breast Augmentation: a review of the silicone prosthesis. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, Amsterdam, v. 63, p. 1761-1768, 2013.

BIOLOGICAL reactivity test, in vitro. In: **THE UNITED States Pharmacopeia 40. National formulary 34**. Rockville: U.S. Pharmacopeial, 2017.

BORENFREUND, E; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**. Amsterdam, v.24, p.119-124, 1985.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulação Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content;anvisa+portal/anvisa/regulacao+sanitaria>>. Acesso em 13 set. 2014.

_____. RDC 60/2014 – 13/10/2014. Dispõe sobre os critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. Publicação em **DOU - 11/01/2015**

_____. Resolução RDC nº 15, de 15 de março de 2012. Dispõe sobre Requisitos de Boas Práticas para o Processamento de Produtos para Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 mar. 2012.

_____. Resolução RDC nº 16, de 20 de março de 2012. Estabelece os Requisitos Mínimos de Identidade e Qualidade para Implantes Mamários e Exigência de Certificado de Conformidade do Produto no Âmbito do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade (SBAC). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 mar. 2012.

_____. Resolução RDC nº 185, de 13 de outubro de 2006. Estabelece que os detentores de registro de produtos para saúde devem encaminhar a Anvisa as seguintes informações econômicas no momento do deferimento do registro ou de sua renovação: preço do produto praticado em outros países; preço que pretende praticar no mercado interno, com a discriminação de sua carga tributária; relação dos produtos substitutos existentes no mercado; características técnicas específicas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 out. 2006.

_____. Resolução RE nº 3385, de 13 de outubro de 2006. Estabelecer a lista de produtos para saúde cujo RELATÓRIO DE INFORMAÇÕES ECONÔMICAS deverá ser encaminhado ao Núcleo de Assessoramento Econômico em Regulação, quando do protocolo de Registro ou de Revalidação de Registro, que constam no anexo desta Resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 out. 2006.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Portaria nº 162, de 05 de abril de 2012. Requisitos de avaliação da conformidade para implantes mamários. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 abr. 2012.

_____. Portaria nº162, de 05 abril 2012. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 06 abr. 2012.

BRASIL. Presidência da República. Decreto Federal nº 6.041, de 08 de fevereiro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 fev. 2007. Disponível em: <<http://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:federal:decreto:2007-02-08:6041>>

_____. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia e cria o COMITÊ Nacional de Biotecnologia. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 28 dez. 2007.

BRUCE, G. R.; MCDONALD, N. J.; SYDISKIS, R. J. Cytotoxicity of retrofill materials. **Journal of endodontics**, Baltimore v. 19, n. 6, p. 288-292, 1993.

CABRAL, Emanuelli Lourenço. **Síntese e caracterização de poliuretanos bioestáveis com potencial aplicação na área cardiovascular**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) – Faculdade de Engenharia. Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul, 2012.

CENTER FOR DEVICES AND RADIOLOGICAL HEALTH U.S. Food and Drug Administration. **FDA Update on the Safety of Silicone Gel-Filled Breast Implants**. 2011.

COSTA, E.A. Gerenciando risco em reprocessamento de produtos para saúde: uma metodologia para serviços. **Rev. SOBECC**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 33-34, 2013.

COSTA, Eliana Auxiliadora Magalhães et al. Medical device reprocessing: a regulatory model proposal for Brazilian hospitals. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, v. 45, n. 6, p. 1459-1465, 2011.

CRUZ, Aurea Silveira et al. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade" in vitro" de materiais biocompatíveis. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 153-159, 1998.

DEPARTAMENTO INTERSINDICAL EST ESTUDOS SÓCIO ECONÔMICO. **Normas de responsabilidade social da ISO e da ABNT**: subsídios para o movimento sindical. Rio de Janeiro, 2006. (Nota Técnica nº29).

DERELANKO, Michael J; AULETTA, Carol S. (Ed.). **Handbook of toxicology**. Boca Raton: CRC press, 2014.

FLORIANI, C. G. Brasil: utilização da terra. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 5, 2008.

GARCIA, Sandra N.; GUTIERREZ, Leslie; MCNULTY, Amy. Real-time cellular analysis as a novel approach for in vitro cytotoxicity testing of medical device extracts. **Journal of biomedical materials research Part A**, Hoboken, v. 101, n. 7, p. 2097-2106, 2013.

GOLDENBERG, Dov Charles; BAROUDI, Ricardo. O problema dos implantes de silicone e o impacto na qualidade de vida. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 1-1, 2012.

HANDEL, N.; CORDRAY, T.; GUTIERREZ, J.J.A. A Long-Term Study of Outcomes, Complications, and Patient Satisfaction with Breast Implants. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 117, n. 3, p. 757-756, 2006.

INFARMED, I.P. (2013a). Obtido em 5 de setembro de 2015, de INFARMED <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/DISPOSITIVOS_MEDICOS.

INFARMED, I. P. (2013e). Dispositivos Médicos. Disponível: <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/DISPOSITIVOS_MEDICOS>. Acesso em 17 ago. 2016.

INFARMED, I. P. (2013f). **Fronteira entre dispositivos médicos e outros produtos**. Disponível em: <http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/DISPOSITIVOS_MEDICOS/CLASSIFICACAO_E_FRONTEIRAS/FRONTEIRA_DM_OUTROS_PRODUTOS.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices: part 5: test for cytotoxicity**. Geneve, 2009. 7 p.

JAWORSKA, Joanna; HOFFMANN, Sebastian. Integrated testing Strategy (ItS): opportunities to better use existing data and guide future testing in toxicology. **ALTEX**, Heidelberg, v. 27, n. 4, p. 231-242, 2010.

JUNG, Ole et al. Optimized in vitro procedure for assessing the cytocompatibility of magnesium-based biomaterials. **Acta biomaterialia**, Kidlington, v. 23, p. 354-363, 2015.

KRAMER, Daniel B.; XU, Shuai; KESSELHEIM, Aaron S. Regulation of medical devices in the United States and European Union. **New England journal of medicine**, Boston, v. 366, n. 9, p. 848-855, 2012.

KUMAR, S. Biosafety and biosecurity issues in biotechnology research. **Biosafety**, India, v. 4, p. e153, 2015.

MASSON, A.O.; NASCIMENTO, M.H.M.; LOMBELLO, C.B. Análise comparativa de diferentes métodos de citotoxicidade *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA, 14., Uberlândia. [**Anais**]. Minas Gerais, 2014.

MORALES, Marcelo M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

NADERI, H.; BAHRAMI, M.MM. Review paper: critical issues in tissue engineering: biomaterials, cell sources, angiogenesis and drug delivery systems. **Journal of Biomaterials Applications**, Lancaster, v. 26, n. 4, p. 383-417, 2011.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidance document on the validation and international acceptance of new or updated

test methods for hazard assessment. Paris, 2005. 96 p. (OECD Series on Testing and Assessment, n. 34).

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE NORMALIZAÇÃO. **ISO 14607**. Non-active surgical implants: mammary implants: particular requirements. 2. ed. Geneva: ISO, 2007. 36 p.

ORÉFICE, R.L.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica; Guanabara Koogan, 2012.

PARK, J.B.; LAKES, R.S. Biomaterials: an introduction. 3. ed. New York: Springer, 2007.

PITHON, Matheus Melo. Citotoxicidade in vitro de elásticos ortodônticos: comparação entre duas metodologias. **Saúde.com**, Bahia, v. 4, n. 1, 2016.

PLESIS, A. Biomateriais. Revista Espaço Saúde, São Paulo, n. 3, 2012. Disponível em: <www.revistaespacosauade.com.br>.

PRESGRAVE, O. A proposal of establishing a Brazilian center for validation of alternative methods (BraCVAM). **ALTEX**, Heidelberg, v. 26, n. 4, 2009b.

PROCEDIMENTO operacional padronizado: ensaio de citotoxicidade in vitro: método de difusão em ágar. In: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Brasil). **Manual da Qualidade nº 65.3330.010**: revisão: 15 anos, Rio de Janeiro, 2017.

RAMOS, Leonardo; MARQUES, Sylvia Ferreira; DE JESUS, Diego Santos Vieira. **A União Européia e os estudos de integração regional**. Del Rey, Belo Horizonte, 2009.

REDDY, L.H. et al. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. **Chemical Reviews**, Washington, v. 112, n. 11, p. 5818-5878, 2012.

RODAS, A.C.D.; POLAK, R.; HARA, P.H.; HIGA, O. Cytotoxicity and Endothelial Cell Adhesion of LYOPHILIZED and Irradiated Bovine Pericardium Modified With Silk Fibroin and Chitosan. **Artificial Organs**, Cleveland, v. 35, n. 5, p. 502-507, 2011.

ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, SP, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SERLETTI, J; NELSON, J. Breast reconstruction after breast cancer. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 127, n.6, p. 124e-35e, 2011.

SEHNEM, Dayany Pereira et al. Métodos alternativos para avaliação da citotoxicidade de biomateriais. **Revista Rede de Cuidados em Saúde**, Rio de Janeiro, v. 6, n. 2, 2012.

STELLET LOURENÇO, Emanuelle et al. Evaluation of Commercial Latex as a Positive Control for In Vitro Testing of Bioceramics. **Key Engineering Materials**, Switzerland, v. 631, p. 357-362, 2014.

- SILVA, Mauro Afonso da et al. Biomateriais e sua biocompatibilidade numa abordagem multidisciplinar na área de saúde, alimentos funcionais e medicina regenerativa. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, Mato Grosso, v. 2, n. 8, 2012.
- SILVA, Regina Beatriz Tavares. Estatuto das Famílias retoma proposições desastrosas. **RIDB**, Lisboa, v. 2, 2013.
- STEIERT, E. A.; BOYCE, M.; SORG, H. Capsular contracture by silicone breast implants: possible causes, biocompatibility, and prophylactic strategies. **Medical Devices**, Auckland, v. 6, p. 211-218, 2013.
- THERAPEUTIC GOODS ADMINISTRATION (TGA). Department of Health and Ageing. **PIP breast implants**: update. Austrália, 2012.
- TIRONI, Luís Fernando. Globalização em serviços tecnológicos. **Radar**, n. 33, p. 27, 2014.
- TRINDADE, Evelinda et al. Modos de falhas de artigos médico-hospitalares: análise das queixas técnicas envolvendo equipo de infusão notificadas à ANVISA em 2007 e 2008. **BIT: Boletim Informativo de Tecnovigilância**, Brasília, 2010.
- VIDAL, M.N.P.; AIUB, C.; ABRANTES, S.M. P; ZAMITH, H.P.S. Evaluation of Brazilian medical devices using ágar diffusion cytotoxicity assay. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, n.2, p.84-87, 2009.
- VIDAL, M.N.P.; MIRANDA, A.C. Toxicidade em biomateriais um alerta aos serviços de saúde. **Analytica**, São Paulo, v.45, 2010.
- WILLIAMS, D.F. The mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, Inglaterra, v. 29, p. 2941-2953, 2008.
- WILLIAMS DF. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, Inglaterra, v.30, n.30, p.5897-909, 2009.
- WILLIAMS, D.F. The biomaterial conundrum in tissue engineering. **Tissue Engineering Part A**, New York, v. 20, n. 7-8, p. 1129-31, 2014.

9. APÊNDICES

9.1 - MANUAL TÉCNICO LABORATORIAL PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO – MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR BASEADO NO PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO (POP) DO INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE DA FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (INCQS/FIOCRUZ) E NA FARMACOPEIA AMERICANA (USP)

SUMÁRIO

- 1. Objetivo**
- 2. Campo de aplicação**
- 3. Histórico**
- 4. Definições**
- 5. Siglas**
- 6. Condições gerais**
- 7. Condições específicas**
- 8. Bibliografia**

1. OBJETIVO

O Manual Técnico tem por finalidade a descrição dos procedimentos experimentais a serem adotados na execução do ensaio de citotoxicidade “in vitro” em células de mamífero, empregando o método de difusão em ágar.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

2.1 – Este Manual técnico aplica-se à avaliação de segurança de materiais plásticos, elastômeros e de outros polímeros empregados na fabricação de dispositivos e acessórios de uso médico e hospitalar em contato direto ou indireto com o tecido humano, tais como:

- a) Bolsas para sangue;
- b) Frascos para soluções parenterais;
- c) Equipo para administração de soluções;
- d) Cateteres intravenosos;
- e) Implantes de próteses mamárias;
- f) Tubos e acessórios para oxigenador corporal;
- g) Tubos e acessórios para dialisador;
- h) Válvulas cardíacas;
- i) Enxertos vasculares;
- j) Equipo para transfusão e infusão;
- k) Elásticos de fraldas descartáveis

3. HISTÓRICO

A partir da 22ª Revisão da Farmacopeia Americana, o ensaio de difusão em ágar foi introduzido como teste de reatividade biológica “in vitro” para a avaliação de segurança de materiais plásticos de uso médico.

4. DEFINIÇÕES

Para efeito deste Manual Técnico, são adotadas as seguintes definições:

4.1 – Amostra

Produto a ser testado ou um extrato preparado do mesmo.

4.2 – Biocompatibilidade

Aceitação pelo organismo de material implantado ou em contato com o tecido vivo.

4.3 – Controle Celular

Cultura celular sem tratamento

4.4 – Controles Negativos

4.4.1 – Material Padrão de Referência USP biologicamente não reativo de acordo com as condições do ensaio.

4.4.2 – Papel de filtro Whatman n.^o 1.

4.5 – Controle Positivo

Látex para garrote biologicamente reativo.

4.6 – Elastômero

Polímero com propriedades físicas parecidas com as da borracha.

4.7 – Plástico

Material polimérico de alto peso molecular.

4.8 – Polímero

Composto orgânico de alto peso molecular, natural ou sintético constituído pela união de moléculas simples chamadas de monômeros. Alguns polímeros são elastômeros e outros são plásticos

5. SIGLAS

São usadas no texto deste Manual Técnico as seguintes siglas:

USP - Farmacopeia dos Estados Unidos da América (United States Pharmacopeia)

MEM - Meio de Cultura Essencial Mínimo (Minimum Essential Medium)

PBS - Solução salina tamponada de fosfato (Phosphate Buffered Saline)

6. CONDIÇÕES GERAIS

6.1– Equipamentos e outros Itens

- a) Agitador magnético;
- b) Autoclave
- c) Balança analítica;
- d) Banho-maria;
- e) Bico de Bunsen;
- f) Câmara de Neubauer;
- g) Estufa de CO₂;
- h) Estufa de secagem;
- i) Fluxo laminar vertical;
- j) Forno;
- k) Frasco de cultura de plástico ou de vidro;
- l) Frascos criogênicos plásticos (1 mL e 2 mL);
- m) Microscópio invertido;
- n) Papel de alumínio;
- o) Papel de filtro Whatman n.º 1;

- p) Paquímetro ou régua milimétrica;
- q) Pinças cirúrgicas;
- r) Pipetador automático;
- s) Pipetas Pasteur;
- t) Pipetas sorológicas (1ml,5mL e 10 mL);
- u) Placas plásticas (3,5cm de diâmetro);
- v) Potenciômetro;
- w) Termômetro;
- x) Tesoura;
- y) Unidade de filtração (1000 mL);
- z) Vidraria em geral (erlenmeyer, bécquer e proveta).

6.2– Insumos e soluções

- a) células L929 (fibroblastos de camundongo);
- b) solução tampão de fosfato PBS;
- c) solução de L-glutamina 200 mM;
- d) soro fetal bovino;
- e) solução antibiótica de Penicilina 10^4 UI/mL e Estreptomicina 10^4 μ g/mL ;
- f) solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%;
- g) MEM 1 x concentrado;
- h) MEM 2x concentrado
- i) MEM completo 1 x concentrado;
- j) Ágar 1,8% com 0,01% de vermelho neutro;
- l) solução de cloreto de sódio 0,9 %;
- m) Meio de cobertura das células:agar 0,9% com 0,005% de vermelho neutro;

- n) meio de congelamento com dimetilsulfóxido;
- o) meio de congelamento com glicerol;
- p) Controle Negativo: Padrão de Referência USP e papel de filtro Whatman n.º 1;
- q) Controle Positivo: látex para garrote.

6.3 – Preparações de soluções

6.3.1 - Solução PBS:

Cloreto de sódio (PM 58,44)	32,0 g
Cloreto de potássio (PM 74,55)	0,8 g
Fosfato de sódio dibásico (PM 141,96)	4,6 g
Fosfato de potássio monobásico (PM 136,09)	0,8 g
Água desionizada	4,0 L

- a) dissolver com agitação magnética;
- b) ajustar o pH a 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1 N;
- c) esterilizar por autoclavação durante 30 min.

6.3.2 – Solução de L-glutamina (200 mM):

L - Glutamina (PM146,15)	- 2,92 g
Água desionizada	- 100 mL

- a) dissolver com agitação magnética;

b) esterilizar por filtração (membrana de 0,22 μm).

Nota:

Adição 1% v/v ao meio MEM 1 X concentrado.

6.3.3 – Solução antibiótica de Penicilina e Estreptomicina:

6.3.3.1 – Solução A - Penicilina G Potássica 2×10^4 UI/mL.

Penicilina	5×10^6 UI
Água desionizada estéril	250 mL

6.3.3.2 – Solução B - Sulfato de Estreptomicina 2×10^4 μg /mL.

Sulfato de estreptomicina	5g
Água desionizada estéril	250 mL

6.3.3.3 – Solução de Penicilina (10^4 UI/mL) e estreptomicina (10^4 μg /mL).

Solução A 250mL

Solução B 250mL

Nota:

Adição 1% v/v ao meio MEM 1 X concentrado.

6.3.4 – Solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%

6.3.4.1 – Solução A - Tripsina 0,25%

Tripsina (Difco 1:250) 1,25g

Solução PBS 500 mL

- a) dissolver com agitação magnética durante 1 hora à temperatura ambiente;
- b) filtrar com papel de filtro (Whatman n.0 1);
- c) esterilizar por filtração (membrana de 0,22 μm).

6.3.5 – MEM 1 X concentrado com sais de Earle - Sigma M 0268

- a) para cada 9,6 de pó equivalente a 1 litro de meio: adicionar 900 mL de água desionizada;
- b) dissolver empregando agitação magnética;
- c) adicionar 2,2 g de bicarbonato de sódio para cada litro de volume final do meio a ser obtido;
- d) agitar até completa dissolução da mistura;
- e) ajustar o pH do meio na faixa de 7,2 a 7,3 (0,1 a 0,2 unidades abaixo do pH desejado de 7,4) usando ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;
- f) adicionar água desionizada restante para completar o volume de 1 litro;
- g) esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 μm).

6.3.6 – MEM completo 1 X concentrado

MEM 1 X concentrado suplementado com:

- a) Soro fetal bovino 5% v/v

- b) Sulfato de estreptomicina 100 µg/mL
- c) Penicilina G potássica 100 UI/mL
- d) L - glutamina 2 mM

6.3.7 – MEM 2 X concentrado.

Para cada 19,2 g de pó:

- a) adicionar 1000 mL de água deionizada;
- b) dissolver empregando agitação magnética;
- c) adicionar solução de bicarbonato de sódio 2,8 % para ajustar o pH a 7,2;
- d) esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 µm);
- e) adicionar soro fetal bovino 10% v/v ao meio MEM 2x concentrado.

Empregado na composição do meio de cobertura das células.

6.3.8 – Agar 1,8% com 0,01% de vermelho neutro:

- Agar Bacto Difco 3,6 g
- Vermelho neutro 0,02 g
- Água desionizada 200 mL

- a) aquecer em fogo brando para fundir o ágar;
- b) adicionar o vermelho neutro;
- c) homogeneizar com bastão de vidro;
- d) distribuir 50 mL por frasco de vidro âmbar;

- e) esterilizar por autoclavagem a 121 °C por 15 min.;
- f) conservar em geladeira até o momento do uso.

Empregado na composição do meio de cobertura das células.

6.3.9 – Meio de cobertura.

Para cada 100 mL:

Agar 1,8 % com 0,01% de vermelho neutro 50 mL

MEM 2 X concentrado 50 mL

- a) aquecer em fogo para fundir o agar;
- b) manter o agar e o meio em banho-maria a 44 ± 1 °C;
- c) adicionar volumes iguais de agar e de meio em quantidade suficiente para o número de placas preparadas e manter a 44 ± 1 °C;
- d) usar 1 mL de meio de cobertura para cada placa de 3,5 cm de diâmetro;

6.3.10 – Solução de cloreto de sódio 0,9%:

Cloreto de sódio (PM 58,44) 0,9 g

Água desionizada 100 mL

Esterilizar por autoclavagem a 121 °C durante 30 min.

6.3.11 – Meio de congelamento com dimetilsulfóxido (DMSO).

- a) soro fetal bovino - 95% v/v;
- b) DMSO - 5% v/v.

6.3.12 – Meio de congelamento com glicerol.

MEM 1 X concentrado suplementado com:

- a) soro fetal bovino – 20% v/v;
- b) glicerol – 10% v/v;
- c) sulfato de estreptomicina – 100 µg / mL;
- d) penicilina G potássica – 100 UI / mL;
- e) L – glutamina – 2 mM.

6.4– Lavagens do Material

6.4.1 – Lavar adequadamente toda a vidraria e material cirúrgico (tesouras e pinças) empregados na execução do ensaio.

6.4.2- Secar o material em estufa a 50 °C de um dia para o outro.

6.5– Preparação e esterilização do material

6.5.1 – Todos os materiais, soluções, vidraria, pinças, tesouras e plásticos utilizados nos ensaios de toxicidade in vitro devem ser estéreis.

6.5.2 – Preparação do material para a esterilização

- a) Examinar minuciosamente a vidraria;
- b) Colocar papel de alumínio no gargalo das garrafas, béquers, erlenmeyers,
- c) Examinar minuciosamente a vidraria;
- d) Colocar papel de alumínio no gargalo das garrafas, béquers, erlenmeyers, etc.;

- e) Embrulhar as pinças e tesouras com papel de alumínio;
- f) Colocar o papel Kraft sobre a folha dupla de alumínio;
- g) Amarrar firmemente com o barbante;
- h) Tamponar as pipetas com algodão e colocá-las em cilindros de vidro com estopa de gaze;
- i) Cobrir a estopa com papel de alumínio, colocar por cima o papel Kraft e amarrar firmemente com o barbante;
- j) Esterilizar o material em autoclave por 121 °C por 40 minutos ou em forno Pasteur a 170 °C por 2 horas, quando for o caso;
- k) Esterilizar o material cirúrgico com álcool a 70% e lâmpada U.V. por aproximadamente 30 minutos.

6.5.3 – Procedimentos com células L 929

6.5.3.1 – Considerações gerais

- a) Efetuar todas as operações com células, preparação e transferência de meios e soluções em fluxo laminar vertical empregando-se material estéril;
- b) Pipetar todas as soluções e suspensões contendo células com pipetador automático;
- c) Aquecer os meios e soluções em banho-maria a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes do uso com as células;
- d) Descartar as soluções em recipientes estéreis no interior de fluxo laminar.

6.5.3.2 – Manutenção das células

Manter as células L929 em meio de cultura essencial mínimo completo (ver 6.3.8) em estufa umidificada, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ com $5 \pm 1\%$ de CO_2 em ar, em garrafas de

cultura de vidro ou de plástico com áreas superficiais de 25 cm² ou de 75 cm².

6.5.3.3 – Tripsinização das culturas celulares

- a) Remover o meio de cultura da garrafa;
- b) Lavar a monocamada celular uma vez com 5 mL ou 10 mL de meio MEM 1X concentrado sem soro fetal bovino dependendo da área superficial da garrafa de cultura (25 cm² ou 75 cm²);
- c) Remover o meio;
- d) Tratar as células com 2 mL ou 4 mL de solução de tripsina com EDTA (ver 6.3.5) em garrafas com 25 cm² e com 75 cm² de área superficial, respectivamente;
- e) Observar a monocamada celular ao microscópio invertido;
- f) Remover o meio de cultura da garrafa;
- g) Lavar a monocamada celular uma vez com 5 mL ou 10 mL de meio MEM 1X concentrado sem soro fetal bovino dependendo da área superficial da garrafa de cultura (25 cm² ou 75 cm²);
- h) Remover o meio;
- i) Tratar as células com 2 mL ou 4 mL de solução de tripsina com EDTA em garrafas com 25 cm² e com 75 cm² de área superficial, respectivamente;
- j) Observar a monocamada celular ao microscópio invertido;
- k) Aguardar o arredondamento total das células;
- l) Remover a solução de tripsina;
- m) Desprender as células da superfície após leve batida na garrafa;
- n) Após o desprendimento, adicionar com pipeta, 10 mL de MEM completo às garrafas;
- o) Suspender as células da garrafa no meio de cultura, lavando suavemente com pipeta a superfície da monocamada celular cinco a dez vezes até se obter uma suspensão de células bem individualizadas;

- p) Obter uma suspensão celular bem homogênea sem a presença de grumos;
- q) Medir a concentração celular da suspensão obtida, empregando câmara de Neubauer (ver 6.5.4.4);
- r) Para o ensaio de citotoxicidade, ajustar a concentração da suspensão celular para 1×10^5 células/1 mL empregando MEM completo.

6.5.3.4 – Contagem de células

- a) Fixar uma lamínula na câmara de Neubauer, que apresenta oito quadrados laterais, um quadrado central, todos de 1 mm, e profundidade de 0,1 mm;
- b) Transferir uma gota da suspensão celular para um dos lados da câmara, evitando-se o transbordamento e certificando-se de que todo o líquido se difundiu por capilaridade sob a lamínula;
- c) Observar as células ao microscópio a um aumento de 20X ou 40X;
- d) Contar todas as células dos quatro quadrados laterais;
- e) Excluir da contagem as células que se encontram nas linhas de baixo e da direita do perímetro de cada quadrado, incluir, porém, as que se acham nas linhas de cima e da esquerda;
- f) Repetir todo o procedimento de homogeneização para a dispersão das células quando grumos ocorrerem em percentual superior a 10%;
- g) Considerar como número ideal para a contagem, um mínimo de 40 e um máximo de 200 células observadas nos 4 quadrados (10 a 50 células por quadrado);
- h) Determinar a concentração celular por mL multiplicando-se pelo fator 10^4 o número médio de células por quadrado;
- i) Caso as células tenham sido diluídas ou concentradas antes da contagem, usar esses fatores para calcular a concentração de células na suspensão original.

6.5.3.5 – Congelamento das células

- a) Preparar meio de congelamento com o agente crioprotetor dimetilsulfóxido - DMSO ou com glicerol;
- b) Tripsinizar a cultura celular;
- c) Medir a concentração da suspensão celular obtida, empregando câmara de Neubauer;
- d) Centrifugar a suspensão a 1000 rpm durante 10 min;
- e) Remover o sobrenadante;
- f) Soltar o “pellet” do fundo do tubo de centrifugação através de leve batida na parede do tubo;
- g) Ressuspender as células no meio de congelamento a uma concentração de cerca de 1×10^6 de células/1 mL;
- h) Adicionar alíquotas de 1 mL ou de 1,8 mL em frascos criogênicos plásticos;
- i) Colocar os frascos em orifícios no interior de caixa de isopor apropriada;
- j) Colocar a caixa de isopor em freezer a -70°C ;
- k) Cerca de vinte e quatro horas após o congelamento, remover os frascos da caixa de isopor;
- l) Transferir os frascos para o reservatório de nitrogênio líquido para estocagem permanente.

6.5.3.6 – Descongelamento das células

- a) Remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;
- b) Para descongelar as células, colocar o frasco em banho-maria a 37°C com constante agitação até o descongelamento da suspensão celular;
- c) Transferir o conteúdo do frasco com pipeta Pasteur para garrafa de cultura plástica de 25 cm^2 com 5 mL de MEM completo;
- d) Homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;

- e) Incubar em estufa umidificada, a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂;
- f) Vinte e quatro horas após o descongelamento, remover o meio de cultura com DMSO e substituí-lo por 5 mL de MEM completo; no caso de glicerol como agente crioprotetor, remover o meio de cultura quarenta e oito horas após o descongelamento substituindo-o por 5 mL de MEM completo (ver 6.3.6);
- g) Realizar pelo menos dois subcultivos após o descongelamento antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.
- h) Remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;

7. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

7.1 – Princípios do ensaio

A camada de ágar protege as células do dano mecânico durante a colocação da amostra e permite difusão de substâncias químicas que migram das amostras de polímeros.

7.2 – Execução do ensaio

7.2.1 – Preparação das culturas celulares

- a) Preparar suspensão contendo 1×10^5 a $1,5 \times 10^5$ células por mL em meio MEM completo;
- b) Colocar 4 mL da suspensão celular em cada orifício da placa;
- c) Preparar culturas em duplicata para a Amostra, Controle Celular, Controle Negativo, Controle Positivo e Branco, quando for o caso;
- d) Incubar as culturas em estufa a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂ por pelo menos 24 horas.

7.2.2 – Aplicação da amostra

- a) Quarenta e oito horas após o estabelecimento das culturas, utilizar para o ensaio aquelas que apresentarem uma monocamada celular uniforme e próxima a confluência (confluência superior a 80%);
- b) Aspirar com pipeta o meio de cultura das placas;
- c) Lavar a monocamada de cada orifício da placa com 2 mL de solução PBS;
- d) Aspirar com pipeta a solução PBS das placas;
- e) Adicionar por placa, 1 mL de meio de cobertura, tendo-se o cuidado de não esgotar a pipeta para não formar bolhas;
- f) Deixar o ágar solidificar à temperatura ambiente (no máximo de 30°C) no mínimo de 10 minutos.
- g) Colocar em contato com a superfície solidificada do ágar, no centro de cada placa, com o auxílio de uma pinça: a Amostra a ser testada ou os papéis de filtro embebidos nos extratos obtidos do respectivo material e do Branco; o Controle Negativo e o Controle Positivo;
- h) Efetuar o procedimento acima em culturas em duplicata; aguardar o total endurecimento do meio, tendo-se o cuidado de proteger as placas da luz ambiente;
- i) Incubar as placas na posição invertida, embrulhadas em folha de papel de alumínio, por pelo menos 24 horas em estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, umidificada e com $5 \pm 1\%$ de CO_2 .

7.2.3 – Avaliação da citotoxicidade

Vinte e quatro horas após a aplicação da Amostra avaliar o grau de citotoxicidade:

- a) observar microscopicamente a morfologia e a coloração das células sob e ao redor da Amostra-teste e dos Controles;

b) medir macroscopicamente a extensão da área descorada (células mortas) a partir das amostras nos 4 diferentes quadrantes;

c) calcular o valor médio dos valores dos 4 diferentes quadrantes;

d) Relacionar nos Formulários de Resultados, os valores médios obtidos para cada Amostra e Controles com os limites especificados para os diferentes graus de citotoxicidade indicados na Tabela I.

Notas:

a) O grau de citotoxicidade é quantificado numa escala de 0 a 4 (ver Tabela I);

b) O corante vital vermelho neutro adicionado ao meio de cobertura é captado rapidamente pelas células vivas, armazenado em lisossomos corando as células em vermelho;

Testar a validade do ensaio a partir das respostas das células ao tratamento pelo Controle Negativo e pelo Controle Positivo.

O Controle Negativo deve mostrar ausência de reação citotóxica (grau 0);

O Controle Positivo deve mostrar uma nítida reação citotóxica (igual ou superior ao grau 3).

Notas:

a) preenchidas as condições acima, medir a resposta para a Amostra-teste;

b) Caso não seja confirmada a validade do ensaio: repetir o teste.

c) durante o processo de necrose, as células coradas liberam o corante produzindo regiões com células mortas descoradas.

7.2.4 – Interpretação dos Resultados

A amostra é considerada satisfatória se nenhuma cultura exposta à Amostra-teste mostrar citotoxicidade superior ao grau 2 (citotoxicidade branda).

Tabela I – Graus de Citotoxicidade para o Ensaio de Difusão em Ágar

GRAU	CITOTOXICIDADE	DESCRIÇÃO DA ZONA DE CITOTOXICIDADE
0	Ausência	Ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra.
1	Leve	Zona de descoramento limitada a área sob a amostra.
2	Branda	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,45 cm.
3	Moderada	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra compreendido entre 0,45 cm a 1,0 cm.
4	Severa	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira.

8. BIBLIOGRAFIA:

- BIOLOGICAL REACTIVITY TEST, in vitro. The United States Pharmacopeial CONVENTION 40 ed. Rockville: U.S.Pharmacopeial, 87. Biological Reactivity Test, in vitro.2017.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological Evaluation of Medical Devices: Part 5: Test for Cytotoxicity, ISO 10.993-5. Geneve, 7p.2013.
- PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO. Ensaio de Citotoxicidade in vitro – Método de Difusão em Ágar. In Manual da Qualidade nº 65.3330.010, Rio de Janeiro. INCQS/FIOCRUZ. Revisão: 14. Ano 2016.

9.2. MANUAL TÉCNICO LABORATORIAL PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO – MÉTODO DE CONTATO DIRETO BASEADO NA FARMACOPEIA AMERICANA (USP)

SUMÁRIO

- 1. Objetivo**
- 2. Campo de aplicação**
- 3. Histórico**
- 4. Definições**

5. Siglas

6. Condições gerais

7. Condições específicas

8. Bibliografia

1. OBJETIVO

O Manual Técnico tem por finalidade a descrição dos procedimentos experimentais a serem adotados na execução do ensaio de citotoxicidade “*in vitro*” em células de mamífero, empregando o método contato direto.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

2.1. Este Manual Técnico aplica-se à avaliação de segurança de materiais plásticos, elastômeros e de outros polímeros empregados na fabricação de dispositivos e acessórios de uso médico e hospitalar em contato direto ou indireto com o tecido humano, tais como:

- a) bolsas para sangue;
- b) frascos para soluções parenterais;
- c) equipos para administração de soluções;
- d) cateteres intravenosos;
- e) implantes de próteses mamárias;
- f) válvulas cardíacas;
- g) enxertos vasculares;
- h) equipos para transfusão e infusão;
- i) elásticos de fraldas descartáveis.

3. HISTÓRICO

A partir da 22ª Revisão da Farmacopeia Americana, o ensaio de contato direto foi introduzido como teste de reatividade biológica “*in vitro*” para a avaliação de segurança de materiais plásticos de uso médico.

4. DEFINIÇÕES

Para efeito deste Manual Técnico, são adotadas as seguintes definições:

4.1 – Amostra

Produto a ser testado ou um extrato preparado do mesmo.

4.2 – Biocompatibilidade

Aceitação pelo organismo de material implantado ou em contato com o tecido vivo.

4.3 – Controle Celular

Cultura celular sem tratamento

4.4 – Controle Negativo

4.4.1 – Material Padrão de Referência USP biologicamente não reativo de acordo com as condições do ensaio.

4.4.2 – Papel de filtro Whatman n.º 1.

4.5 – Controle Positivo

Látex para garrote biologicamente reativo.

4.6 – Elastômero

Polímero com propriedades físicas parecidas com as da borracha.

5. SIGLAS

USP - Farmacopeia dos Estados Unidos da América (United States Pharmacopeia)

MEM - Meio de Cultura Essencial Mínimo (Minimum Essential Medium)

PBS - Solução salina tamponada de fosfato (Phosphate Buffered Saline)

6. CONDIÇÕES GERAIS

6.1– Equipamentos e outros Itens

- a) Agitador magnético;
- b) Autoclave;
- c) Balança analítica;
- d) Banho-maria;

- e) Bico de Bunsen;
- f) Câmara de Neubauer;
- g) Caixa de isopor;
- h) Estufa de CO₂;
- i) Estufa de secagem;
- j) Fluxo laminar vertical;
- k) Forno;
- l) Frasco de cultura de plástico ou de vidro;
- m) Frascos criogênicos plásticos (1 mL e 2 mL);
- n) Microscópio invertido;
- o) Papel de alumínio;
- p) Papel de filtro Whatman n.^o 1;
- q) Paquímetro ou régua milimetrada;
- r) Pinças cirúrgicas;
- s) Pipetador automático;
- t) Pipetas Pasteur;
- u) Pipetas sorológicas (1mL,5mL e 10 mL);
- v) Placas plásticas (3,5cm de diâmetro);
- w) Potenciômetro;
- x) Termômetro;
- y) Tesoura;
- z) Unidade de filtração (1000 mL);
- aa) Vidraria em geral (erlenmeyer, béquer e proveta).

6.2. Insumos e soluções

- a) células L929 (fibroblastos de camundongo);
- b) solução tampão de fosfato PBS;
- c) solução de L-glutamina 200 mM;
- d) soro fetal bovino;
- e) solução antibiótica de Penicilina 10^4 UI/mL e Estreptomicina 10^4 μ g/mL ;
- f) solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%;
- g) MEM 1 x concentrado;
- h) MEM completo 1 x concentrado;
- i) solução de cloreto de sódio 0,9 %;
- j) meio de congelamento com dimetilsulfóxido;
- k) meio de congelamento com glicerol;
- m) Controle Negativo: Padrão de Referência USP e papel de filtro Whatman n.^o 1;
- n) Controle Positivo: látex para garrote.

6.3 – Preparação de soluções

6.3.1 - Solução PBS:

Cloreto de sódio (PM 58,44)	32,0 g
Cloreto de potássio (PM 74,55)	0,8 g
Fosfato de sódio dibásico (PM 141,96)	4,6 g
Fosfato de potássio monobásico (PM 136,09)	0,8 g
Água desionizada	4,0 L

- a) dissolver com agitação magnética;
- b) ajustar o pH a 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1 N;
- c) esterilizar por autoclavação durante 30 min.

6.3.2 – Solução de L-glutamina (200 mM):

L - Glutamina (PM146,15) - 2,92 g

Água desionizada - 100 mL

- a) dissolver com agitação magnética;
- b) esterilizar por filtração (membrana de 0,22 μm).

Nota:

Adição 1% v/v ao meio MEM 1 X concentrado.

6.3.3 – Solução antibiótica de Penicilina e Estreptomicina:

6.3.3.1 – Solução A - Penicilina G Potássica 2×10^4 UI/mL.

Penicilina 5×10^6 UI

Água desionizada estéril 250 mL

6.3.3.2 – Solução B - Sulfato de Estreptomicina 2×10^4 μg /mL.

Sulfato de estreptomicina 5g

Água desionizada estéril 250 mL

6.3.3.3 – Solução de Penicilina (10^4 UI/mL) e estreptomicina (10^4 μ g/mL).

Solução A 250mL

Solução B 250mL

Nota:

Adição 1% v/v ao meio MEM 1 X concentrado.

6.3.4 – Solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%

6.3.4.1 – Solução A - Tripsina 0,25%

Tripsina (Difco 1:250) 1,25g

Solução PBS 500 mL

- a) dissolver com agitação magnética durante 1 hora à temperatura ambiente;
- b) filtrar com papel de filtro (Whatman n.^o 1);
- c) esterilizar por filtração (membrana de 0,22 μ m).

6.3.4.2 – Solução B - EDTA 0,05%

EDTA (Verseno) - 0,25g

Solução PBS - 500mL

- a) dissolver com agitação magnética;
- b) esterilizar por autoclavação.

6.3.4.3 – Solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%

Solução A- 500 mL

Solução B- 500 mL

6.3.5– MEM 1 X concentrado com sais de Earle - Sigma M 0268

a) para cada 9,6 de pó equivalente a 1 litro de meio: adicionar 900 mL de água desionizada;

b) dissolver empregando agitação magnética;

c) adicionar 2,2 g de bicarbonato de sódio para cada litro de volume final do meio a ser obtido;

d) agitar até completa dissolução da mistura;

e) ajustar o pH do meio na faixa de 7,2 a 7,3 (0,1 a 0,2 unidades abaixo do pH desejado de 7,4) usando ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;

f) adicionar água desionizada restante para completar o volume de 1 litro;

g) esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 μm).

6.3.6 – MEM completo 1 X concentrado.

MEM 1 X concentrado suplementado com:

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| a) Soro fetal bovino | 5% v/v |
| b) Sulfato de estreptomicina | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| c) Penicilina G potássica | 100 UI/mL |
| d) L - glutamina | 2 mM |

6.3.7 – Solução de cloreto de sódio 0,9%:

Cloreto de sódio (PM 58,44) 0,9 g

Água desionizada 100 mL

Esterilizar por autoclavação a 121 °C durante 30 min.

6.3.8 – Meio de congelamento com dimetilsulfóxido (DMSO).

a) soro fetal bovino - 95% v/v;

b) DMSO - 5% v/v.

6.3.9 – Meio de congelamento com glicerol.

MEM 1 X concentrado suplementado com:

a) soro fetal bovino - 20% v/v;

b) glicerol - 10% v/v;

c) sulfato de estreptomicina - 100 µg / mL;

d) penicilina G potássica - 100 UI / mL;

e) L - glutamina - 2 mM.

6.4 – Lavagem do Material.

6.4.1 – Lavar adequadamente toda a vidraria e material cirúrgico (tesouras e pinças) empregados na execução do ensaio.

6.4.2 - Secar todo o material em estufa a 50 °C de um dia para o outro.

6.5 – Preparação e esterilização do material

6.5.1 – Todos os materiais, soluções, vidraria, pinças, tesouras e plásticos utilizados nos ensaios devem ser estéreis.

6.5.2 – Material necessário para a esterilização

- a) papel pardo (Kraft);
- b) barbante de algodão, sem cera;
- c) papel de alumínio comum;
- d) termômetro (200 °C);
- e) gaze;
- f) algodão;
- g) álcool comercial;
- h) cilindros de vidro para pipetas.

6.5.3 – Preparação do material para a esterilização

- a) examinar minuciosamente a vidraria;
- b) colocar papel de alumínio no gargalo das garrafas, béquers, erlenmeyers;
- c) examinar minuciosamente a vidraria;
- d) colocar papel de alumínio no gargalo das garrafas, béquers, erlenmeyers,
etc.;
- e) embrulhar as pinças e tesouras com papel de alumínio;
- f) colocar o papel Kraft sobre a folha dupla de alumínio;

g) amarrar firmemente com o barbante;

h) tamponar as pipetas com algodão e colocá-las em cilindros de vidro com estopa de gaze;

i) cobrir a estopa com papel de alumínio, colocar por cima o papel Kraft e amarrar firmemente com o barbante;

j) esterilizar o material em autoclave por 121°C por 40 minutos ou em forno Pasteur a 170°C por 2 horas, quando for o caso;

l) esterilizar o material cirúrgico com álcool a 70% e lâmpada U.V. por aproximadamente 30 minutos.

6.5.4 – Procedimentos com células L 929

6.5.4.1 - Considerações gerais

a) efetuar todas as operações com células, preparação e transferência de meios e soluções em fluxo laminar vertical empregando-se material estéril;

b) pipetar todas as soluções e suspensões contendo células com pipetador automático;

c) aquecer os meios e soluções em banho-maria a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes do uso com as células;

d) descartar as soluções em recipientes estéreis no interior de fluxo laminar.

6.5.4.2 - Manutenção das células

Manter as células L929 em meio de cultura essencial mínimo completo em estufa umidificada, a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com $5 \pm 1\%$ de CO_2 em garrafas de cultura de vidro ou de plástico com áreas superficiais de 25 cm^2 ou de 75 cm^2 .

6.5.4.3 - Tripsinização das culturas celulares

- a) remover o meio de cultura da garrafa;
- b) lavar a monocamada celular uma vez com 5 mL ou 10 mL de meio MEM 1X concentrado sem soro fetal bovino dependendo da área superficial da garrafa de cultura (25 cm² ou 75 cm²);
- c) remover o meio;
- d) tratar as células com 2 mL ou 4 mL de solução de tripsina com EDTA em garrafas com 25 cm² e com 75 cm² de área superficial, respectivamente;
- e) observar a monocamada celular ao microscópio invertido;
- f) aguardar o arredondamento total das células;
- g) remover a solução de tripsina;
- h) desprender as células da superfície após leve batida na garrafa;
- i) após o desprendimento, adicionar com pipeta, 10 mL de MEM completo às garrafas;
- j) suspender as células da garrafa no meio de cultura, lavando suavemente com pipeta a superfície da monocamada celular cinco a dez vezes até se obter uma suspensão de células bem individualizadas;
- k) obter uma suspensão celular bem homogênea sem a presença de grumos;
- l) medir a concentração celular da suspensão obtida, empregando câmara de Neubauer;
- m) para o ensaio de citotoxicidade, ajustar a concentração da suspensão celular para 1×10^5 células/1 mL empregando MEM completo.

6.5.4.4- Contagem de células

- a) fixar uma lamínula na câmara de Neubauer, que apresenta oito quadrados

laterais, um quadrado central, todos de 1 mm, e profundidade de 0,1 mm;

b) transferir uma gota da suspensão celular para um dos lados da câmara, evitando-se o transbordamento e certificando-se de que todo o líquido se difundiu por capilaridade sob a lamínula;

c) observar as células ao microscópio a um aumento de 20X ou 40X;

d) contar todas as células dos quatro quadrados laterais;

e) excluir da contagem as células que se encontram nas linhas de baixo e da direita do perímetro de cada quadrado, incluir, porém, as que se acham nas linhas de cima e da esquerda;

f) repetir todo o procedimento de homogeneização para a dispersão das células quando grumos ocorrerem em percentual superior a 10%;

g) considerar como número ideal para a contagem, um mínimo de 40 e um máximo de 200 células observadas nos 4 quadrados (10 a 50 células por quadrado);

h) determinar a concentração celular por mL multiplicando-se pelo fator 10^4 o número médio de células por quadrado;

i) caso as células tenham sido diluídas ou concentradas antes da contagem, usar esses fatores para calcular a concentração de células na suspensão original.

Notas:

a) células em concentrações na faixa de $5 \times 10^4/1$ mL a $1 \times 10^6/1$ mL podem ser contadas diretamente sem diluição ou concentração. Se a concentração celular, porém for maior do que $1 \times 10^6/1$ mL, diluir a suspensão na proporção de 1 para 5 ou de 1 para 10 com MEM ou com PBS para facilitar a contagem e produzir resultados mais precisos;

b) cada quadrado da câmara, com sua lamínula ajustada, representa um volume de $0,1 \text{ mm}^3$ ou seja 10^{-4} cm^3 , e 1 cm^3 equivalente a 1 mL.

6.5.4.5- Congelamento das células

- a) preparar meio de congelamento com o agente crioprotetor dimetilsulfóxido - DMSO ou com glicerol;
- b) tripsinizar a cultura celular;
- c) medir a concentração da suspensão celular obtida, empregando câmara de Neubauer;
- d) centrifugar a suspensão a 1000 rpm durante 10 min;
- e) remover o sobrenadante;
- f) soltar o “pellet” do fundo do tubo de centrifugação através de leve batida na parede do tubo;
- g) ressuspender as células no meio de congelamento a uma concentração de cerca de 1×10^6 de células/1 mL;
- h) adicionar alíquotas de 1 mL ou de 1,8 mL em frascos criogênicos plásticos;
- i) colocar os frascos em orifícios no interior de caixa de isopor apropriada;
- j) colocar a caixa de isopor em freezer a -70°C ;
- k) cerca de vinte e quatro horas após o congelamento, remover os frascos da caixa de isopor;
- l) transferir os frascos para o reservatório de nitrogênio líquido para estocagem permanente.

6.5.4.6- Descongelamento das células

- a) remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;
- b) para descongelar as células, colocar o frasco em banho-maria a 37°C com constante agitação até o descongelamento da suspensão celular;
- c) transferir o conteúdo do frasco com pipeta Pasteur para garrafa de cultura plástica de 25 cm^2 com 5 mL de MEM completo;
- d) homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;

e) incubar em estufa umidificada, a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂;

f) vinte e quatro horas após o descongelamento, remover o meio de cultura com DMSO e substituí-lo por 5 mL de MEM completo; no caso de glicerol como agente crioprotetor, remover o meio de cultura quarenta e oito horas após o descongelamento substituindo-o por 5 mL de MEM completo;

g) realizar pelo menos dois subcultivos após o descongelamento antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.

7. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

7.1 – Preparação das Amostras

7.1.1 – Empregar amostra com área de aproximadamente $1,0 \text{ cm}^2$ em placa com 3,5 cm de diâmetro.

7.1.2 – Usar discos de papel de filtro Whatman obtidos pela perfuração através de furadeira de papel, embebidos com extratos obtidos da Amostra.

7.2– Aplicações da amostra

a) vinte e quatro horas após o estabelecimento das culturas, utilizar para o ensaio aquelas que apresentarem uma monocamada celular uniforme e próxima a confluência (confluência superior a 80%);

b) aspirar com pipeta o meio de cultura das placas;

c) lavar a monocamada de cada orifício da placa com 2 mL de solução PBS;

d) aspirar com pipeta a solução PBS das placas;

e) adicionar por placa, 0,8 mL de meio de cultura;

f) colocar em contato com as células, no centro de cada placa, com o auxílio de uma pinça: a Amostra a ser testada ou os papéis de filtro embebidos nos extratos obtidos do respectivo material, o Controle Negativo e o Controle Positivo;

g) efetuar o procedimento acima em culturas em duplicata;

h) incubar as placas por pelo menos 24 horas em estufa a $37 \pm 1^\circ\text{C}$,

umidificada com $5 \pm 1\%$ de CO_2 ;

i) Vinte e quatro horas após a incubação, corar as placas com vermelho neutro a 0.01% em solução aquosa.

7.2.1 – Avaliação da citotoxicidade

Vinte e quatro horas após a aplicação e coloração da Amostra avaliar o grau de citotoxicidade:

a) observar microscopicamente a morfologia e a coloração das células sob e ao redor da Amostra-teste e dos Controles;

b) medir macroscopicamente a extensão da área descorada (células mortas) a partir das amostras nos 4 diferentes quadrantes;

c) calcular o valor médio dos valores dos 4 diferentes quadrantes;

d) relacionar os valores médios obtidos para cada Amostra e Controles com os limites especificados para os diferentes graus de citotoxicidade indicados na Tabela I.

Notas:

a) o grau de citotoxicidade é quantificado numa escala de 0 a 4 (ver Tabela D);

7.2.2 – Determinação da validade do ensaio

Testar a validade do ensaio a partir das respostas das células ao tratamento pelo Controle Negativo e pelo Controle Positivo.

a) o grau de citotoxicidade é quantificado numa escala de 0 a 4 (ver Tabela D);

7.2.3 – Interpretação dos Resultados

- a) o Controle Negativo deve mostrar ausência de reação citotóxica;
- b) o Controle Positivo deve mostrar uma nítida reação citotóxica.

Tabela I – Graus de Citotoxicidade para o Ensaio de Contato Direto

GRAU	CITOTOXICIDADE	DESCRIÇÃO DA ZONA DE CITOTOXICIDADE
0	Ausência	Ausência de descoramento ao redor ou sob a amostra.
1	Leve	Zona de descoramento limitada a área sob a amostra.
2	Branda	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra menor que 0,45 cm.
3	Moderada	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra compreendido entre 0,45 cm a 1,0 cm.
4	Severa	Tamanho da zona de descoramento a partir da amostra maior que 1,0 cm, porém não envolvendo a placa inteira.

8. BIBLIOGRAFIA:

- BIOLOGICAL REACTIVITY TEST, in vitro. The United States Pharmacopeial CONVENTION 40 ed. Rockville: U.S.Pharmacopeial, 40. Biological Reactivity Test, in vitro.2017.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological Evaluation of Medical Devices: Part 5: Test for Cytotoxicity, ISO 10.993-5. Geneve, 7p.2013.

9.3. MANUAL TÉCNICO LABORATORIAL PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO – MÉTODO DE ELUIÇÃO BASEADO NA FARMACOPEIA AMERICANA (USP)

SUMÁRIO

- 1. Objetivo**
- 2. Campo de aplicação**
- 3. Histórico**
- 4. Definições**
- 5. Siglas**
- 6. Condições gerais**
- 7. Condições específicas**
- 8. Bibliografia**

1. OBJETIVO

O Manual Técnico tem por finalidade a descrição dos procedimentos experimentais a serem adotados na execução do ensaio de citotoxicidade “in vitro” em células de fibroblastos de camundongo L929, empregando o método de eluição.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

2.1. Este Manual técnico aplica-se à avaliação de segurança de materiais plásticos, elastômeros e de outros polímeros empregados na fabricação de dispositivos e acessórios de uso médico e hospitalar em contato direto ou indireto com o tecido humano, tais como:

- a) bolsas para sangue;
- b) frascos para soluções parenterais;
- c) equipos para administração de soluções;

- d) cateteres intravenosos;
- e) implantes de próteses mamários;
- f) tubos e acessórios para oxigenador corporal;
- g) tubos e acessórios para dialisador;
- h) válvulas cardíacas;
- l) enxertos vasculares;
- j) equipos para transfusão e infusão;
- l) elásticos de fraldas descartáveis.

3. HISTÓRICO.

A partir da 22ª Revisão da Farmacopeia Americana, o ensaio de contato direto foi introduzido como teste de reatividade biológica “in vitro” para a avaliação de segurança de materiais plásticos de uso médico.

4. DEFINIÇÕES

Para efeito deste Manual, são adotadas as seguintes definições:

4.1 – Amostra

Produto a ser testado ou um extrato preparado do mesmo.

4.2 – Biocompatibilidade

Aceitação pelo organismo de material implantado ou em contato com o tecido vivo.

4.3 – Controles Celulares

Cultura celular sem tratamento

4.4 – Controles Negativos

4.4.1 – Material Padrão de Referência USP biologicamente não reativo de

acordo com as condições do ensaio.

4.4.2 – Papel de filtro Whatman n.º 1.

4.5 – Controles Positivos

Látex para garrote biologicamente reativo.

4.6 – Elastômero

Polímero com propriedades físicas parecidas com as da borracha.

4.7 – Plástico

Material polimérico de alto peso molecular.

4.8 – Polímero

Composto orgânico de alto peso molecular, natural ou sintético constituído pela união de moléculas simples chamadas de monômeros. Alguns polímeros são elastômeros e outros são plásticos.

5. SIGLAS

São usadas no texto deste m Manual Técnico as seguintes siglas:

USP - Farmacopéia dos Estados Unidos da América (United States Pharmacopeia)

MEM - Meio de Cultura Essencial Mínimo (Minimum Essential Medium)

PBS - Solução salina tamponada de fosfato (Phosphate Buffered Saline)

6. CONDIÇÕES GERAIS

6.1– Equipamentos e outros Itens

- a) Agitador magnético;
- b) Autoclave
- c) Balança analítica;
- d) Banho-maria;
- e) Bico de Bunsen;
- f) Câmara de Neubauer;
- g) Caixa de isopor;
- h) Estufa de CO₂;
- i) Estufa de secagem;
- j) Fluxo laminar vertical;
- k) Forno;
- l) Frasco de cultura de plástico ou de vidro;
- m) Frascos criogênicos plásticos (1 mL e 2 mL);
- n) Microscópio invertido;
- o) Papel de alumínio;
- p) Papel de filtro Whatman n.º 1;
- q) Paquímetro ou régua milimétrica;
- r) Pinças cirúrgicas;
- s) Pipetador automático;
- t) Pipetas Pasteur;
- u) Pipetas sorológicas (1ml,5mL e 10 mL);
- v) Placas plásticas (3,5cm de diâmetro);
- w) Potenciômetro;
- x) Termômetro;
- y) Tesoura;
- z) Unidade de filtração (1000 mL);
- aa) Vidraria em geral (erlenmeyer, béquer e proveta).

6.2– Insumos e soluções

- a) células L929 (fibroblastos de camundongo);
- b) solução tampão de fosfato PBS;
- c) solução de L-glutamina 200 mM;

- d) soro fetal bovino;
- e) solução antibiótica de Penicilina 10^4 UI/mL e Estreptomicina 10^4 μ g/mL;
- f) solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%;
- g) MEM 1 x concentrado;
- h) MEM completo 1 x concentrado;
- i) solução de cloreto de sódio 0,9 %;
- j) meio de congelamento com dimetilsulfóxido;
- l) meio de congelamento com glicerol;
- m) Controle Negativo: Padrão de Referência USP e papel de filtro Whatman n.^o 1;
- n) Controle Positivo: látex para garrote.

6.3 – Preparações de soluções

6.3.1 - Solução PBS:

Cloreto de sódio (PM 58,44)	32,0 g
Cloreto de potássio (PM 74,55)	0,8 g
Fosfato de sódio dibásico (PM 141,96)	4,6 g
Fosfato de potássio monobásico (PM 136,09)	0,8 g
Água desionizada	4,0 L

- a) dissolver com agitação magnética;
- b) ajustar o pH a 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1 N;

c) esterilizar por autoclavação durante 30 min.

6.3.2 – Solução de L-glutamina (200 mM):

L - glutamina (PM-146,15) - 2,92 g

Água desionizada - 100 mL

a) dissolver com agitação magnética;

b) esterilizar por filtração (membrana de 0,22 μm).

Nota:

Adição 1% v/v ao meio MEM 1 X concentrado.

6.3.3 – Solução antibiótica de Penicilina e Estreptomicina:

6.3.3.1 – Solução A - Penicilina G Potássica 2×10^4 UI/mL.

Penicilina 5×10^6 UI

Água desionizada estéril 250 mL

6.3.3.2 – Solução B - Sulfato de Estreptomicina 2×10^4 μg /mL.

Sulfato de estreptomicina 5g

Água desionizada estéril 250 mL

6.3.3.3 – Solução de Penicilina (10^4 UI/mL) e estreptomicina (10^4 μ g/mL).

Solução A 250mL

Solução B 250mL

Nota:

Adição 1% v/v ao meio MEM 1 X concentrado.

6.3.4 – Solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%

6.3.4.1 – Solução A - Tripsina 0,25%

Tripsina (Difco 1:250) 1,25g

Solução PBS 500 mL

- a) dissolver com agitação magnética durante 1 hora à temperatura ambiente;
- b) filtrar com papel de filtro (Whatman n.^o 1);
- c) esterilizar por filtração (membrana de 0,22 μ m).

6.3.4.2 – Solução B - EDTA 0,05%

EDTA (Verseno) - 0,25g

Solução PBS - 500mL

- a) dissolver com agitação magnética;
- b) esterilizar por autoclavação.

6.3.4.3 – Solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%

Solução A- 500 mL

Solução B- 500 mL

6.3.5– MEM 1 X concentrado com sais de Earle - Sigma M 0268

- a) para cada 9,6 de pó equivalente a 1 litro de meio: adicionar 900
- b) dissolver empregando agitação magnética;
- c) adicionar 2,2 g de bicarbonato de sódio para cada litro de volume final do meio a ser obtido;
- d) agitar até completa dissolução da mistura;
- e) ajustar o pH do meio na faixa de 7,2 a 7,3 (0,1 a 0,2 unidades abaixo do pH desejado de 7,4) usando ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;
- f) adicionar água desionizada restante para completar o volume de 1 litro;
- g) esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 μm).

6.3.6 – MEM completo 1 X concentrado

MEM 1 X concentrado suplementado com:

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| a) Soro fetal bovino | 5% v/v |
| b) Sulfato de estreptomicina | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| c) Penicilina G potássica | 100 UI/mL |
| d) L - glutamina | 2 mM |

6.3.7 – Solução de cloreto de sódio 0,9%:

Cloreto de sódio (PM 58,44) 0,9 g

Água desionizada 100 mL

Esterilizar por autoclavação a 121 °C durante 30 min.

6.3.8 – Meio de congelamento com dimetilsulfóxido (DMSO).

a) soro fetal bovino - 95% v/v;

b) DMSO - 5% v/v

6.3.9 – Meio de congelamento com glicerol.

MEM 1 X concentrado suplementado com:

a) soro fetal bovino - 20% v/v;

b) glicerol - 10% v/v;

c) sulfato de estreptomicina - 100 µg / mL;

d) penicilina G potássica - 100 UI / mL;

e) L - glutamina - 2 mM.

6.4 – Lavagem do Material

6.4.1 – Lavar adequadamente toda a vidraria e material cirúrgico (tesouras e pinças) empregados na execução do ensaio.

6.4.2 - Secar todo o material em estufa a 50 °C de um dia para o outro.

6.5 – Preparação e esterilização do material

6.5.1 – Todos os materiais, soluções, vidraria, pinças, tesouras e plásticos utilizados nos ensaios devem ser estéreis.

6.5.2– Material necessário para a esterilização

- a) papel pardo (Kraft);
- b) barbante de algodão, sem cera;
- c) papel de alumínio comum;
- d) termômetro (200 °C);
- e) gaze;
- f) algodão;
- g) álcool comercial;
- h) cilindros de vidro para pipetas.

6.5.3– Preparação do material para a esterilização

- a) examinar minuciosamente a vidraria;
- b) colocar papel de alumínio no gargalo das garrafas, béquers, erlenmeyers; c) examinar minuciosamente a vidraria;
- c) colocar papel de alumínio no gargalo das garrafas, béquers, erlenmeyers, etc.;
- d) embrulhar as pinças e tesouras com papel de alumínio;
- e) colocar o papel Kraft sobre a folha dupla de alumínio;
- f) amarrar firmemente com o barbante;

g) tamponar as pipetas com algodão e colocá-las em cilindros de vidro com estopa de gaze;

h) cobrir a estopa com papel de alumínio, colocar por cima o papel Kraft e amarrar firmemente com o barbante;

i) esterilizar o material em autoclave por 121 °C por 40 minutos ou em forno Pasteur a 170 °C por 2 horas, quando for o caso;

j) esterilizar o material cirúrgico com álcool a 70% e lâmpada U.V. por aproximadamente 30 minutos.

6.5.4– Procedimentos com células L 929

6.5.4.1– Considerações gerais

a) efetuar todas as operações com células, preparação e transferência de meios e soluções em fluxo laminar vertical empregando-se material estéril;

b) pipetar todas as soluções e suspensões contendo células com pipetador automático;

c) aquecer os meios e soluções em banho-maria a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ antes do uso com as células;

d) descartar as soluções em recipientes estéreis no interior de fluxo laminar.

6.5.4.2 – Manutenção das células

Manter as células L929 em meio de cultura essencial mínimo completo em

estufa umidificada, a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂ em garrafas de cultura de vidro ou de plástico com áreas superficiais de 25 cm² ou de 75 cm².

6.5.4.3- Tripsinização das culturas celulares

- a) remover o meio de cultura da garrafa;
- b) lavar a monocamada celular uma vez com 5 mL ou 10 mL de meio MEM 1X concentrado sem soro fetal bovino dependendo da área superficial da garrafa de cultura (25 cm² ou 75 cm²);
- c) remover o meio;
- d) tratar as células com 2 mL ou 4 mL de solução de tripsina com EDTA em garrafas com 25 cm² e com 75 cm² de área superficial, respectivamente;
- e) observar a monocamada celular ao microscópio invertido;
- f) aguardar o arredondamento total das células;
- g) remover a solução de tripsina;
- h) desprender as células da superfície após leve batida na garrafa;
- i) após o desprendimento, adicionar com pipeta, 10 mL de MEM completo às garrafas;
- j) suspender as células da garrafa no meio de cultura, lavando suavemente com pipeta a superfície da monocamada celular cinco a dez vezes até se obter uma suspensão de células bem individualizadas;
- l) obter uma suspensão celular bem homogênea sem a presença de grumos;
- m) medir a concentração celular da suspensão obtida, empregando câmara de Neubauer (ver 6.5.4.4);
- n) para o ensaio de citotoxicidade, ajustar a concentração da suspensão celular para 1×10^5 células/1mL empregando MEM completo.

6.5.4.4- Contagem de células

- a) fixar uma lamínula na câmara de Neubauer, que apresenta oito quadrados laterais, um quadrado central, todos de 1 mm, e profundidade de 0,1 mm;
- b) transferir uma gota da suspensão celular para um dos lados da câmara, evitando-se o transbordamento e certificando-se de que todo o líquido se difundiu por capilaridade sob a lamínula;
- c) observar as células ao microscópio a um aumento de 20X ou 40X;
- d) contar todas as células dos quatro quadrados laterais;
- e) excluir da contagem as células que se encontram nas linhas de baixo e da direita do perímetro de cada quadrado, incluir, porém, as que se acham nas linhas de cima e da esquerda;
- f) repetir todo o procedimento de homogeneização para a dispersão das células quando grumos ocorrerem em percentual superior a 10%;
- g) considerar como número ideal para a contagem, um mínimo de 40 e um máximo de 200 células observadas nos 4 quadrados (10 a 50 células por quadrado);
- h) determinar a concentração celular por mL multiplicando-se pelo fator 10^4 o número médio de células por quadrado;
- i) caso as células tenham sido diluídas ou concentradas antes da contagem, usar esses fatores para calcular a concentração de células na suspensão original.

Notas:

- a) células em concentrações na faixa de $5 \times 10^4/1$ mL a $1 \times 10^6/1$ mL podem ser contadas diretamente sem diluição ou concentração. Se a concentração celular, porém for maior do que $1 \times 10^6/1$ mL, diluir a suspensão na proporção de 1 para 5 ou de 1 para 10 com MEM ou com PBS para facilitar a contagem e produzir resultados mais precisos;
- b) cada quadrado da câmara, com sua lamínula ajustada, representa um volume de $0,1 \text{ mm}^3$ ou seja 10^{-4} cm^3 , e 1 cm^3 equivalente a 1 mL.

6.5.4.5. Congelamento das células

- a) preparar meio de congelamento com o agente crioprotetor dimetilsulfóxido - DMSO ou com glicerol;
- b) tripsinizar a cultura celular;
- c) medir a concentração da suspensão celular obtida, empregando câmara de Neubauer;
- d) centrifugar a suspensão a 1000 rpm durante 10 min;
- e) remover o sobrenadante;
- f) soltar o “pellet” do fundo do tubo de centrifugação através de leve batida na parede do tubo;
- g) Ressuspender as células no meio de congelamento a uma concentração de cerca de 1×10^6 de células/1 mL;
- h) adicionar alíquotas de 1 mL ou de 1,8 mL em frascos criogênicos plásticos;
- i) colocar os frascos em orifícios no interior de caixa de isopor apropriada;
- j) colocar a caixa de isopor em freezer a -70°C ;
- k) cerca de vinte e quatro horas após o congelamento, remover os frascos da caixa de isopor;
- l) transferir os frascos para o reservatório de nitrogênio líquido para estocagem permanente.

6.5.4.6- Descongelamento das células

- a) remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;
- b) para descongelar as células, colocar o frasco em banho-maria a 37°C com constante agitação até o descongelamento da suspensão celular;

- c) transferir o conteúdo do frasco com pipeta Pasteur para garrafa de cultura plástica de 25 cm² com 5 mL de MEM completo;
- d) homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;
- e) incubar em estufa umidificada, a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂;
- f) vinte e quatro horas após o descongelamento, remover o meio de cultura com DMSO e substituí-lo por 5 mL de MEM completo; no caso de glicerol como agente crioprotetor, remover o meio de cultura quarenta e oito horas após o descongelamento substituindo-o por 5 mL de MEM completo;
- g) realizar pelo menos dois subcultivos após o descongelamento antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.
- h) remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;
- i) para descongelar as células, colocar o frasco em banho-maria a 37⁰C com constante agitação até o descongelamento da suspensão celular;
- j) transferir o conteúdo do frasco com pipeta Pasteur para garrafa de cultura plástica de 25 cm² com 5 mL de MEM completo;
- k) homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;
- l) incubar em estufa umidificada, a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂;
- m) vinte e quatro horas após o descongelamento, remover o meio de cultura com DMSO e substituí-lo por 5 mL de MEM completo; no caso de glicerol como agente crioprotetor, remover o meio de cultura quarenta e oito horas após o descongelamento substituindo-o por 5 mL de MEM completo;
- n) realizar pelo menos dois subcultivos após o descongelamento antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.

6.5.4.7 – Controle de CO₂ através da verificação do pH do meio de cultura

Para se manter o valor do pH do meio de cultura constante a um valor pré-estabelecido é necessário ajustar a concentração de CO₂ na atmosfera interna da

estufa. A concentração de CO₂ requerida depende do valor de pH desejado e o conteúdo de tampão bicarbonato de sódio no meio de cultura como mostrado na curva constante no Manual Técnico da estufa de CO₂.

No caso do meio MEM com 2,2 g de bicarbonato de sódio adicionado por litro de meio, para a manutenção do pH ideal de 7,4 é necessária uma atmosfera de 5% de CO₂.

Desta forma, a partir do conhecimento do tipo de meio de cultura, da quantidade de bicarbonato de sódio adicionado por litro de meio e da medida do pH do meio de cultura poderemos obter o valor do percentual de CO₂ no interior da estufa.

7. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

7.1 – Preparação de extratos.

7.1.1 – Subdivisão e lavagem do material.

7.1.1.1 - De acordo Com a forma de apresentação do material plástico e sua espessura, utilizar a quantidade de amostra, expressa em valores de área superficial total como indicada na tabela 1.

Tabela 1 - Área Superficial Total

Forma de Apresentação	Espessura	Quantidade de Amostra/20mL de Solvente	Subdividir em Área Superficial Total
Filme ou Lâmina	< 0,5 mm	120 cm ²	Tiras de 5 x 0,3 cm
	0,5mm a 1mm	60 cm ²	Tiras de 5 x 0,3 cm
Tubo	< 0,5 mm (parede)	Comprimento (cm) = $120\text{cm}^2 / \text{DI}^1 + \text{DE}^2$	Seções de 5 x 0,3 cm
	0,5mm a 1mm	Comprimento (cm) = $60\text{cm}^2 / \text{DI}^1 + \text{DE}^2$	Seções de 5 x 0,3 cm
Placa, Tubo e Itens Moldados.	>1mm	60 cm ²	Seções de 5 x 0,3 cm
Elastômero	>1mm	25 cm ²	Não subdividir

¹ DI Diâmetro Interno do Tubo (cm).

² DE Diâmetro Externo do Tubo (cm).

7.1.1.2 – Uma vez selecionada a área adequada, cortá-la em tiras ou em seções de 5 cm x 0,3 cm, com exceção dos elastômeros que são testados intactos.

a) no caso de tubos, o comprimento total da seção a ser cortado é calculado levando-se em consideração além da área total das seções, os valores de diâmetro interno e externo do tubo;

b) usar 0,1g de elastômero ou 0,2 g de plástico ou de outros polímeros para cada 1 mL de solvente extrator quando não for possível a determinação da área

superficial da amostra.

7.1.1.3- Lavar material plástico subdividido referente à Amostra ou Controle Negativo da seguinte forma:

- a) colocar o material em erlenmeyers de borosilicato de 125 mL com tampa esmerilhada;
- b) adicionar 70 mL de água desionizada estéril;
- c) agitar por cerca de trinta segundos;
- d) desprezar a água;
- e) repetir uma vez a mesma operação de lavagem.

7.2– Procedimentos de extração

- a) transferir o material previamente lavado para erlenmeyer de 125 mL rigorosamente limpo;
- b) adicionar em seguida 20 mL de solução de cloreto de sódio 0,9 % estéril ou 20 mL de meio de cultura (MEM) estéril sem soro fetal bovino;
- c) fechar o frasco adequadamente com a tampa de vidro esmerilhada espaçada por pequena tira de papel de filtro. Cobrir com folha de alumínio;
- d) empregar uma das seguintes condições para extração, de acordo com a resistência térmica do material:
 - * Em autoclave e forno à temperatura de 121 °C durante 1 hora e 24 horas respectivamente;
 - * Em forno a 70 °C por 24 horas;
 - * Em estufa a 50 °C por 72 horas.

* Em estufa a 37°C por 24 horas

e) a condição escolhida para o processo de extração não deve ocasionar derretimento ou fusão dos pedaços de plástico da Amostra-teste o que reduz a área superficial disponível;

f) é tolerável, no entanto, a ocorrência de uma pequena adesão entre os pedaços de plástico;

g) testar da mesma forma 20 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% ou de meio de cultura estéreis sem a Amostra e usar como Branco;

h) resfriar os extratos obtidos a uma temperatura próxima à do meio ambiente (20 °C a 30 °C);

i) agitar vigorosamente por 10 minutos e transferir o extrato assepticamente para recipientes secos e estéreis;

j) manter os extratos à temperatura ambiente até o momento do uso;

l) testar os extratos no máximo 24 horas após a sua obtenção.

m) remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;

n) para descongelar as células, colocar o frasco em banho-maria a 37°C com constante agitação até o descongelamento da suspensão celular;

o) transferir o conteúdo do frasco com pipeta Pasteur para garrafa de cultura plástica de 25 cm² com 5 mL de MEM completo;

p) homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;

q) incubar em estufa umidificada, a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂;

r) vinte e quatro horas após o descongelamento, remover o meio de cultura com DMSO e substituí-lo por 5 mL de MEM completo; no caso de glicerol como agente crioprotetor, remover o meio de cultura quarenta e oito horas após o descongelamento substituindo-o por 5 mL de MEM completo;

s) realizar pelo menos dois subcultivos após o descongelamento antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.

7.3– Execuções do ensaio

7.3.1– Preparação das culturas celulares

- a) preparar suspensão contendo 1×10^5 por mL em meio MEM completo;
- b) colocar 2 mL da suspensão celular em cada orifício da placa;
- c) preparar culturas em duplicata para a Amostra, Controle Celular, Controle Negativo, Controle Positivo e Branco, quando for o caso;
- d) incubar as culturas em estufa a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂ por pelo menos 24 horas.

7.3.2– Aplicação da amostra

- a) vinte e quatro horas após o estabelecimento das culturas, utilizar para o ensaio aquelas que apresentarem uma monocamada celular uniforme e próxima a confluência (confluência superior a 80%);
- b) aspirar com pipeta o meio de cultura das placas;
- c) lavar a monocamada de cada orifício da placa com 2 mL de solução PBS;
- d) aspirar com pipeta a solução PBS das placas;
- e) adicionar por placa, 0,8 mL dos extratos das amostras;
- f) colocar em contato com as células, no centro de cada placa, com o auxílio de uma pinça: a Amostra a ser testada ou os papéis de filtro embebidos nos extratos obtidos do respectivo material, o Controle Negativo e o Controle Positivo;
- g) efetuar o procedimento acima em culturas em duplicata;
- h) incubar as placas por pelo menos 48 horas em estufa a 37 ± 1 °C, umidificada com $5 \pm 1\%$ de CO₂;

i) vinte e quatro horas após a incubação, observar a morfologia celular.

7.3.3 – Avaliação da citotoxicidade

Vinte e quatro horas após a aplicação e coloração da Amostra avaliar o grau de citotoxicidade:

- a) Observar microscopicamente a morfologia e a coloração das células sob e ao redor da Amostra-teste e dos Controles;
- b) o grau de citotoxicidade é quantificado numa escala de 0 a 4 (ver Quadro I);

7.3.4 – Determinação da validade do ensaio

Testar a validade do ensaio a partir das respostas das células ao tratamento pelo Controle Negativo e pelo Controle Positivo.

7.3.5 – Interpretação dos Resultados

- a) o Controle Negativo deve mostrar ausência de reação citotóxica;
- b) o Controle Positivo deve mostrar uma nítida reação citotóxica.

Quadro I: Graus da Citotoxicidade para o Ensaio de Eluição

Grau	Citotoxicidade	Condição das Culturas
0	Ausência	Grânulos intracitoplasmáticos descontínuos; sem lise celular.
1	Leve	Até 20% das células são redondas, vagamente unidas, sem grânulos intracitoplasmáticos; células lisadas estão ocasionalmente presentes.
2	Branda	Até 50% das células são redondas e desprovidas de grânulos citoplasmáticos; sem lise celular extensiva e áreas vazias entre as células.
3	Moderada	Até 70% das camadas contém células arredondadas ou lisadas.
4	Severa	Destruição quase integral das camadas celulares.

8. BIBLIOGRAFIA:

• BIOLOGICAL REACTIVITY TEST, in vitro. The United States Pharmacopeial CONVENTION 40 ed. Rockville: U.S.Pharmacopeial, 40. Biological Reactivity Test, in vitro.2017.

• INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Biological Evaluation of Medical Devices: Part 5: Test for Cytotoxicity, ISO 10.993-5. Geneve, 7p.2009

9.4. MANUAL TÉCNICO LABORATORIAL PARA O ENSAIO DE CITOTOXICIDADE IN VITRO – MÉTODO DE CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO UTILIZANDO AS CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE CAMUNDONGO L929

SUMÁRIO

- 1. Objetivo**
- 2. Campo de aplicação**
- 3. Definições**
- 4. Siglas**
- 5. Condições gerais**
- 6. Condições específicas**
- 7. Bibliografia**

1. OBJETIVO

O Manual Técnico tem por finalidade a descrição dos procedimentos experimentais a serem adotados na execução do ensaio de citotoxicidade “in vitro” em células de fibroblastos de camundongo L929, empregando o método de captação de vermelho neutro.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

2.1. Este Manual técnico aplica-se à avaliação de segurança de materiais plásticos, elastômeros e de outros polímeros empregados na fabricação de dispositivos e acessórios de uso médico e hospitalar em contato direto ou indireto com o tecido humano, tais como:

- a) bolsas para sangue;
- b) frascos para soluções parenterais;
- c) equipos para administração de soluções;
- d) cateteres intravenosos;
- e) implantes de próteses mamários;
- f) tubos e acessórios para oxigenador corporal;
- g) tubos e acessórios para dialisador;
- h) válvulas cardíacas;
- I) enxertos vasculares;
- j) equipos para transfusão e infusão;
- l) elásticos de fraldas descartáveis

3. DEFINIÇÕES

Para efeito deste Manual Técnico, são adotadas as seguintes definições:

- a) é um ensaio de sobrevivência/viabilidade celular no qual o corante é incorporado por células viáveis e íntegras, se acumulando nos lisossomos.
- b) está descrito como um método que combina o uso de um ensaio de citotoxicidade como um teste quantitativo para avaliação do efeito de agentes tóxicos.

3.1 – Amostra

Produto a ser testado ou um extrato preparado do mesmo.

3.2 – Biocompatibilidade

Aceitação pelo organismo de material implantado ou em contato com o tecido vivo.

3.3 – Controles Celulares

Cultura celular sem tratamento

3.4 – Controles Negativos

3.4.1 – Material Padrão de Referência USP biologicamente não reativo de acordo com as condições do ensaio.

3.4.2 – Papel de filtro Whatman n.^o 1.

3.5 – Controles Positivos

Látex para garrote biologicamente reativo.

3.6 – Elastômero

Polímero com propriedades físicas parecidas com as da borracha.

3.7 – Plástico

Material polimérico de alto peso molecular.

3.8 – Polímero

Composto orgânico de alto peso molecular, natural ou sintético constituído pela união de moléculas simples chamadas de monômeros. Alguns polímeros são elastômeros e outros são plásticos.

4. SIGLAS

São usadas no texto deste Manual Técnico as seguintes siglas:

MEM - Meio de Cultura Essencial Mínimo (Minimum Essential Medium)

PBS - Solução salina tamponada de fosfato (Phosphate Buffered Saline)

VN- Vermelho neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina)

5. CONDIÇÕES GERAIS

5.1– Equipamentos e outros Itens

- a) Agitador magnético;
- b) Autoclave
- c) Balança analítica;
- d) Banho-maria;
- e) Bico de Bunsen;
- f) Câmara de Neubauer;
- g) Estufa de CO₂;
- h) Estufa de secagem;
- i) Fluxo laminar vertical;
- j) Forno;
- k) Frasco de cultura de plástico ou de vidro;
- l) Frascos criogênicos plásticos (1 mL e 2 mL);
- m) Microscópio invertido;
- n) Paquímetro ou régua milimétrica;
- o) Pinças cirúrgicas;
- p) Pipetador automático;
- q) Pipetas Pasteur;

- r) Pipetas sorológicas (1ml,5mL e 10 mL);
- s) Placas de cultura de células de 96 orifícios;
- t) Micropipetas multicanais e monocanal;
- u) Vórtex;
- v) Espectrofotômetro com filtro de 540nm;
- w) Potenciômetro;
- x) Unidade de filtração (1000 mL);
- y) Vidraria em geral (erlenmeyer, béquer e proveta).

5.2– Insumos e soluções

- a) células L929 (fibroblastos de camundongo);
- b) solução tampão de fosfato PBS;
- c) solução de L-glutamina 200 mM;
- d) soro fetal bovino;
- e) solução antibiótica de Penicilina 10^4 UI/mL e Estreptomicina 10^4 μ g/mL;
- f) solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%;
- g) MEM 1 x concentrado;
- h) MEM completo 1 x concentrado;
- j) meio de congelamento com dimetilsulfóxido;
- l) meio de congelamento com glicerol;
- m) Pó do corante vermelho neutro (VN);
- n) Ácido acético glacial;
- o) Etanol;
- p) Controle Negativo: Padrão de Referência USP e papel de filtro Whatman n.⁰

1;

q) Controle Positivo: látex para garrote.

5.3 – Preparações de soluções

5.3.1 - Solução PBS:

Cloreto de sódio (PM 58,44)	32,0 g
Cloreto de potássio (PM 74,55)	0,8 g
Fosfato de sódio dibásico (PM 141,96)	4,6 g
Fosfato de potássio monobásico (PM 136,09)	0,8 g
Água desionizada	4,0 L

- dissolver com agitação magnética;
- ajustar o pH a 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1 N;
- esterilizar por autoclavação durante 30 min.

5.3.2 – Solução de L-glutamina (200 mM):

L - glutamina (PM-146,15)	- 2,92 g
Água desionizada	- 100 mL

- dissolver com agitação magnética;
- esterilizar por filtração (membrana de 0,22 μm).

Nota:

Adição 1% v/v ao meio MEM 1 X concentrado.

5.3.3 – Solução antibiótica de Penicilina e Estreptomicina:

5.3.3.1 – Solução A - Penicilina G Potássica 2×10^4 UI/mL.

Penicilina 5×10^6 UI

Água desionizada estéril 250 mL

5.3.3.2 – Solução B - Sulfato de Estreptomicina 2×10^4 μ g/mL.

Sulfato de estreptomicina 5g

Água desionizada estéril 250 mL

5.3.3.3 – Solução de Penicilina (10^4 UI/mL) e estreptomicina (10^4 μ g/mL).

Solução A 250mL

Solução B 250mL

Nota:

Adição 1% v/v ao meio MEM 1 X concentrado.

5.3.4 – Solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%

5.3.4.1 – Solução A - Tripsina 0,25%

Tripsina (Difco 1:250) 1,25g

Solução PBS 500 mL

- a) dissolver com agitação magnética durante 1 hora à temperatura ambiente;
- b) filtrar com papel de filtro (Whatman n.º 1);
- c) esterilizar por filtração (membrana de 0,22 µm).

5.3.4.2 – Solução B - EDTA 0,05%

EDTA (Verseno) - 0,25g

Solução PBS - 500mL

- a) dissolver com agitação magnética;
- b) esterilizar por autoclavação.

5.3.4.3 – Solução de tripsina 0,125% com EDTA 0,025%

Solução A- 500 mL

Solução B- 500 mL

5.3.5– MEM 1 X concentrado com sais de Earle - Sigma M 0268

- a) para cada 9,6 de pó equivalente a 1 litro de meio: adicionar 900
- b) dissolver empregando agitação magnética;

c) adicionar 2,2 g de bicarbonato de sódio para cada litro de volume final do meio a ser obtido;

d) agitar até completa dissolução da mistura;

e) ajustar o pH do meio na faixa de 7,2 a 7,3 (0,1 a 0,2 unidades abaixo do pH desejado de 7,4) usando ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;

f) adicionar água desionizada restante para completar o volume de 1 litro;

g) esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 μm).

5.3.6 – MEM completo 1 X concentrado

MEM 1 X concentrado suplementado com:

- | | |
|------------------------------|-----------------------------|
| a) Soro fetal bovino | 5% v/v |
| b) Sulfato de estreptomicina | 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| c) Penicilina G potássica | 100 UI/mL |
| d) L - glutamina | 2 mM |

5.3.7 – Solução estoque de VN (2.5mg/mL):

a) Pesar na balança analítica 0.5g do pó de VN para cada 100ml de água destilada;

b) Colocar a solução em tubos de centrífuga e homogenizar no vórtex;

c) Deixar a solução por uma noite na estufa a 37°C;

d) No dia seguinte centrifugar no mínimo 600G por 10 minutos, para separar possíveis cristais;

- e) Em cabine de segurança biológica, retirar com o auxílio de uma pipeta o volume da solução estoque de VN necessário para as placas de cultura de 96 orifícios a serem testadas e filtrar;
- f) Adicionar o volume necessário do MEM 1XC sem soro fetal bovino de modo que adicione 1ml da solução aquosa de VN (0,5%) em 79ml de meio MEM dando origem a uma solução na concentração de 50µg/ml.
- g) Homogenizar a solução com o auxílio de uma pipeta sorológica.

5.3.8 – Preparo da solução reveladora

- a) esta solução deve ser preparada no máximo por 1 hora antes do uso;
- b) tendo como base o volume a ser utilizado, acrescentar em recipiente adequado: 49% de água destilada; 50% de etanol e 1% de ácido acético glacial;
- c) acrescentar à solução reveladora em todos os orifícios das placas;
- d) agitar as placas por 20 a 45 minutos, protegida da luz (sugere-se envolver em papel alumínio);
- e) após a agitação deixar as placas em repouso por aproximadamente 5 minutos;
- f) realizar a leitura das placas em espectrofotômetro com filtro de 540nm, no máximo até 1 hora depois da adição da solução reveladora, usando o branco como referência.

5.4 – Lavagens do Material

5.4.1 – Lavar adequadamente toda a vidraria e material cirúrgico (tesouras e pinças) empregados na execução do ensaio.

5.4.2 - Secar todo o material em estufa a 50 °C de um dia para o outro.

5.5 – Preparação e esterilização do material

5.5.1 – Todos os materiais, soluções, vidraria, pinças, tesouras e plásticos utilizados nos ensaios devem ser estéreis.

5.5.2– Material necessário para a esterilização

- a) papel pardo (Kraft);
- b) barbante de algodão, sem cera;
- c) papel de alumínio comum;
- d) termômetro (200 °C);
- e) gaze;
- f) algodão;
- g) álcool comercial;
- h) cilindros de vidro para pipetas.

5.5.3– Preparação do material para a esterilização

- a) examinar minuciosamente a vidraria;
- b) colocar papel de alumínio no gargalo das garrafas, béquers, erlenmeyers; c) examinar minuciosamente a vidraria;
- c) colocar papel de alumínio no gargalo das garrafas, béquers, erlenmeyers, etc.;
- d) embrulhar as pinças e tesouras com papel de alumínio;
- e) colocar o papel Kraft sobre a folha dupla de alumínio;
- f) amarrar firmemente com o barbante;

g) tamponar as pipetas com algodão e colocá-las em cilindros de vidro com estopa de gaze;

h) cobrir a estopa com papel de alumínio, colocar por cima o papel Kraft e amarrar firmemente com o barbante;

i) esterilizar o material em autoclave por 121°C por 40 minutos ou em forno Pasteur a 170°C por 2 horas, quando for o caso;

j) esterilizar o material cirúrgico com álcool a 70% e lâmpada U.V. por aproximadamente 30 minutos.

5.5.4. – Procedimentos com células L 929

5.5.4.1– Considerações gerais

a) efetuar todas as operações com células, preparação e transferência de meios e soluções em fluxo laminar vertical empregando-se material estéril;

b) pipetar todas as soluções e suspensões contendo células com pipetador automático;

c) aquecer os meios e soluções em banho-maria a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ antes do uso com as células;

d) descartar as soluções em recipientes estéreis no interior de fluxo laminar.

5.5.4.2 – Manutenção das células

Manter as células L929 em meio de cultura essencial mínimo completo em estufa umidificada, a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ com $5 \pm 1\%$ de CO_2 em garrafas de cultura de vidro ou de plástico com áreas superficiais de 25 cm^2 ou de 75 cm^2 .

5.5.4.3- Tripsinização das culturas celulares

- a) remover o meio de cultura da garrafa;
- b) lavar a monocamada celular uma vez com 5 mL ou 10 mL de meio MEM 1X concentrado sem soro fetal bovino dependendo da área superficial da garrafa de cultura (25 cm² ou 75 cm²);
- c) remover o meio;
- d) tratar as células com 2 mL ou 4 mL de solução de tripsina com EDTA em garrafas com 25 cm² e com 75 cm² de área superficial, respectivamente;
- e) observar a monocamada celular ao microscópio invertido;
- f) aguardar o arredondamento total das células;
- g) remover a solução de tripsina;
- h) desprender as células da superfície após leve batida na garrafa;
- i) após o desprendimento, adicionar com pipeta, 10 mL de MEM completo às garrafas;
- j) suspender as células da garrafa no meio de cultura, lavando suavemente com pipeta a superfície da monocamada celular cinco a dez vezes até se obter uma suspensão de células bem individualizadas;
- l) obter uma suspensão celular bem homogênea sem a presença de grumos;
- m) medir a concentração celular da suspensão obtida, empregando câmara de Neubauer ;
- n) para o ensaio de citotoxicidade, ajustar a concentração da suspensão celular para 1×10^5 células/1mL empregando MEM completo.

5.5.4.4- Contagem de células

- a) fixar uma lamínula na câmara de Neubauer, que apresenta oito quadrados laterais, um quadrado central, todos de 1 mm, e profundidade de 0,1 mm;

b) transferir uma gota da suspensão celular para um dos lados da câmara, evitando-se o transbordamento e certificando-se de que todo o líquido se difundiu por capilaridade sob a lamínula;

c) observar as células ao microscópio a um aumento de 20X ou 40X;

d) contar todas as células dos quatro quadrados laterais;

e) excluir da contagem as células que se encontram nas linhas de baixo e da direita do perímetro de cada quadrado, incluir, porém, as que se acham nas linhas de cima e da esquerda;

f) repetir todo o procedimento de homogeneização para a dispersão das células quando grumos ocorrerem em percentual superior a 10%;

g) considerar como número ideal para a contagem, um mínimo de 40 e um máximo de 200 células observadas nos 4 quadrados (10 a 50 células por quadrado);

h) determinar a concentração celular por mL multiplicando-se pelo fator 10^4 o número médio de células por quadrado;

i) caso as células tenham sido diluídas ou concentradas antes da contagem, usar esses fatores para calcular a concentração de células na suspensão original.

5.5.4.5. Congelamento das células

a) preparar meio de congelamento com o agente crioprotetor dimetilsulfóxido - DMSO ou com glicerol;

b) tripsinizar a cultura celular;

c) medir a concentração da suspensão celular obtida, empregando câmara de Neubauer;

d) centrifugar a suspensão a 1000 rpm durante 10 min;

e) remover o sobrenadante;

f) soltar o “pellet” do fundo do tubo de centrifugação através de leve batida na parede do tubo;

g) ressuspender as células no meio de congelamento a uma concentração de cerca de 1×10^6 de células/1 mL;

h) adicionar alíquotas de 1 mL ou de 1,8 mL em frascos criogênicos plásticos;

i) colocar os frascos em orifícios no interior de caixa de isopor apropriada;

j) colocar a caixa de isopor em freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$;

k) cerca de vinte e quatro horas após o congelamento, remover os frascos da caixa de isopor;

l) transferir os frascos para o reservatório de nitrogênio líquido para estocagem permanente.

m) medir a concentração celular da suspensão obtida, empregando câmara de Neubauer (ver 6.5.4.4);

n) para o ensaio de citotoxicidade, ajustar a concentração da suspensão celular para 1×10^5 células/1mL empregando MEM completo.

5.5.4.6- Descongelamento das células

a) remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;

b) para descongelar as células, colocar o frasco em banho-maria a 37°C com constante agitação até o descongelamento da suspensão celular;

c) transferir o conteúdo do frasco com pipeta Pasteur para garrafa de cultura plástica de 25 cm^2 com 5 mL de MEM completo;

d) homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;

e) incubar em estufa umidificada, a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ com $5 \pm 1\%$ de CO_2 ;

f) vinte e quatro horas após o descongelamento, remover o meio de cultura com DMSO e substituí-lo por 5 mL de MEM completo; no caso de glicerol como agente

crioprotetor, remover o meio de cultura quarenta e oito horas após o descongelamento substituindo-o por 5 mL de MEM completo;

g) realizar pelo menos dois subcultivos após o descongelamento antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.

h) remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;

i) para descongelar as células, colocar o frasco em banho-maria a 37°C com constante agitação até o descongelamento da suspensão celular;

j) transferir o conteúdo do frasco com pipeta Pasteur para garrafa de cultura plástica de 25 cm² com 5 mL de MEM completo;

k) homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;

l) incubar em estufa umidificada, a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂;

m) vinte e quatro horas após o descongelamento, remover o meio de cultura com DMSO e substituí-lo por 5 mL de MEM completo; no caso de glicerol como agente crioprotetor, remover o meio de cultura quarenta e oito horas após o descongelamento substituindo-o por 5 mL de MEM completo;

n) realizar pelo menos dois subcultivos após o descongelamento antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.

5.5.4.7 – Controle de CO₂ através da verificação do pH do meio de cultura

Para se manter o valor do pH do meio de cultura constante a um valor pré-estabelecido é necessário ajustar a concentração de CO₂ na atmosfera interna da estufa. A concentração de CO₂ requerida depende do valor de pH desejado e o conteúdo de tampão bicarbonato de sódio no meio de cultura como mostrado na curva constante no Manual Técnico da estufa de CO₂.

No caso do meio MEM com 2,2 g de bicarbonato de sódio adicionado por litro de meio, para a manutenção do pH ideal de 7,4 é necessária uma atmosfera de 5% de CO₂.

Desta forma, a partir do conhecimento do tipo de meio de cultura, da quantidade de bicarbonato de sódio adicionado por litro de meio e da medida do pH do meio de cultura poderemos obter o valor do percentual de CO₂ no interior da estufa.

6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

6.1 – Preparação de extratos.

6.1.1 – Subdivisão e lavagem do material.

6.1.1.1 - De acordo Com a forma de apresentação do material plástico e sua espessura, utilizar a quantidade de amostra, expressa em valores de área superficial total como indicada na tabela 1.

Tabela 1 - Área Superficial Total

Forma de Apresentação	Espessura	Quantidade de Amostra/20mL de Solvente	de Subdividir em Área Superficial Total
Filme ou Lâmina	< 0,5 mm	120 cm ²	Tiras de 5 x 0,3 cm
	0,5mm a 1mm	60 cm ²	Tiras de 5 x 0,3 cm
Tubo	< 0,5 mm (parede)	Comprimento (cm) = $120\text{cm}^2 / DI^1 + DE^2$	Seções de 5 x 0,3 cm
	0,5mm a 1mm	Comprimento (cm) = $60\text{cm}^2 / DI^1 + DE^2$	Seções de 5 x 0,3 cm
Placa, Tubo e Itens Moldados.	>1mm	60 cm ²	Seções de 5 x 0,3 cm

Elastômer	>1mm	25 cm ²	Não subdividir
-----------	------	--------------------	----------------

¹ DI Diâmetro Interno do Tubo (cm).

² DE Diâmetro Externo do Tubo (cm)

6.1.1.2 – Uma vez selecionada a área adequada, cortá-la em tiras ou em seções de 5 cm x 0,3 cm, com exceção dos elastômeros que são testados intactos.

a) no caso de tubos, o comprimento total da seção a ser cortado é calculado levando-se em consideração além da área total das seções, os valores de diâmetro interno e externo do tubo;

b) usar 0,1g de elastômero ou 0,2 g de plástico ou de outros polímeros para cada 1 mL de solvente extrator quando não for possível a determinação da área superficial da amostra.

6.1.1.3- Lavar material plástico subdividido referente à Amostra ou Controle Negativo da seguinte forma:

a) colocar o material em erlenmeyers de borosilicato de 125 mL com tampa esmerilhada;

b) adicionar 70 mL de água desionizada estéril;

c) agitar por cerca de trinta segundos;

d) desprezar a água;

e) repetir uma vez a mesma operação de lavagem.

6.2– Procedimentos de extração

a) transferir o material previamente lavado para erlenmeyer de 125 mL rigorosamente limpo;

b) adicionar em seguida 20 mL de solução de cloreto de sódio 0,9 % estéril ou 20 mL de meio de cultura (MEM) estéril sem soro fetal bovino;

c) fechar o frasco adequadamente com a tampa de vidro esmerilhada espaçada por pequena tira de papel de filtro. Cobrir com folha de alumínio;

d) empregar uma das seguintes condições para extração, de acordo com a resistência térmica do material:

*Em autoclave e forno à temperatura de 121°C durante 1 hora e 24 horas respectivamente;

*Em forno a 70°C por 24 horas;

*Em estufa a 50°C por 72 horas.

*Em estufa a 37°C por 24 horas

e) a condição escolhida para o processo de extração não deve ocasionar derretimento ou fusão dos pedaços de plástico da Amostra-teste o que reduz a área superficial disponível;

f) é tolerável, no entanto, a ocorrência de uma pequena adesão entre os pedaços de plástico;

g) testar da mesma forma 20 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% ou de meio de cultura estéreis sem a Amostra e usar como Branco;

h) resfriar os extratos obtidos a uma temperatura próxima à do meio ambiente (20 °C a 30 °C);

i) agitar vigorosamente por 10 minutos e transferir o extrato assepticamente para recipientes secos e estéreis;

j) manter os extratos à temperatura ambiente até o momento do uso;

l) testar os extratos no máximo 24 horas após a sua obtenção.

m) remover o frasco do reservatório de nitrogênio líquido;

- n) para descongelar as células, colocar o frasco em banho-maria a 37°C com constante agitação até o descongelamento da suspensão celular;
- o) transferir o conteúdo do frasco com pipeta Pasteur para garrafa de cultura plástica de 25 cm² com 5 mL de MEM completo;
- p) homogeneizar suavemente com pipeta Pasteur;
- q) incubar em estufa umidificada, a 37 ± 1 °C com $5 \pm 1\%$ de CO₂;
- r) vinte e quatro horas após o descongelamento, remover o meio de cultura com DMSO e substituí-lo por 5 mL de MEM completo; no caso de glicerol como agente crioprotetor, remover o meio de cultura quarenta e oito horas após o descongelamento substituindo-o por 5 mL de MEM completo;
- s) realizar pelo menos dois subcultivos após o descongelamento antes do emprego em ensaios de citotoxicidade.

6.3– Execuções do ensaio

- a) As células de fibroblasto de camundongo L929 nas concentrações de $2,5 \times 10^5$ células/ml foram semeadas em volumes de 0,2 ml nas microplacas de 96 orifícios e mantidas em cultura durante 24 h, a 37°C em estufa com 5% de CO₂ para formarem uma monocamada celular;
- b) Depois deste período, o meio de cultura foi desprezado e adicionado a cada orifício 0,2 ml de meio contendo diluições das amostras a serem testadas e dos respectivos controles;
- c) Todas as diluições das amostras e dos controles foram testadas em triplicata;
- d) As placas foram novamente incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas;
- e) Após o período de incubação o meio contendo as amostras foi desprezado e adicionou 0,2 ml de meio Eagle MEM sem soro, contendo 50µg de vermelho neutro/ml (VN) foi adicionado em cada orifício;
- f) Seguiu-se a incubação das microplacas por três horas a 37°C para permitir a captação do VN pelas células vivas. Este meio foi preparado 24 horas antes e mantido em estufa a 37°C durante a noite, sendo imediatamente antes do uso centrifugado a 600 r.p.m. durante 10 minutos para eliminar os cristais formados;

- g) Decorrido o tempo de captura, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com 0,2ml de PBS pré-aquecido para remover o corante incorporado;
- h) Esta solução foi a seguir descartada e 0,2ml de solução reveladora foi adicionada para extrair o corante;
- i) Após 5 minutos de agitação, as placas foram levadas para leitura da densidade óptica num leitor de microplacas com filtro de 540nm.

6.3.3 – Avaliação da citotoxicidade

Se a viabilidade celular relativa para a maior concentração do extrato de amostra (extrato de 100%) é de 70% do grupo de controle, então o material deve ser considerado não citotóxico.

6.3.4 – Determinação da validade do ensaio

Testar a validade do ensaio a partir das respostas das células ao tratamento pelos Controles Negativo e pelo Positivo.

6.3.5 – Interpretação dos Resultados

- a) Ensaios como a difusão em ágar e o contato direto são capazes de fornecer apenas, uma avaliação qualitativa da citotoxicidade;
- b) A classificação qualitativa da citotoxicidade para os ensaios de difusão em ágar e contato direto leva em consideração a zona de células mortas ao redor do espécime;
- c) Como estas avaliações são preliminares, deve-se seguir uma avaliação quantitativa da citotoxicidade;
- d) Para as análises quantitativas de citotoxicidade, deve-se realizar o cálculo da viabilidade celular;

6.3.5.1 – Avaliação da viabilidade celular

- a) Viabilidade relativa das células tratadas com cada concentração do ativo, expressa em porcentagem do controle do veículo (considerado como 100% de viabilidade);
- b) Para que a amostra seja considerada não citotóxica, o seu valor de viabilidade celular tem que ser maior que 70% em relação ao controle negativo que tem de ser 100%;
- c) Deve ser encontrado pelo menos um valor de citotoxicidade maior que 0% e menor ou igual a 50% e pelo menos um valor maior que 50% e menor que 100%.

6.3.5.2 – Cálculo da viabilidade

- a) Viabilidade (%) = $100 \times \text{OD extrato} / \text{OD controle}$.
- b) OD extrato = média das densidades ópticas da amostra teste incubada com 100% de extrato;
- c) OD controle = média das densidades ópticas das amostras incubadas só com o meio de cultura;
- d) O índice de citotoxicidade do material (IC50), que é a concentração da amostra teste que mata 50% das células do experimento, é determinado pela curva dose-resposta.

6.3.5.3 –Análise estatística

- a) Os dados de viabilidade relativa são transferidos para um software, aonde é realizada a análise estatística e gerado um gráfico com uma curva dose-resposta do material em teste.

7- BIBLIOGRAFIAS

BORENFREUND, Ellen; PUERNER, James A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology letters**, v. 24, n. 2-3, p. 119-124, 1985.

CRUZ, Aurea Silveira. **Teste de citotoxicidade\in vitro\como alternativa ao teste\in vivo\de Draize na avaliação de produtos cosméticos**. 2003. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ISO. 10993-5: 2009 Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity. **International Organization for Standardization, Geneva**, 2009.