

Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante

In vitro cytotoxicity of hydrogel membranes reticulate by ionizing radiations

Sizue O. ROGERO¹
Áurea de SOUZA-BAZZI¹
Tamiko I. IKEDA²
Áurea S. CRUZ^{2*}
Katia C. FERNANDES²
Olga Z. HIGA¹

RIALA6/875

Rogero, S.O. et al. Citotoxicidade *in vitro* das membranas de hidrogel reticuladas por radiação ionizante. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2): 1-5, 2000.

RESUMO. Hidrogéis constituídos de poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP), ágar e polietilenoglicol (PEG) são utilizados como membranas para uso tópico, no tratamento de lesões de pele. Com o objetivo de melhorar algumas das propriedades mecânicas da membrana, como tensão de ruptura e alongação, substituiu-se o PEG pelo copolímero poli (dimetilsiloxano)-co-poli (óxido de etileno) (SEO). A biocompatibilidade “*in vitro*” das membranas de PVP-SEO com diferentes concentrações de SEO foi testada em cultura de células. O teste de citotoxicidade foi realizado pelo estudo comparativo de dois métodos: 1) difusão em ágar, utilizando-se as linhagens celulares RC-IAL e NCTC Clone L-929 e 2) inibição da formação de colônias utilizando-se a linhagem celular CHO-K₁. Os resultados obtidos nos dois métodos foram análogos e demonstraram que as membranas do PVP-SEO apresentam toxicidade nas concentrações testadas e nas linhagens celulares utilizadas. Foi possível também concluir que a adição de SEO ocasiona caráter citotóxico às membranas de PVP.

PALAVRAS-CHAVE. Hidrogel; cultura de células; citotoxicidade; biocompatibilidade; polivinilpirrolidona.

INTRODUÇÃO

Membranas de hidrogel constituídas por poli N-vinil-2-pirrolidona (PVP), ágar e polietilenoglicol (PEG), reticuladas por radiação ionizante vêm sendo utilizadas como dispositivos médicos para uso tópico^{8,11}. A principal vantagem desta

metodologia está na capacidade da radiação promover a reticulação em condições razoavelmente brandas, sem qualquer aditivo, além da esterilização simultânea⁴. Souza et al.¹³ mostraram que a substituição do PEG nas membranas de hidrogel pelo copolímero poli (dimetilsiloxano)-co-poli (óxido de etileno) (SEO) aumenta o grau de reticulação tornando-as

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Supervisão de Radiobiologia

² Instituto Adolfo Lutz - Seção de Culturas Celulares

* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo – SP
E-Mail: aurocruz@ial.sp.gov.br

mais resistentes à ruptura quando submetidas a uma força externa. O SEO foi selecionado por ser utilizado na indústria de cosméticos e na fabricação de lentes de contato¹².

As membranas de hidrogel, como todos os biomateriais, devem ser submetidas a avaliação de biocompatibilidade que incluem ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*”¹⁴.

Vários métodos “*in vitro*”, para avaliação da toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se a viabilidade celular por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias^{2,3,5,7,9}.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a citotoxicidade dos filmes de PVP, com diferentes concentrações de SEO, em sistemas celulares “*in vitro*”, bem como comparar a sensibilidade dos dois métodos utilizados: difusão em ágar e inibição da formação de colônias.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Preparo das membranas

Os reagentes utilizados no preparo das membranas foram: PVP K-90 proveniente da GAF Corporation com massa molar $3,6 \times 10^5$ g/mol, o copolímero SEO L7604 gentilmente cedido pela Osi Specialties, com massa molar 4×10^3 g/mol e o ágar técnico n° 03 Oxóid L13.

Os 5 tipos de membranas foram preparados com PVP a 6%, ágar a 0,4% e SEO nas concentrações de 0; 0,5; 1,5; 3,5 e 4,5% (P/P), nas membranas numeradas de 1 a 5, respectivamente. As soluções aquosas de PVP, SEO e ágar foram preparadas separadamente, incorporadas a uma temperatura aproximada de 60°C e distribuídas em placas de Petri. Após a gelificação, as placas cobertas com filmes de PVC foram irradiadas com uma dose de 25kGy no acelerador de elétrons Dynamitron, com energia de 1,5MeV e taxa de dose de 22,4kGy/s. Ao término da irradiação, as amostras ficaram em repouso por 24h para atingir o equilíbrio.

2. Teste de citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade das membranas de hidrogel foi realizada utilizando-se dois métodos:

2.1. Método de difusão em ágar

As linhagens celulares utilizadas foram: células de tecido conectivo de camundongo, NCTC Clone L-929 (CCL1-ATCC)¹ e células fibroblásticas de rim de coelho RC-IAL, isoladas no Instituto Adolfo Lutz⁶.

As células foram semeadas em placa de Petri (15x60mm), na concentração de $3,0 \times 10^5$ células/mL em Meio Mínimo de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino (SFB), sem antibióticos, no volume de 5mL e incubadas durante 48h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, com a monocamada de células já formada, o meio de

cultura foi desprezado e adicionado 5mL do meio “overlay” em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM duas vezes concentrado e ágar (Difco) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro como corante vital. No momento do uso, o ágar foi fundido e misturado na mesma proporção com o MEM duas vezes concentrado, ambos a uma temperatura de 44°C. As membranas a serem testadas foram cortadas em fragmentos de 5mm de diâmetro e colocadas sobre o ágar antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 24h^{3,5,7,9,14}.

Foram utilizados como controles positivos fragmentos de látex e como controles negativos discos de papel de filtro de natureza comprovadamente atóxica, respeitando a dimensão de 5mm de diâmetro. As amostras foram avaliadas em duplicata para cada linhagem celular.

As placas foram analisadas macroscópica e microscopicamente e a característica de citotoxicidade constatada por halo claro ao redor do material testado.

2.2. Método inibição da formação de colônias^{2,9}

Para a preparação dos extratos das amostras, utilizou-se a proporção de 1,4cm² de área superficial das membranas para cada mL do meio de cultura RPMI-SFB (RPMI 1640 com 10% de SFB e 1% de solução de penicilina e estreptomicina) em frascos de vidro com tampa rosqueada incubados a 37°C/24h. Após este período foram feitas diluições seriadas de 50; 25; 12,5 e 6,25% dos extratos das membranas. Os controles negativo, extrato de polietileno de alta densidade (HDPE), e positivo, solução de fenol 0,02%, foram igualmente diluídos.

Utilizou-se a linhagem celular de ovário de hamster chinês CHO-K₁ (CCL-61-ATCC)¹ mantida em garrafas plásticas com o meio RPMI SFB. No momento do ensaio, volume de 2mL de uma suspensão celular contendo 100 células/mL, foi distribuído em placas de Petri de 15X60mm, as quais foram incubadas por 5h para permitir adesão celular, em incubadora úmida a 37°C com 5% de CO₂. Após este período, o meio de cultura foi removido e substituído por 5mL dos extratos puros e das diferentes diluições. As placas foram novamente colocadas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C, por 7 dias. Para cada diluição do extrato utilizou-se placas em triplicata.

Após o período de incubação, os meios foram removidos e as colônias formadas fixadas em solução de formol 10% em solução salina 0,9% e coradas com Giemsa. As colônias visíveis foram contadas e comparadas com o número de colônias formadas na placa controle da linhagem celular CHO-K₁, previamente incubada com o meio RPMI-SFB.

O potencial citotóxico foi avaliado e expresso pelo índice de citotoxicidade IC_{50(%)}, correspondente à concentração do extrato que suprime em 50% a formação de colônias em relação ao controle.

RESULTADOS

No teste de citotoxicidade, pelo método de difusão em ágar, a intensidade de morte celular foi avaliada pelo dimensionamento do halo claro formado ao redor da membrana em teste. O diâmetro do halo foi medido com uma régua milimétrica, e os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Teste de citotoxicidade pela difusão em ágar das membranas de PVP-SEO

Amostras	Média dos diâmetros dos halos*	
	Linhagem celular NCTCL929	Linhagem celular RC-IAL
Contr. Negat.	0,0	0,0
Contr. Posit.	35,0	35,0
1	0,0	0,0
2	5,0	5,0
3	9,0	9,0
4	15,0	25,0
5	21,0	35,0

* Valores expressos em mm

A presença do halo claro ao redor da membrana de PVP-SEO, contendo 1,5% de SEO, corresponde as células mortas (Figura 1).

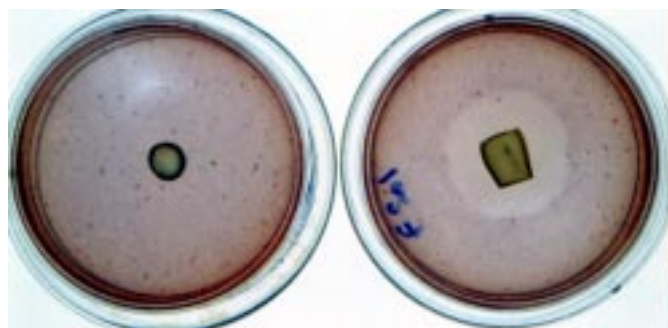


Figura 1. Teste de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar: a- Controle negativo, b- Membrana de PVP-SEO com 1,5% de SEO

Na Figura 2 são apresentadas as placas de Petri do controle de células CHO-K₁; do controle negativo; do controle positivo e da membrana de PVP contendo 0% de SEO, do ensaio de citotoxicidade pelo método de inibição de formação de colônias. A porcentagem da média do número de colônias em cada diluição foi calculada em relação à placa controle de células CHO-K₁ (Tabela 2).

Lançando-se os dados da Tabela 2 num gráfico pode-se calcular quantitativamente o índice de citotoxicidade, que é representado pelo IC_{50(%)}, como mostra a Figura 3.

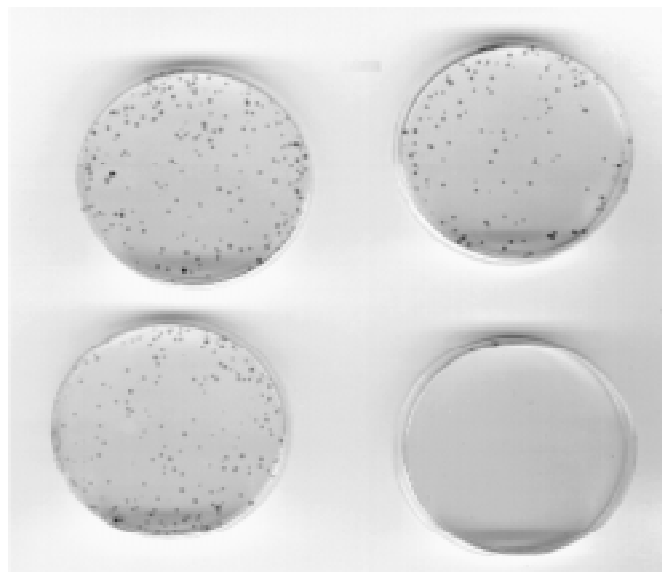


Figura 2. Placas de Petri do teste de citotoxicidade pelo método de inibição de formação de colônias

Tabela 2. Percentual da média do número de colônias formadas, em diferentes concentrações dos extratos, em relação à placa controle, nas amostras de PVP-SEO e nos controles negativo e positivo

Amostras	% da Média do Número de Colônias				
	Concentração do Extrato				
	6,25 %	12,5 %	25 %	50 %	100 %
Contr. Negat.	84	103	78	93	87
Contr. Posit.	76	69	52	19	1
1	88	93	94	101	97
2	83	88	86	60	3
3	79	65	19	0	0
4	15	3	0	3	0
5	17	9	0	3	3

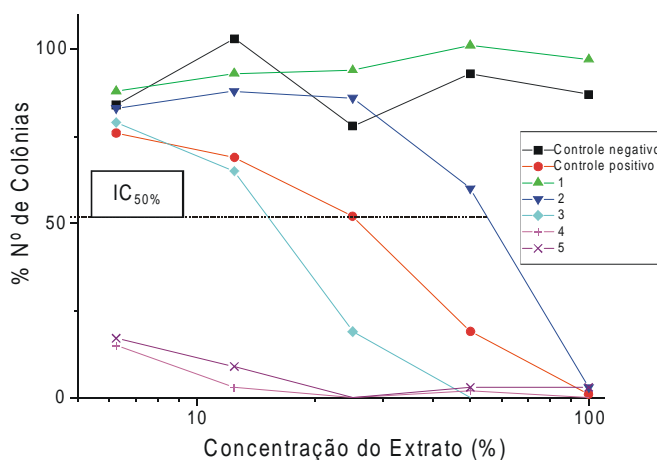


Figura 3. Curva de supressão de colônias. 1- 0% SEO; 2- 0,5% SEO; 3- 1,5% SEO; 4-3,5% SEO e 5- 4,5% SEO

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os ensaios “*in vitro*” são habitualmente efetuados como testes de triagem no início da avaliação de biocompatibilidade de materiais. A ISO 10993-5 (1992) refere-se ao teste de citotoxicidade como um teste “*in vitro*” de aplicabilidade geral, usado largamente com o objetivo de sugerir, a partir de seus resultados, um plano de ensaios aplicáveis ao material. Uma das vantagens deste teste é sua alta sensibilidade, e os resultados obtidos tanto pela inibição de crescimento celular, formação de colônias, morte celular, e outros, indicam que este tipo de avaliação fornece informação integrada da ação dos componentes do material no meio biológico.

O copolímero SEO, constituído de cadeias de poli dimetil siloxana com cadeias enxertadas de poli óxido de etileno, foi adicionado às membranas de hidrogel de PVP por incrementar a resistência mecânica das mesmas. Ranby e Rabek (1977) verificaram que quando o poli óxido de etileno é submetido à radiação ionizante, há formação de radicais que podem ser decorrentes da cisão da cadeia.

Como a obtenção das membranas é feita via radiação ionizante, este fato pode levar à formação de algum componente tóxico, conforme verificado nos ensaios de citotoxicidade apresentados.

No teste de difusão em ágar (Tabela 1), a presença de halo foi observada em todas as membranas exceto naquela

identificada como 1, PVP com 0% de SEO, evidenciando liberação de componente tóxico pelas membranas de PVP com diferentes concentrações de SEO. A presença de halo nas placas indica morte celular, ou seja, citotoxicidade como se verifica no controle positivo, que apresentou um halo de 35mm.

Na Figura 3 observa-se que a membrana de PVP sem a presença de SEO apresenta $IC_{50\%}$ superior a 100, portanto não citotóxica, assim como o controle negativo. A medida em que a concentração de SEO foi aumentada na formulação, houve aumento da citotoxicidade da membrana. O controle positivo apresentou $IC_{50\%}$ de 28, isto é, a solução de fenol numa diluição de 28%, provoca a morte de 50% da população celular.

Os métodos de difusão em ágar e de inibição de formação de colônias podem ser utilizados para avaliar a citotoxicidade “*in vitro*”, das membranas de hidrogel, pois ambos demonstraram sensibilidade equivalente. Por estes testes concluiu-se que a adição de SEO na formulação torna as membranas de PVP citotóxicas e que o aumento da toxicidade é proporcional à concentração de SEO na formulação.

AGRADECIMENTOS

- CNPq pela bolsa de estudos;
- Osi Specialties pelo fornecimento do SEO;
- Ao estudante Luciano Vieira da Costa pela assistência técnica no método de inibição da formação de colônias.

RIALA6/875

Rogero, S.O. et al. - *In vitro* cytotoxicity of hydrogel membranes reticulate by ionizing radiations. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2),1-5, 2000

ABSTRACT. Hydrogels composed by PVP, agar and PEG are used as wound dressings in the treatment of skin ulcers. In order to improve the mechanical properties of the membrane, such as tensile strength and elongation, PEG was replaced by copolymer poly (dimethylsiloxane)-co-polyoxyethylene (SEO). The “*in vitro*” biocompatibility evaluation of PVP-SEO membranes with different concentrations of SEO was carried out in cell culture. A comparative study of cytotoxicity assays was performed by two methods: 1) diffusion agar assay, using RC-IAL and NCTC Clone L-929 cells and 2) colony suppression assay, using CHO-K₁ cells. In the cytotoxic evaluation of PVP-SEO membranes by both methods, analogous results were obtained. It was also possible to conclude that the addition of SEO promotes cytotoxicity in PVP membranes.

KEY WORDS. Hydrogel, cell culture, cytotoxicity, biocompatibility, polyvinylpirrolidone.

REFERÊNCIAS

1. American Type Culture Collection: **Catalogue of Cell Lines & Hybridomas**. 8th ed. Rockville, 1994.
2. Campus, V.E. et al. Cytotoxicity of vulcanized natural rubber latex films by the conventional process with sulphur and by the alternative process with ionizing radiation. **Proceedings of the 5th Latin American and 3rd Ibero American Polymer Symposium**, Mar del Plata, Argentina, p: 289-299 December 1996.
3. **Cell Culture Test Methods**. ASTM-STP 810 S.A. Brown ed. American Society for testing and materials, 1983.
4. Chapiro, A. Radiaton.chemistry in the field of biomaterials. **Radiat. Phys. Chem.**, 46(2): 159-160, 1995.
5. Cruz, A.S. et al. Culturas celulares na detecção da toxicidade de materiais médico-hospitalares e outros que entram em contato com o ser humano. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 47 (1/2): 51-57, 1987.
6. Cruz, A.S. et al. Linhagem celular contínua de rim de coelho características e substrato para replicação de vírus. **Rev. Saúde Pública**, 26: 392-399, 1992.

7. Guess, W.L. et al. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, 54: 1545-1547, 1965.
8. Henglein, A. **J. Phys. Chem.**, 63: 1052, 1959 apud Encyclopedia of Polymer Science and Engineering 2nd ed. Polyvinylpirrolidone, 17: 199-257.
9. International standard: **Biological evaluation of medical devices** – Part 5: Tests for Cytotoxicity: “in vitro” methods. ISO 10 993-5, 1992.
10. Ranby, B.; Rabek, J.F. ESR Study of degradation process in polymers. In: **ESR Spectroscopy in polymer research principles of ESR Spectroscopy**. Ed. Springer-Verlag; Berlin V.2, 1977.
11. Rosiak, J.M.; Olejniczak, J. Medical applications of radiation-formed hydrogels. **J. Radiat Phys Chem.**, 42 (4/6): 903-906, 1993.
12. Silwet Surfactants, OSI Specialties, p. 1-20, 1994. (catálogo)
13. Souza, A. et al. Influência da adição dos copolímeros de dimetilsiloxano e óxido de etileno (SEO) na tensão de ruptura (Tb), na porcentagem de gel e de intumescimento de filmes de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) reticulados por feixe de elétrons. **Anais do IV Encontro Nacional de Aplicações Nucleares**, Poços de Caldas, Minas Gerais, 2: 1252-1255, Agosto, 1997.
14. **United States Pharmacopeia**, USP XXIII, Rockville, Twinbrook Parkway, 23:1697-1699, 1995.

Recebido em 03/08/1999; Aprovado em 02/12/1999