

## ESTUDO COMPARATIVO DE TESTES DE CITOTOXICIDADE EM MEMBRANAS DE HIDROGEL OBTIDAS POR MEIO DE RADIAÇÃO IONIZANTE.

Sizue O.Rogero; Áurea de Souza-Bazzi; Kátia C Fernandes; Tamiko I.Ikeda; Áurea S.Cruz e Olga Z.Higa

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Supervisão de Radiobiologia  
Travessa R, 400 - CEP 05422-970 - São Paulo, SP.  
Email: sorogero@net.ipen.br

Instituto Adolfo Lutz - Seção de Culturas Celulares  
Av. Dr. Arnaldo, 355 - CEP 01246-902 - São Paulo, SP.

### RESUMO

Hidrogéis constituídos de poli (N-vinil-2-pirrolidona) [PVP] ágar e polietileno glicol (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 silicóna polióxido de etileno (SEO). Com este novo componente efetuou-se a avaliação da biocompatibilidade *in vitro* das membranas de PVP-SEO com diferentes concentrações de SEO, em cultura de células. O teste de citotoxicidade foi realizado fazendo-se um estudo comparativo de dois métodos diferentes: 1) difusão em agar, utilizando-se células de rim de coelho (RC-IAL) e células do tecido conectivo de camundongos (NCTC clone - L929) e 2) supressão de colônias, utilizando-se células de ovário de hamster chinês (CHO). Na avaliação biológica *in vitro* das membranas de PVP-SEO nos dois métodos, foram obtidos resultados análogos.

Palavras chave: hidrogel, citotoxicidade, biocompatibilidade, polivinilpirrolidona

### ABSTRACT

Hydrogels composed by poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) [PVP], agar and polyethyleneglycol (PEG) are used as wound dressings in the treatment of ulcers of skin. In order to improve the mechanical properties of the membrane as tensile strength and elongation, PEG was replaced by copolymer silicone polyoxyethylene (SEO). The *in vitro* biocompatibility evaluation of PVP-SEO membranes with different concentrations of SEO was carried out in cell culture. Comparative study of cytotoxicity was performed by two different methods: 1) overlay assay using rabbit kidney cells (RC-IAL) and mice connective tissue cells (NCTC clone – L929) and 2) colony suppression assay, using Chinese Hamster Ovary cells (CHO). In the *in vitro* biological evaluation of PVP-SEO membranes by both methods analogous results were obtained.

Key words: hydrogel, cytotoxicity, biocompatibility, polyvinylpyrrolidone

## I. INTRODUÇÃO

Membranas de hidrogel constituídas por poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), ágar e poli(etileno glicol) (PEG), reticuladas e esterilizadas por radiação ionizante, vêm sendo utilizadas como dispositivos médicos para uso tópico[1]. A principal vantagem do uso da metodologia das radiações sobre o método convencional na preparação de biomateriais poliméricos está na capacidade da radiação em promover a reticulação em condições razoavelmente brandas, sem qualquer aditivo<sup>[3]</sup>, além da esterilização simultânea. Souza, A e cols<sup>[10]</sup> mostraram que a substituição do PEG nas membranas de hidrogel pelo copolímero poli(dimetilsiloxano)-copoli(óxido de etileno) (SEO), aumenta o grau de reticulação tornando-as mais resistentes à ruptura quando submetidas a uma força externa. O SEO foi selecionado por ser um copolímero bastante utilizado na indústria de cosméticos e na fabricação de lentes de contato.

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

Vários métodos *in vitro* para avaliação da toxicidade de biomateriais tem sido padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos verificando-se a viabilidade celular pela incorporação de corantes vitais ou pela inibição do crescimento de colônias.

No presente trabalho foi realizado o teste de citotoxicidade dos filmes de PVP com diferentes concentrações de SEO, por dois métodos: difusão em ágar e ensaio de supressão de colônias. O objetivo foi comparar a sensibilidade desses dois ensaios *in vitro* na avaliação da citotoxicidade dos hidrogéis.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### Preparo das membranas

Os reagentes utilizados foram o PVP K-90, proveniente da GAF Corporation, com massa molar  $3,6 \times 10^5$  g/mol; o copolímero SEO L7604 doado pela Osi Specialties, com massa molar  $4 \times 10^3$  g/mol e o ágar técnico n° 03, sob o código L.13, proveniente da Oxóid.

Foram preparados 5 tipos de membranas onde as concentrações de PVP e de ágar foram fixadas em 6% e 0,4%, respectivamente. A concentração de SEO variou de 0; 0,5; 1,5; 3,5 e 4,5%, nas membranas numeradas de 1 a 5, respectivamente. As soluções aquosas de PVP, SEO e ágar foram preparadas separadamente e misturadas a uma temperatura aproximada de 60°C e colocadas em placas de Petri. Após a gelificação, as placas foram cobertas com filmes de PVC e 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.

### Teste de Citotoxicidade

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

#### Método de difusão em ágar<sup>(5-9)</sup>

Foram utilizadas as linhagens celulares NCTC clone L-929 (CCL1 - ATCC) de tecido conectivo de camundongo, e a linhagem RC-IAL de células fibroblásticas de rim de coelho, isoladas no Instituto Adolfo Lutz.

As células foram semeadas em placa de Petri (15 x 60mm), na concentração de  $1,5 \times 10^5$  cels/mL em Meio Mínimo de Eagle (MEM) c/ 10% de soro fetal bovino (SFB) sem antibióticos no volume de 5mL, e incubadas durante 48h à  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ .

Após esse período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado e adicionado 5mL do meio de cultivo “overlay” em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MEM, duas vezes concentrado e ágar 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  $44^\circ\text{C}$  e adicionado sobre a monocamada de células. As membranas a serem testadas foram cortadas com 5mm de diâmetro e colocadas sobre a camada de ágar antes de sua solidificação completa. As placas de Petri foram encubadas novamente em estufa a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida com 5%  $\text{CO}_2$  por 24h.

Foram utilizadas como controle positivo fragmentos de látex e como controle negativo papel de filtro atóxico, ambos com 5mm de diâmetro. As amostras foram avaliadas em duplicata para cada linhagem celular.

As leituras das placas foram feitas macroscopicamente onde a presença de citotoxicidade foi constatada por halo claro ao redor do material em teste, correspondente às células mortas.

### **Ensaio de supressão de colônias**<sup>(5,10)</sup>

Utilizou-se cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO k1), da American Type Culture Collection.

O ensaio foi realizado colocando-se diluições dos extratos das membranas em contato com a cultura de células CHO k1 em placa de Petri de 15x60 mm, utilizando-se como controle positivo uma solução de fenol 0,02% e como controle negativo, um extrato de polietileno de alta densidade (HDPE).

Os extratos foram preparados utilizando-se cerca de  $1,4\text{ cm}^2$  do material para cada mL do meio de cultura RPMI-FCS (RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de uma solução de penicilina e estreptomicina) e incubados por 24h em estufa a  $37^\circ\text{C}$ . Foram feitas diluições seriadas dos extratos das membranas, do HDPE e da solução de fenol 0,02% (50; 25; 12,5; 6,25%).

As células CHO k1, foram cultivadas em garrafa de plástico, em RPMI-FCS, em estufa com atmosfera úmida e 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , até obtenção de uma camada de células com crescimento confluyente. O despreendimento das células da garrafa foi feito com a tripsinização das mesmas e a suspensão foi ajustada para 100 células/mL. Foram distribuídas 2mL dessa suspensão em cada placa de Petri e incubadas por cerca de 5h para adesão das células. Após esse período o meio de cultura foi removido e nessas placas foram adicionados 5mL do extrato puro e de cada diluição seriada. Na placa de controle de CHO k1 foi adicionado 5mL do meio fresco (RPMI-FCS).

Foram feitas triplicatas de cada concentração dos extratos testados. As placas foram incubadas em estufa úmida com 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  por 7 dias. Decorrido esse tempo o meio foi removido e as colônias formadas foram fixadas em formol 10% em uma solução salina 0,9% e coradas com corante de Giemsa.

As colônias visíveis em cada placa foram contadas e comparadas com o número de colônias da placa controle de CHO k1. O potencial citotóxico do material avaliado foi expresso em índice de citotoxicidade ( $\text{IC}_{50(\%)}$ ), que é a concentração do extrato que suprime em 50% a formação de colônias em relação ao controle.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar, a morte celular foi constatada pela formação de um halo claro ao redor da membrana em teste, que foi medido com uma régua milimétrica e apresentada na Tabela 1. A presença de halo foi observada em todas as membranas exceto na membrana 1, com 0% de SEO, o que pode ser observado também no controle negativo. O controle positivo apresentou o halo máximo, ou seja, toda a área da placa de Petri.

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

Amostras	Medidas dos diâmetros dos halos, em mm.			
	Linhagem celular NCTC L929		Linhagem celular RC-IAL	
Contr. Negat.	0	0	0	0
Contr. Posit.	35	35	35	35
1	0	0	0	0
2	5,0	5,0	5,0	5,0
3	9,0	9,0	9,0	9,0
4	15,0	15,0	25,0	25,0
5	21,0	21,0	35,0	35,0

Na figura 1 são mostradas as placas de Petri do controle negativo e da membrana de PVP-SEO contendo 1,5% de SEO, onde podemos observar que o controle negativo não apresenta halo claro ao redor do material (a) e

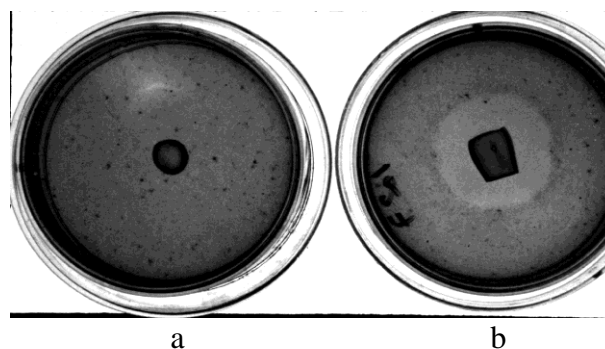


Figura 1: Teste de citotoxicidade pelo método de difusão em ágar.  
a – controle negativo; b – membrana de PVP-SEO com 1,5% de SEO.

No teste de citotoxicidade, pelo ensaio de supressão de colônias, a porcentagem do número de colônias em cada placa de Petri foi calculada em relação à placa controle de CHO k1 e é apresentada na Tabela 2. Através destes dados pode-se calcular quantitativamente o índice de citotoxicidade, projetando-se os valores da Tabela 2 num gráfico. O índice de citotoxicidade representado por  $IC_{50(\%)}$ , é a concentração do extrato do material analisado que inibe em 50% a formação de colônias.

Tabela 2 - Teste de citotoxicidade pela supressão de colônias das membranas de PVP-SEO: contagem do número de colônias de células CHO, em relação à placa controle.

Amostras	% 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

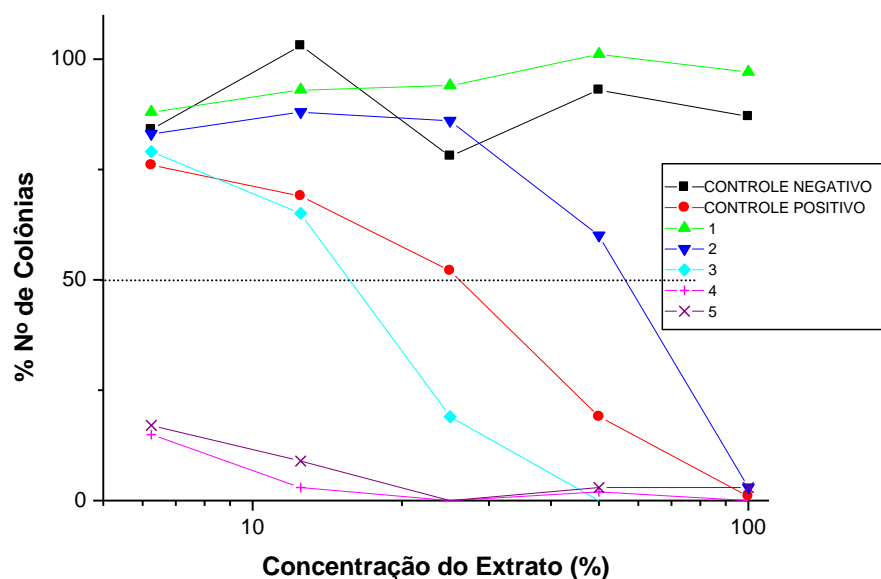


Figura 2: Curva de supressão de colônias. 1- 0% SEO; 2- 0,5% SEO; 3- 1,5% SEO; 4- 3,5% SEO e 5- 4,5% SEO.

Na Fig.2 podemos observar que a membrana de PVP, sem a presença de SEO apresenta  $IC_{50(\%)} > 100$ , indicando não ser citotóxica, como o controle negativo. À medida em que se aumenta a concentração de SEO na formulação, é aumentada a citotoxicidade da membrana.

Observou-se que houve aumento da citotoxicidade em função do aumento da concentração de SEO em ambos os métodos. Estes dados indicam que a adição de SEO na formulação torna as membranas de hidrogel citotóxicas.

#### IV. CONCLUSÃO

Tanto o método de difusão em ágar como o método de supressão de colônias, para o ensaio de citotoxicidade mostrou sensibilidade equivalente, demonstrando que a presença de SEO nas membranas de PVP torna-as citotóxicas.

#### AGRADECIMENTOS

- CNPq pela bolsa de estudos.
- Osi Specialties pelo fornecimento do SEO.
- Ao estudante Luciano Vieira da Costa pela assistência técnica no ensaio de citotoxicidade.

#### REFERÊNCIAS

- [1] Rosiak, J.M.; Olejniczak, J.. *Radiat.Phys.Chem.* v.42, no.4-6, p. 903-906, 1993.
- [2] Henglein, A.. *J.Phys.Chem.* v.63, 1052, 1959 apud Encyclopedia Polymer Science and Engineering 2<sup>o</sup>.Ed. Polyvinylpirrolidone v.17. p. 199-257.
- [3] Chapiro, A.. *Radiat.Phys.Chem.* v.46, no.2, p. 159-160, 1995
- [4] Souza,A; Miranda,A; Hutzler,B; Andrade E Silva, L.G; Nunes,S.P.. Anais do IV Encontro Nacional de Aplicações Nucleares, Poços de Caldas, Minas Gerais, v. 2, p.1252-1255, Agosto, 1997
- [5] International Standard: Biological Evaluation of Medical Devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. ISO 10 993-5, 1992.
- [6] Guess, W.L.; Rosenbluth, S.A.; Schmidt, B. & Autian, J.. *J.Pharm.Sci.*, v.54, p 1545-1547, 1965.
- [7] Cruz, A.S.; Cuppoloni, K.M.; Martinez, C.H.O.; Gomes, L.F.S.. *Rev.Inst.Adolfo Lutz*, v. 47, no.1/2, p 51-57, 1987.
- [8] Cell Culture Test Methods, ASTM STP 810. S.A. Brown Ed. American Society for Testing and Materials, 1983.
- [9] United States Pharmacopea, USP XXIII, Rockville, Twinbook Parkway, v.23, p.97-99, 1995.

- [10] Campos, V. E., Rogero, S. O., Higa, O. Z. And Guedes, S. M. L.. Proceedings of the 5th. Latin American and 3rd. Ibero American Polymer Symposium, Mar del Plata, Argentina, p. 289-299, December, 1996