

Artigo Original

recebido: 05/05/98 e aceito: 17/04/99

**Avaliação da citotoxicidade de
hidrogéis de polihema:
um estudo *in vitro*.**

*Cytotoxicity evaluation for polyhema
hydrogels: an in vitro study.*

**S.M. Malmonge
C.A.C. Zavaglia**

Lab. de Engenharia Biomecânica - CT/UNICAMP
Cx. Postal 6131, CEP 13083-970 - Campinas, SP.
email: malmonge@cte.unicamp.br

A.R. Santos Jr

Departamento de Engenharia de Materiais
FEM/UNICAMP – Cx Postal 6040
Cep.: 13083-970 - Campinas, SP.

M.L.F. Wada

Departamento de Biologia Celular- IB/UNICAMP
Cx. Postal 6109, Cep.: 13083-970 - Campinas, SP.

Resumo

Hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato) reticulado e blendas do tipo redes semi interpenetrantes (SIPN) de poliHEMA com acetato de celulose e poliHEMA com poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico), desenvolvidas objetivando aplicação no reparo de defeitos da cartilagem articular foram submetidas a testes de citotoxicidade *in vitro* usando células VERO. Polipropileno e adevido de silicone foram utilizados como controles negativo e positivo respectivamente. Foi avaliado a morfologia das células crescendo sobre amostras de hidrogéis e sobre lamínulas de vidro, bem como a presença e viabilidade das células presentes nos sobrenadantes (método de exclusão com azul Tripán). Todas as amostras de hidrogéis testadas apresentaram comportamento semelhante ao controle negativo, isto é, não apresentaram efeito citotóxico frente a linhagem celular testada.

Palavras-chave: citotoxicidade, hidrogel, cultura de células

Abstract

Hydrogels of polyHEMA and semi interpenetrating networks of polyHEMA with cellulose acetate or poly(methyl methacrylate-co-acrylic acid) developed aiming articular cartilage repair were submitted to "in vitro" cytotoxicity tests using VERO cells. Polypropylene and silicone adhesive were used as negative and positive control respectively. It was evaluated the morphology of cells growing on material samples and coverslips. The viability of cells presents in sobrenadants was evaluated using the Tripán Blue exclusion method. The behavior of cells on hydrogels was similar to that one presented by the the negative control, without cytotoxicity effect.

Keywords: cytotoxicity, hydrogel, cell culture

Introdução

Hoje em dia, com o crescente uso de biomateriais na prática médica e odontológica, torna-se cada vez mais importante o desenvolvimento e/ou implementação de testes para a avaliação da biocompatibilidade de materiais.

Os testes de citotoxicidade (Black, 1992) representam a fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas, sendo utilizados em uma pré-seleção para detectar se o material em questão provoca morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares. Diferentes métodos tem sido desenvolvidos e padronizados (Kirkpatrick, 1992), porém dependendo da especificidade do material, algumas adaptações devem ser feitas para que se possa tirar bons resultados da aplicação do teste.

Utilizam técnicas *in vitro* para identificar efeitos adversos que biomateriais ou dispositivos médicos em potencial possam acarretar à células, de maneira a torná-los impróprios para uso como tal. Para ser aprovado num teste de citotoxicidade *in vitro*, um material não deve causar a morte das células nem afetar suas funções celulares. Assim sendo, com o uso de técnicas de cultura de células (Freshney, 1989), os testes podem detectar se ocorre a lise das células, a inibição do crescimento celular e outros efeitos que possam ser causados nas células pelo material e/ou extrato oriundo do material.

Existem dois tipos de testes *in vitro*: métodos de contato direto e métodos de contato indireto. No primeiro, as células são colocadas em contato com o material em teste, sendo normalmente semeadas na forma de uma suspensão celular sobre o material. Já os métodos de contato indireto podem ser divididos em dois tipos: aqueles em que o material a ser testado é separado das células por uma barreira de difusão (ágar ou agarose) e o segundo tipo no qual substâncias são extraídas do material a ser testado, através de um solvente e colocada em contato com as células.

Normalmente utilizam-se nestes testes células de linhagens estabelecidas, devido a facilidade de obtenção e manutenção em laboratório (Northup, 1986). As linhagens celulares mais recomendadas para testes de citotoxicidade são a NTC clone 929, a Balb/3T3 clone A31; a MRC-5 a WI-38, a VERO, a BHK-21 e a V-79. Além destas, outras linhagens podem ser utilizadas se for possível demonstrar que os resultados obtidos são semelhantes (ISO 10993-5, 1992).

A avaliação da citotoxicidade pode ser feita através da análise da morfologia celular, da integridade da

membrana celular (pela utilização de métodos com corantes vitais ou não), da proliferação celular, de atividade biossintética, etc (Freshney, 1989).

Existem diferentes protocolos padrões já estabelecidos para os testes de citotoxicidade, dentre os quais podem ser citados:

- ASTM F-813-83 - Método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células;
- ASTM F-895-84 - Método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade;
- ISO 10993-5 - Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Testes para citotoxicidade: métodos *in vitro*.

Além de aspectos referentes ao procedimento, os padrões normalmente especificam a linhagem celular, o meio de cultura e as técnicas para avaliação da citotoxicidade. Além disso, todos os protocolos padrões prevêm a utilização e especificam materiais a serem utilizados como controles positivo e negativo. Controle positivo é uma substância que apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível e controle negativo é o material ou substância que não produza efeito citotóxico.

Este trabalho relata uma das etapas de um estudo que vem sendo realizado visando o desenvolvimento de hidrogéis de poli(2-hidróxi etil metacrilato) - poliHEMA para aplicação no reparo de defeitos da cartilagem articular (Malmonge, 1997). Com o objetivo de obter um biomaterial capaz de mimetizar o comportamento mecânico da cartilagem articular natural, numa primeira etapa do estudo, diferentes hidrogéis foram sintetizados e caracterizados quanto ao comportamento mecânico (Malmonge & Zavaglia, 1997). Nesta etapa do estudo, amostras de três hidrogéis obtidos a base de poliHEMA foram submetidos a ensaio de citotoxicidade, conforme descrito a seguir.

Materiais e Métodos

Material

Foram submetidas ao ensaio três amostras de hidrogéis: poliHEMA reticulado, blenda de poliHEMA com acetato de celulose (AC) e blenda de poliHEMA com poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico) (poliMMA-co-AA). Os hidrogéis foram sintetizados por polimerização térmica conforme já descrito em trabalho anterior (Malmonge, 1997; Malmonge & Zavaglia, 1997).

- amostra A: poliHEMA reticulado (3.0% AR)

- amostra B : blenda poliHEMA - AC
- amostra C : blenda poliHEMA - poli(MMA-co-AA)

Como controle positivo foi utilizado filme obtido a partir de adesivo de silicone (Rhodiastic) e como controle negativo foi utilizado fragmento de placas de polipropileno. Tanto as amostras quanto os controles foram preparados na forma de discos com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura, e a seguir lavados várias vezes com solução salina (NaCl 0.9%) e esterilizadas em autoclave a 120° C por 30 min. Cada amostra do material foi colocada sobre uma lâminula de vidro no interior de tubos de Leighton (figura 1) e mantidos com meio Ham F 10, com 10% de soro fetal bovino (SFB) por 12 horas a 37° C, antes de receberem o inóculo celular.

Células

Células da linhagem VERO provenientes do Instituto Adolfo Lutz - SP, foram mantidas rotineiramente em meio Ham F 10 com 10% de SFB com repiques sendo efetuados sempre que a cultura atingiu a confluência. Aliquotas de 1 ml de uma suspensão celular em meio de cultivo contendo 10^5 células/ml foi inoculada em cada tubo de Leighton (figura 1), após a retirada do meio de lavagem. Os frascos foram mantidos a 37° C por 48 horas.

O experimento foi efetuado em triplicata, isto é 3 frascos de cultura por amostra, inclusive para os controles positivo e negativo.

Avaliação da citotoxicidade

Viabilidade celular (método de exclusão pelo Azul Tripán) - após 48 horas de incubação, amostras do meio de cultura em cada frasco foram coletadas, diluídas 1:1 em solução de Azul Tripán 0,1 % em salina 0.9 % e as

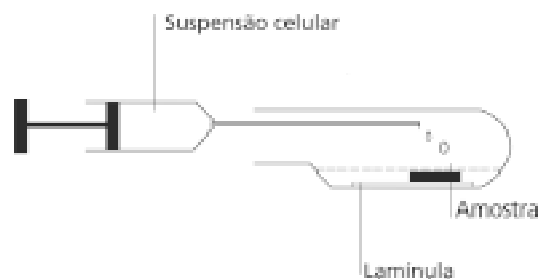


Figura 1: Esquema ilustrando o inóculo das células sobre a lâminula de vidro e amostra contidos em frasco de Leighton.

células viáveis e não viáveis presentes no meio de cultura foram contadas em câmara de Neubauer.

Morfologia das células - Os discos e as lâminulas foram retirados dos tubos de Leighton, fixados em metanol:ácido acético (3:1), lavados rapidamente em metanol e secos ao ar. A seguir foram corados com cresil violeta 0,25% por 15 min, lavados em água, secos ao ar, diafanizados em xilol e montados sobre lâminas de vidro com Entelan (Merck) para observação ao microscópio.

Resultados e Discussão

O material utilizado como controle positivo, adesivo de silicone apresentou efeito citotóxico extremamente forte, após 48 h de cultura, pois praticamente não restaram células viáveis sobre as amostras e nem mesmo sobre as respectivas lâminulas. Na figura 3 podem ser observados aspectos degenerados das poucas células que permaneceram sobre o material ou lâminula. Para todos os frascos de cultura contendo o material controle positivo, foram detectadas células não viáveis em suspensão no meio de cultivo (figura 2)

Já no caso do controle negativo, fragmentos de placa de polipropileno, as células cresceram normalmente, tanto sobre as amostras quanto nas respectivas lâminulas (figura 4). A análise do meio de cultivo destes frascos mostrou ausência de células não viáveis em suspensão.

Conforme pode ser observado nas figuras 5,6 e 7, a morfologia das células crescendo sobre as lâminulas que foram incubadas junto com as amostras dos hidrogéis e as células que cresceram sobre as amostras dos diferentes hidrogéis não mostram alterações morfológicas acentuadas quando comparadas com o

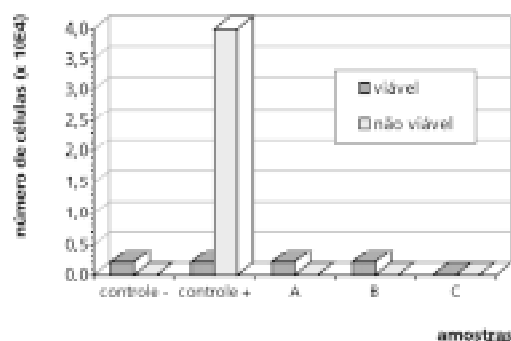


Figura 2: Quantidade de células em suspensão no meio de cultura (resultados representam a média de 3 amostras para cada frasco).

controle negativo (figura 4). Isto demonstra que os hidrogéis não exercem efeito citotóxico para as células que crescem sobre eles e não liberam substâncias tóxicas para o meio. A presença de células com morfologia um pouco mais alongada, que podem ser observadas (figuras 5b, 6b e 7b), crescendo sobre os hidrogéis é apenas resposta biológica das células VERO, pois as mesmas apresentam a característica de mudar de forma e/ou função *in vitro* de acordo com o substrato na qual estão aderidas (Wada & Vidal, 1991). Quanto a presença de células viáveis em suspensão no meio de cultura de algumas das amostras de hidrogel (figura 2), é fato considerado normal, pois as células que crescem em monocamada tornam-se redondas quando entram em processo de divisão celular, ficando menos aderidas ao substrato e podendo ser facilmente descoladas pelo manuseio do frasco de cultura (Adams, 1990).

A não citotoxicidade das amostras testadas pode ser concluída tendo em vista que apesar de menor número de células presentes sobre o substrato (hidrogel), em relação ao número de células presentes nas lamínulas, foi possível detectar células em processo de divisão e consequente proliferação celular. Além disso, as células que cresceram sobre as lamínulas em todos os casos apresentaram comportamento típico de células VERO.

Pode-se verificar que a adesão celular foi menor para as amostras de hidrogéis do que para as lamínulas de vidro. Além disso, a blenda de poliHEMA-poli(MMA-co-AA) apresentou a menor adesão celular entre os três hidrogéis testados. Segundo Folkman & Moscona (1978), apesar de não apresentar efeito citotóxico, o poliHEMA inibe a adesão celular. Segundo estes autores, o recobrimento de substratos com camadas de poliHEMA com diferentes espessuras podem modular tanto a extensão do espalhamento quanto o metabolismo celular.

Sabe-se que adesão e proliferação celular de diferentes tipos de células sobre substratos poliméricos

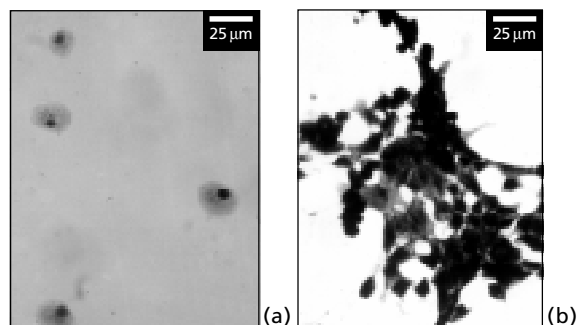


Figura 3: controle positivo, (a) material, (b) lamínula

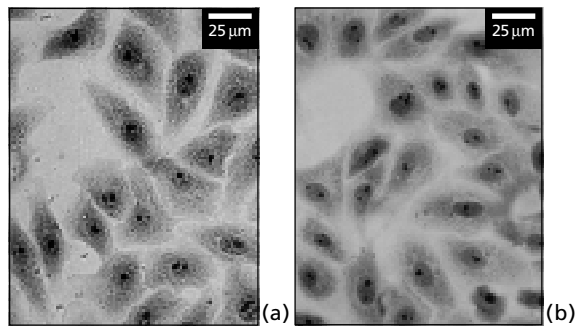


Figura 4: controle negativo, (a) material, (b) lamínula

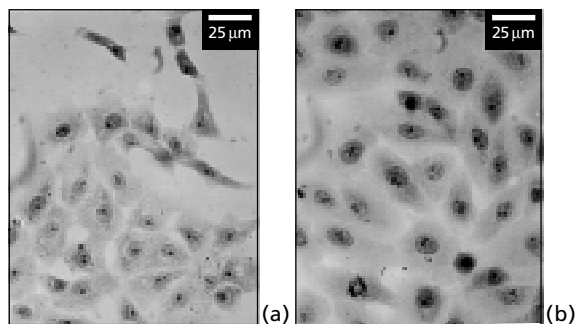


Figura 5: poliHEMA: (a) material, (b) lamínula

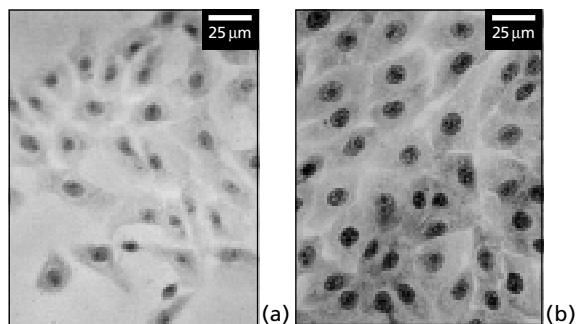


Figura 6: poliHEMA-AC: (a) material, (b) lamínula

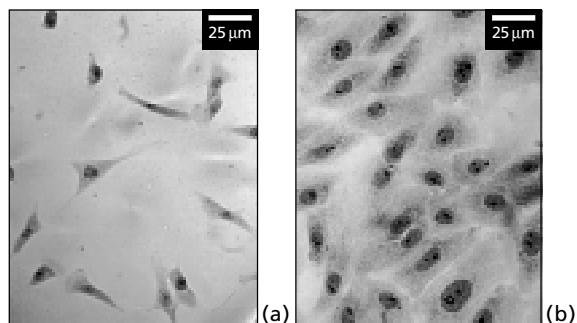


Figura 7: poliHEMA-poli(MMA-co-AA): (a) material, (b) lamínula

dependem das características de superfície de tais materiais tais como: molhabilidade, presença de grupamentos químicos específicos, carga, rugosidade e rigidez. Um grande número de pesquisadores vem estudando a interação entre diferentes tipos de células

in vitro e polímeros com diferentes características superficiais (Lydon e cols, 1985; Horbett e cols., 1988; Smetana, 1993 e Lee e cols., 1994).

Segundo Lee e colaboradores (1994), para superfícies com molhabilidade, rugosidade e rigidez semelhantes, aqueles que são positivamente carregados são mais propícios para a adesão, espalhamento e crescimento celular *in vitro* do que aqueles que são negativamente carregados ou mesmo neutros. Ainda segundo o autor, algumas proteínas presentes no meio de cultura como fibronectina e vitronectina, as quais exercem grande influência na adesão celular são mais facilmente adsorvidas nas superfícies positivamente carregadas, melhorando assim a adesão celular. Ainda segundo estes autores, a presença de grupamentos ácido carboxílico exerce efeito negativo na adesão, espalhamento e crescimento celular.

Smetana (1993), e Lio e colaboradores (1994), mostram que materiais positivamente carregados induzem a adesão celular, ao contrário dos materiais negativamente carregados. A hipótese levantada por Smetana é de que interações eletrostáticas entre a membrana celular e o substrato representam um dos mecanismos de adesão celular ao substrato, uma vez que as glicoproteínas presentes na membrana celular são negativamente carregadas. Recentemente, vários pesquisadores tem verificado a importância das glicoproteínas, em particular a fibronectina, na adesão e espalhamento celular (Culp, 1978 e Grinnel & Feld, 1981).

Assim, para a blenda de poliHEMA-poli(MMA-co-AA), a presença de grupamentos (COOH), provenientes do ácido acrílico os quais no meio de cultura encontram-se ionizados, constituem cargas negativas fixas a matriz, o que provavelmente leva a diminuição da adesão celular por mimetizar os estímulos normalmente fornecidos pelas glicoproteínas presentes na matriz extracelular dos tecidos.

O fato de um substrato apresentar menor adesão celular *in vitro* não significa que sua biocompatibilidade seja menor. Ao contrário, alguns autores acreditam que a presença de grupos (COOH) em hidrogéis não reabsorvíveis diminuem a interação do material com macrófagos, sendo portanto mais interessantes para algumas aplicações clínicas (Smetana, 1993 e Smetana, 1990).

Segundo Smetana (1993), as propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas de polímeros e a ocorrência de grupos funcionais carregados podem influenciar a interação das células com o substrato e conseqüentemente a função celular. Os autores relatam ainda que

a presença de grupos ácido carboxílico (COOH) no hidrogel, semelhante ao que ocorre na matriz extracelular natural, permite a este polímero participar no controle da função celular, mimetizando os estímulos normalmente realizados pela matriz extracelular natural.

Conclusões

A metodologia utilizada mostrou-se adequada para a determinação da citotoxicidade de hidrogéis.

Hidrogéis de poliHEMA reticulado, bem como de blendas de poliHEMA-AC e poliHEMA-poli(MMA-co-AA), não apresentaram efeitos citotóxicos frente a cultura de células VERO *in vitro*.

Agradecimentos

Ao CNPq e FAPESP (processo nº 96/10201-6), pelo apoio financeiro e ao DEMA/FEM/UNICAMP pelo apoio e infraestrutura.

Referências

- Adams, R.L.P. (1990). *Cell culture for biochemists*. Amsterdam, Elsevier.
- Black, J. (1992). "Biological performance of material". In: *Fundamentals of Biocompatibility*, Marcel Dekker, NY.
- Culp, R.C. (1978). "Biochemical determinants of cell adhesion". *Curr. Top. Membr. Transp.*, v. 2, p. 327-396.
- Folkman, J. and Moscona, A. (1978). "Role of cell shape in growth control". *Nature*, v. 273, p. 345-349.
- Freshney, R. I.(1989). *Animal cell culture - A practical approach*, IRL Press.
- Grinnel, F. and Feld, M.K. (1981). "Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity". *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 15, p. 363-381.
- Horbett, T.A., Waldburger, J.J., Ratner, B. D. and Hoffman, A.S. (1988). "Cell adhesion to a series of hydrophilic-hydrophobic copolymers studied with a spinning disc apparatus". *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 22, p. 383-404.
- Kirkpatrick, C.J. (1992). "Biological testing of materials and medical devices - A critical review of current and proposed methodologies for biocompatibility testing cytotoxicity *in vitro*". *Regulatory Affairs*, 4, p. 13-32.
- Lee, J.H., Jung, H.W., Kang, I.K. and Lee, H.B. (1994). "Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups". *Biomaterials*, v. 15, n. 9, p. 705-711.
- Lio, K., Minoura, N., Aiba, S., Nagura, M. and Kodama, M. (1994). "Cell growth on poly(vinyl alcohol) hydrogel membranes containing biguanido groups". *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 28, p. 459-462.
- Lydon, M.J., Minett, T. W. and Tighe, B. J. (1985). "Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture" *Biomaterials*, v. 6, p. 396-402.
- Malmonge, S.M., (1997). *Hidrogéis sintéticos para reparo de defeitos da cartilagem articular*. Tese de Doutorado, FECC/Unicamp, Campinas, fev.

- Malmonge, S.M. e Zavaglia, C.A.C. (1997). "Hidrogéis sintéticos para reparo de defeitos da cartilagem articular - Comportamento mecânico a partir de ensaios de indentação". *Revista Polímeros: Ciência e Tecnologia*, n. 2. abr/jun, p. 22-29.
- Northup, S.J.(1992). "Mammalian cell culture models in Handbook of Biomaterials Evaluation" In: *Scientific, technical and clinical testing of implant material*, Ed.: A.F. von Recun, p. 209-225, 1986. [cit. in Kirkpatrick, 1992.]
- Smetana, K. (1990). "The influence of hydrogel functional groups on cell behaviour". *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 24, p. 463-470.
- Smetana, K. (1993). "Cell biology of hydrogels". *Biomaterials*, v. 14, n. 14, p. 1046-1050.
- Wada, M.L.F. and Vidal, B.C. (1991). "Growth and differentiation of Vero cells cultured in three-dimensional type I collagen". *Cylobios*, v. 67 p. 101-109.