



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones Científicas  
Cuba

Ríos Hernández, Miriam; Cepero Cañas, Janet  
Citotoxicidad in vitro: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en  
Cuba

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 37, núm. 3, 2006, pp. 173-176

Centro Nacional de Investigaciones Científicas  
Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220529011>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Citotoxicidad *in vitro*: sistema para la evaluación de biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba

Miriam Ríos Hernández y Janet Cepero Cañas.\*

Ensayos Preclínicos, Centro de Control Estatal de Equipos Médicos, Calle 4 No. 455 entre 19 y 21, El Vedado, Plaza de la Revolución, Código Postal 10400. ([mrrios@infomed.sld.cu](mailto:mrrios@infomed.sld.cu)). \*Laboratorio de Inmunofarmacología, Instituto de Oncología y Radiobiología.

Recibido: 14 de mayo de 2003. Aceptado: 9 de febrero de 2004.

Palabras clave: citotoxicidad *in vitro*, biocompatibilidad, biomateriales, equipos médicos, iso 10993-5, materiales de referencia.  
Key words: *in vitro* cytotoxicity, biocompatibility, biomaterials, medical devices, ISO 10993-5, reference materials.

**RESUMEN.** Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se incluyen en los estudios de la primera fase de evaluación de los biomateriales y equipos médicos implantables. La evaluación citotóxica constituye una vía simple, rápida y económica para obtener una valiosa información acerca de la biocompatibilidad de los biomateriales. Con el objetivo de establecer el sistema de evaluación de la citotoxicidad *in vitro* para estos materiales en Cuba y seleccionar el ensayo más conveniente, se evaluaron tres métodos recomendados en la Norma ISO 10993-5, 1999: Elución de extractos, difusión en agar y contacto directo. Se evaluaron tres materiales de referencia japoneses (A y B, positivos y C negativo) donados por el Instituto de Hatano de Japón y se compararon los resultados con los del estudio de validación interlaboratorio para estos materiales coordinado por el grupo ISO TC 194/WG5, en el período 1997-1998 y con los del método de contacto directo referido por HR Stanley en el reporte técnico de 1984. No hubo diferencias entre los resultados de citotoxicidad obtenidos a través de los ensayos propuestos por la ISO 10993-5 y los obtenidos en nuestro laboratorio, estando dentro de la media de los parámetros del estudio de validación de los materiales de referencia japoneses. Los métodos de citotoxicidad por contacto directo tienen múltiples ventajas.

**ABSTRACT.** *In vitro* cytotoxicity assays are included in the first phase evaluation studies of biomaterials and implant medical devices. Cytotoxicity evaluation is a simple, fast and economical way to obtain a valuable information about the biocompatibility of biomaterials. The establishment of the *in vitro* cytotoxicity evaluation system of these kinds of materials in Cuba and selection of more suitable assay were the main objectives of this work. In order to carry out these objectives three methods recommended by ISO 10993-5: 1999 were evaluated: Extracts elution, agar diffusion and direct contact. Three reference materials donated by Hatano Institute of Japan were evaluated (A, B positives and C negative) and these results were compared with the interlaboratory validation Study of these materials, coordinated by ISO TC 194/ WG5 group in the 1997-1998 period and with the direct contact assay referred by Stanley HR in the technical report of 1984. The cytotoxicity results obtained by the ISO assays did not have any difference with our results and these were between the media parameters of validation study of these reference materials. Direct contact cytotoxicity assays have considerable advantages.

## INTRODUCCION

El desarrollo de los biomateriales, considerando el sensible ambiente biológico al que están destinados, requiere conocimientos de todos los campos de las ciencias naturales y de los métodos de manufactura. La evaluación citotóxica es uno de los estudios *in vitro* usados más comúnmente para determinar la biocompatibilidad de un material y presenta una correspondencia de un 97 % con los ensayos de implantación. Es un estudio simple, rápido y económico que proporciona una valiosa información de los materiales que deben ser descartados o aquellos que deben ser sometidos a más estudios. Se han empleado muchos métodos para determinar la citotoxicidad de los biomateriales y equipos médicos implantables, estos consisten en observar la inhibición del crecimiento celular o registrar el daño o muerte celular. Las pruebas de citotoxicidad empleadas con más frecuencia incluyen: citotoxicidad por contacto directo (tinción con colorantes vitales y liberación de cromo radiactivo) e indirecto (extendido en agar, elución de extractos, método de filtro miliporo, entre otros).<sup>1-3</sup>

Con el objetivo de establecer el sistema de evaluación de la citotoxicidad *in vitro* para los biomateriales y equipos médicos implantables en Cuba, se evaluaron tres métodos de ensayo recomendados en la Norma ISO 10993-5: 1999. Elución de líquidos

citotoxicidad. Métodos *in vitro*.<sup>2</sup> Los métodos seleccionados fueron: método de elución de extractos, contacto indirecto por difusión en agar y contacto directo con tinción con colorantes y liberación de <sup>51</sup>Cr. Para el análisis de estos ensayos se evaluaron tres materiales de referencia japoneses (A y B positivos y C negativo) donados por el Instituto de Hatano, Japón y se compararon los resultados con los del Estudio de Validación Interlaboratorio para estos materiales coordinado por el grupo ISO TC 194/WG5, en el período de junio 1997 a mayo 1998 y el método propuesto por H.R. Stanley para la evaluación de materiales dentales en el Technical Report.<sup>4-6</sup>

## MATERIALES Y METODOS

### Patrones positivos

Material de referencia A. Lámina de poliuretano con 0,1 % de dietilditiocarbamato de zinc (ZDEC).

Material de Referencia B. Lámina de poliuretano con 0,25 % de dietilditiocarbamato de zinc (ZDBC)

### Patrón negativo

Material de referencia C. Lámina de poliuretano de elevada densidad.

### Ensayo de citotoxicidad por elución de extractos

Los materiales de referencia se cortaron en pequeñas piezas (10 mm x 50 mm) y se esterilizaron durante 15 min a 121 °C y 1,5 atm. La extracción (6 cm<sup>2</sup>/mL) se realizó en medio RPMI con 10 % de SFB a 37 °C durante 24 h. El extracto original se definió como el 100 %, al mismo tiempo, se hizo el control (blanco), se prepararon diferentes diluciones: 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32.

La línea celular L-929 (fibroblasto de ratón) fue sembrada en placas de 24 pozos a una concentración de  $5,2 \cdot 10^4$  células/ 0,5 mL/pozo que se incubaron a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se decantó el medio de cultivo y se reemplazó con 0,5 mL de las diferentes concentraciones del extracto o del blanco, respectivamente, incubándose después por períodos de 24 y 72 h. Al concluir cada tiempo las células se trataron con tripsina-EDTA, se tiñeron con tripán azul y se contaron en cámara de Neubauer para la evaluación de la citotoxicidad. Este ensayo permite evaluar la citotoxicidad de forma cuantitativa y cualitativa, registrando la muerte celular y evaluando el

tracción de los extractos y controles. Se graficó la supervivencia relativa respecto al control contra la concentración del extracto y se halló el índice de citotoxicidad medio (IC<sub>50</sub>).

### Método de difusión en agar

Este ensayo permite una evaluación cualitativa de la citotoxicidad, no es apropiado para productos migrables que no difundan a través de la capa de agar, o que puedan reaccionar con él. Las células L-929 fueron sembradas en placas Petri de 35 mm a una concentración de  $2,6 \cdot 10^6$  células en un volumen de 2 mL/placa y se incubaron durante 24 h a (37 ± 2) °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se decantó el medio de cultivo, reemplazándose por 2 mL de medio fresco, se esterilizó el agar noble (3 %) en autoclave a 121 °C durante 15 min, enfriándose luego y se calentó el medio RPMI a 45 °C que se mezcló con el agar y se enfrió a 39 °C. Se aspiró el medio de los cultivos y se repuso con 2 mL de medio con agar.

Se colocaron las placas Petri en una superficie plana para que solidificaran a temperatura ambiente y luego, se colocaron muestras de los patrones (1 cm<sup>2</sup>) en contacto con la superficie del agar en cada placa por triplicado. Se incubaron todos los cultivos durante 24 h, posteriormente, se añadió 2 mL de una disolución de rojo neutro a cada placa, se incubó durante 1 h y se examinaron los cultivos, abajo y alrededor de las muestras. Se evaluó la citotoxicidad de las células antes y después de retirar cuidadosamente los artículos de ensayo del agar. Se determinó el índice de zona o de decoloración que mide la zona clara donde las células no están teñidas con el rojo neutro y el índice de lisis que mide el número de células afectadas dentro de la zona de citotoxicidad (reactividad). El cultivo celular presenta efectos citotóxicos si el examen microscópico revela malformación, degeneración, desprendimiento o lisis de las células dentro de la zona, o una moderada a severa reducción en la densidad de la capa celular. Se determinó el grado de reactividad para cada material de referencia de acuerdo a la clasificación propuesta en la ASTM, 1990.<sup>7</sup>

### Ensayo de citotoxicidad por contacto directo con tinción con Tripán azul<sup>3,4</sup>

Las células L-929 fueron sembra-

ron las muestras de los materiales de referencia (1 cm<sup>2</sup>) en el centro de cada placa por triplicado y todos los cultivos fueron incubados durante 24 y 72 h a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Se retiraron las muestras cuidadosamente después de transcurrido el tiempo de incubación y se observaron las placas al microscopio para analizar la morfología. Se extrajo el medio de cultivo y se despegaron las células con tripsina- EDTA y a continuación, se realizó el conteo en cámara de Neubauer por tinción con tripán azul. Se calculó la media de células viables para cada material de referencia y se halló el índice de citotoxicidad (IC).

### Método de citotoxicidad por contacto directo referido por HR Stanley<sup>5,6</sup>

Las células L-929 en fase de crecimiento logarítmico se ajustaron a una concentración de 10<sup>6</sup> células/mL, se marcaron con 1,5 mCi de dicromato de sodio (<sup>51</sup>Cr) y se incubaron durante 24 h a temperatura de 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron tres veces con medio RPMI sin suero, posteriormente se colectaron del frasco con Tripsina- EDTA al 0,25 %, resuspendiéndose en Medio RPMI completo al final de los lavados. Se determinó la viabilidad celular y el número de células por conteo con tripán azul en cámara de Neubauer. La suspensión de células marcadas con <sup>51</sup>Cr se preparó a una concentración de  $5 \cdot 10^4$  células viables/mL.

Se adicionó 1 mL de la suspensión celular marcada con <sup>51</sup>Cr a las placas de cultivo donde habían sido polimerizados o depositados previamente los artículos de ensayo por triplicado. Se emplearon cuatro placas para cada tiempo de polimerización a evaluar (30 min y 24 h). En cada caso se evaluaron dos tiempos de contacto del material con las células y se incubaron durante 4 y 24 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> en atmósfera húmeda. Al final del período de incubación, se colectó 1 mL de sobrenadante de cada pozo. Los tubos se centrifugaron a 2 500 r/min durante 10 min a temperatura ambiente, se transfirieron 0,5 mL de sobrenadante de cada uno a tubos LP3 para el conteo de la radioactividad en contador Gamma LKB, durante 10 min/tubo.

Se utilizaron como control negativo  $5 \cdot 10^4$  células en 2 mL de medio (cinco réplicas) y como control posi-

que se les añadieron 0,2 mL de fenol al 6,4 % (cinco réplicas). Se añadieron 1,5 mL de medio con 0,5  $\mu$ Ci de  $^{51}\text{Cr}$  a cinco pozos de cultivo con la muestra polimerizada para tener un control de unión de  $^{51}\text{Cr}$  al material de ensayo y se contó antes y después de la incubación. Para el conteo de la liberación espontánea de  $^{51}\text{Cr}$  se midió la radioactividad de cuatro réplicas de 0,5 mL de la suspensión celular marcada en tubos LP3.

Se determinó el índice de citotoxicidad (IC) según la expresión:

$$IC = \frac{M - C}{T - C} \cdot 100$$

donde:

M promedio del material de prueba (cpm).

C promedio del control negativo (cpm).

T promedio de la liberación total (cpm).

## RESULTADOS Y DISCUSION

No se encontraron diferencias en los resultados de citotoxicidad de los materiales de referencia japoneses evaluada a través de los ensayos propuestos por la ISO 10993-5 y los obtenidos en el laboratorio (Tablas 1, 2 y 3), estando los valores obtenidos dentro de la media del estudio de validación para este tipo de materiales.

A través del método de contacto directo descrito por HR Stanley se clasificó el material SRM-A como moderadamente citotóxico, ya que la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  en el ensayo de 24 h con el material endurecido no excedió el doble de la media de los controles negativos; el SRM-B se clasificó como ligeramente citotóxico, ya que la liberación de  $^{51}\text{Cr}$  no difirió significativamente (1 %) de los controles negativos en el ensayo de 4 h y no excedió el doble de la media de los controles negativos en el ensayo de 24 h, ambos con el material fresco y el SRM-C fue considerado como no citotóxico, lo que concuerda con los resultados del estudio de validación interlaboratorios y con los resultados obtenidos en el estudio con los otros métodos de ensayo.<sup>4,6</sup> En el ensayo de difusión en agar se obtuvo un grado de reactividad 2 que se corresponde con una zona de decoloración extendida menos de 0,5 cm alrededor de la muestra y de un 20 al 39 % de zona de citotoxicidad (reactividad).<sup>7</sup>

A partir de este estudio compa-

**Tabla 1.** Índice de citotoxicidad medio ( $\text{IC}_{50}$ ) obtenidos en el ensayo de citotoxicidad por elución de extractos.

Material de referencia	Tratamiento (h)	$\text{IC}_{50}$ (Media)	$\text{IC}_{50}$ media (TC194/WG5)
A (Positivo)	24	24,6	19,4
	72	20,3	20,7
B (Positivo)	24	44,4	39,0
	72	43,5	38,7
C (Negativo)	24	97,7	>100
	72	98,3	>100

**Tabla 2.** Grados de reactividad obtenidos en el ensayo de citotoxicidad por difusión en agar.

Material de referencia	Grado de reactividad	Laboratorio 1 (TC194/WG5)	Laboratorio 2 (TC194/WG5)
A (Positivo)	2	2	2
B (Positivo)	2	2	1
C (Negativo)	0	0	0

**Tabla 3.** Índice de citotoxicidad (IC) obtenidos en el ensayo de citotoxicidad por contacto directo.

Material de referencia	Tratamiento (h)	IC media	IC media (TC194/WG5)	Clasificación (Método de Stanley)
A (Positivo)	24	41,4	41,8	Moderadamente citotóxico
	72	36,1	33,4	
B (Positivo)	24	64,4	72,8	Ligeramente citotóxico
	72	72,7	61,1	
C (Negativo)		NT	NT	NT

NT No probado. La lámina del material flotaba en el medio de cultivo y no se ponía en contacto con las células.

el descrito por Stanley se puede plantear que en el método de elución de extractos se evalúa el extracto (migrable) por separado, se puede observar el efecto de dosis/respuesta, se extiende el tiempo de exposición a las células y se pueden utilizar diferentes disolventes, pero tiene como desventaja el tiempo adicional que emplea y algunos pasos de la evaluación, además, no se puede determinar el efecto global del material sobre las células.

En el método de difusión en agar se elimina la preparación de los extractos y permite observar una zona de difusión que es independiente de la densidad del material, se puede evaluar un lado del material. Este método tiene como desventajas que requiere una superficie plana para montar las placas, que la sustancia a ensayar debe migrar a través del agar, el riesgo de un choque térmico

las células, además, el tiempo de exposición es limitado y al igual que el ensayo de elución de extractos, no se puede saber lo que le sucede desde el punto de vista morfológico a las células cuando entran en contacto con el material.

Comparativamente con los métodos anteriores, los de contacto directo tienen como ventajas que eliminan la preparación de extractos, se puede evaluar el efecto directo del material en contacto con las células sembradas, por tanto mimetiza las condiciones fisiológicas y se puede extender el tiempo de exposición. Como desventajas de estos métodos se pueden señalar la disminución de la población celular con materiales muy tóxicos y que se puede ocasionar trauma celular si el material es muy denso o se mueve.

El método propuesto por Stanley, que es también un ensayo de contac-

mismas ventajas generales señaladas anteriormente, además de que en él se emplea mayor número de réplicas del producto, no se ocasiona trauma celular si el material es muy denso, ya que las células se siembran encima del mismo y como polimeriza en el fondo del pozo no se mueve. Como desventaja se tiene que se puede presentar una disminución de la población celular con materiales muy tóxicos, no se puede observar la morfología celular si el material es opaco y el riesgo a la salud asociado al uso de isótopos radioactivos.

Los aspectos discutidos están de acuerdo con lo reportado para estos métodos de ensayo.

#### CONCLUSIONES

En general, los métodos de citotoxicidad por contacto directo tienen ventajas considerables respecto a los

otros métodos de citotoxicidad *in vitro* y se pueden llegar a reproducir las condiciones fisiológicas con mucha aproximación, por lo que los resultados resultan muy repetitivos.

#### AGRADECIMIENTOS

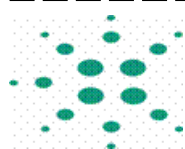
A la Dra. Noriho Tanaka, del Instituto de Investigación de *Hatano*, Japón, quien es jefa del Proyecto de Validación de Estándares y Miembro del Comité Técnico 194 de la International Standard Organization por la donación al laboratorio de los autores de los materiales de referencia japoneses empleados en el estudio.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Northup S.J. Cytotoxicity Test of Plastics and Elastomers. Stimuli to the revision process. Pharmacopoeial Forum, 2939-40, September-October, 1987.
2. Northup S.J. Current Problems Associated with Toxicity Evaluation of

Medical Device Materials and Future Research Needs. **Fundamental and Applied Toxicology**, 13, 196-204, 1989.

3. ISO/FDIS 10993-5:1999. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Test for *in vitro* cytotoxicity.
4. ISO Summary Report. The TC194/WG5 Validation Study for the Japanese Reference Materials on Cytotoxicity Testing, 1-22, 1998.
5. ISO Technical Report 7405:1984. Biological evaluation of dental materials. *In vitro* cytotoxicity test (chromium release method). ISO/TR: 7405-1984 (E), 23-25.
6. Stanley H.R. Initial test for biological evaluation of dental materials. Toxicity Testing of Dental Materials, Chapter 3 Cytotoxicity Test, CRC, Press Inc, 13-17, 1985.
7. ASTM. Annual Book, ASTM Standards. ASTM Designation: F 895-84. Standard Test Method for Agar Diffusion cell culture Screening for Cytotoxicity, American Society for Testing and Materials, 1990.



## RESULTADOS CIENTIFICOS DESTACADOS MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR DE CUBA

### UTILIZACION DE FILTRADOS DE CULTIVO PARA LA DIFERENCIACION A NIVEL FOLIAR DE LA RESISTENCIA A *Fusarium oxysporum* F. sp. Cubense RAZA 1 EN EL CULTIVO DEL BANANO

Centro de Bioplantas, Universidad de Ciego de Ávila  
Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales

En Cuba, los bananos y plátanos constituyen uno de los principales cultivos para lograr el equilibrio de productos en el mercado. Sin embargo, las enfermedades representan uno de los problemas más serios para la producción de estos cultivos. El mal de Panamá o fusariosis del banano causada por *Fusarium oxysporum* F. sp. Cubense representa una de las enfermedades más destructivas y de importancia económica en el género *Musa*. El control de esta enfermedad con el uso de agroquímicos resulta costoso y causa serios daños al medio ambiente. Por esta razón, se ha considerado el mejoramiento genético de la resistencia como la solución más adecuada. Es por ello, que desde la aparición del mal de Panamá en Cuba y en los diferentes países productores se desarrolla un amplio programa de mejoramiento genético para la resistencia a este patógeno, mediante técnicas convencionales y biotecnológicas. Sin embargo, los sistemas de selección de la resistencia del banano a *Fusarium oxysporum* F. sp. cubense raza 1 en el campo consumen mucho tiempo, son costosos y dependen de variaciones en la abundancia del inóculo y de factores climáticos relacionados con la diseminación, infección y el desarrollo de la enfermedad.

A partir de las consideraciones anteriores por vez primera a nivel internacional, se desarrolló un método para la diferenciación a nivel foliar de la resistencia del banano a *Fusarium oxysporum* F. s.p. Cubense raza 1 mediante la aplicación de filtrados del cultivo del hongo, el cual constituye una herramienta útil para incrementar la eficiencia de la selección en condiciones *ex vitro*, sin tener en cuenta las condiciones ambientales y la época del año favorable para el desarrollo de la enfermedad. También permite evaluar un número importante de muestras en condiciones de laboratorio y acelerar los programas de mejoramiento genético a esta enfermedad.

El resultado recibió Premio de la delegación provincial del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, 2005.