

CULTURAS CELULARES NA DETECÇÃO DA TOXICIDADE DE MATERIAIS MÉDICO-HOSPITALARES E OUTROS QUE ENTRAM EM CONTATO COM O SER HUMANO*

Áurea Silveira CRUZ**
Kátia Moreira CUPPOLONI**
Clélia H.O. MARTINEZ**
Luis F. Salles GOMES**

RIALA6/627

CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O. & GOMES, L.F.S. — 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.

RESUMO: Em testes de citotoxicidade *in vitro*, pelo método de difusão em ágar, para materiais de uso médico hospitalar e outros, foram usadas seis linhagens celulares estabelecidas: AV₃, Vero, RC-IAL, NCTC clone 929, RV-IAL, HeLa e cultura primária de embrião de galinha (EG). Nos 20 materiais testados, as células EG demonstraram maior sensibilidade, seguidas das células RC-IAL e HeLa. O efeito citotóxico foi avaliado pela presença e pelas medidas dos diâmetro dos halos difundidos. Devido às dificuldades operacionais com a cultura primária EG recomenda-se, para os testes de citotoxicidade *in vitro* dos materiais citados, o uso de placas, em duplicata, das células RC-IAL e HeLa.

DESCRIPTORIOS: culturas celulares; materiais biocompatíveis; testes de toxicidade.

INTRODUÇÃO

As culturas celulares vêm apresentando crescente importância nos testes para detectar a toxicidade de materiais de uso médico-hospitalar. Alguns destes materiais, tais como: tubos intravenosos, catéteres, sondas, válvulas, drenos, fraldas, óleos, loções etc., entram em contato direto com o ser humano, enquanto outros o fazem indiretamente como os tubos de bomba peristáltica, componentes de diálise, ressuscitadores, bolsas, copos, frascos, seringas etc.

Numerosos trabalhos publicados indicam, ora maior sensibilidade de animais em relação às culturas celulares^{11,12}, ora maior sensibilidade das culturas celulares em relação a estes animais, o que torna o uso destas últimas mais vantajoso por apresentar reprodutibilidade, rapidez e menor custo na análise^{3,11,14,16,17,18,20,21}.

Existem várias técnicas para o teste de toxicidade em culturas celulares. Em algumas, utiliza-se a

semeadura das células após contato do meio de cultura com o material a ser testado¹⁵; em outras, extrai-se a parte tóxica dos materiais¹⁸, embebendo-a em papéis de filtro⁴. Em algumas técnicas, ainda, o material a ser testado é diretamente depositado sobre as culturas celulares^{3,7, 18}, enquanto que, em outras, o material a ser testado é depositado sobre uma camada de ágar sobreposta às culturas celulares. A inibição metabólica das culturas celulares também é utilizada como método para detectar citotoxicidade de materiais de uso médico^{20,21}.

Os métodos que utilizam camada de ágar sobre as culturas celulares de diferentes origens, e avaliam o halo citotóxico difundido, têm sido dos mais usados devido às vantagens práticas. Nada encontramos, na literatura nacional, sobre testes de toxicidade de materiais de uso médico-hospitalar em culturas celulares nos quais se utiliza camada de ágar, com exceção de extensa tese de mestrado e sua posterior publicação em parte^{12,13} sobre testes de biocompatibilidade de produtos mé-

* Realizado na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

dico-hospitalares *in vivo* e *in vitro*, onde foi empregada somente uma linhagem celular.

Em nosso trabalho, apresentamos a metodologia para os testes de citotoxicidade *in vitro* pelo método da difusão em ágar e, através desta, comparamos seis diferentes linhagens de culturas celulares e uma cultura primária para avaliação da sensibilidade destas células frente aos diferentes materiais de uso médico-hospitalar, e outros que entram em contato com o ser humano.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Dos materiais processados no período de junho de 1983 a setembro de 1985, elegemos, por sorteio, 20 amostras para serem trabalhadas, todas provenientes de Indústrias do país, que solicitaram a realização da prova de citotoxicidade *in vitro*.

A caracterização destas amostras foi estabelecida de acordo com a especificação da indústria. As amostras examinadas tinham a seguinte natureza: as de números 17, 18, 19, 20, 66, 77, 78 e 79 eram placas e/ou tecidos de látex; as de n.º 86 e 87 eram amostras de fibras de raioim; as de n.º 7, 8, 9, 172 e 173 eram cerdas e/ou tecidos de náilon; as de n.º 152 e 153 eram grânulos, tubos e anéis de cloreto de polivinila (PVC); as de n.º 127 e 200 eram tiras e placas de silicone e, finalmente, a de n.º 199 era lâmina de poliuretano.

As amostras não foram submetidas a qualquer tratamento prévio, como esterilização, extração e outros procedimentos. Para a utilização do teste, as amostras foram cortadas de forma quadrada com 5 mm de lado.

Em todos os testes, foram utilizados como controles fragmentos de látex tóxico e papéis de filtro atóxico. A análise de cada amostra foi feita separadamente em placa de Petri, em duplicata.

Culturas Celulares

Seis linhagens celulares foram utilizadas, sendo que quatro eram linhagens certificadas, provenientes do "American Type Culture Collection" (ATCC) e duas eram linhagem celulares isoladas e caracterizadas na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz, denominadas RC-IAL, rim de coelho e RV-IAL, rim de vitelo⁵.

As quatro linhagens provenientes do ATCC foram: NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), tecido conectivo de camundongo; células HeLa

(ATCC-CCL 2), carcinoma epitelóide de cervix humana; células Vero (ATCC-CCL 81), rim de macaco verde africano, e células AV₃ (ATCC-CCL 21), âmnio humano.

Foram também utilizadas culturas primárias de células de embrião de galinha (EG) que foram feitas a partir de ovos embrionados de 9 dias, pelo método de Youngner⁶.

Todas as linhagens celulares durante a execução do trabalho foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MME) com 10% de soro de vitelo inativado (SV), sem antibiótico, e incubadas a 36°C. Para a dispersão do tapete celular, foi utilizada uma associação de tripsina a 0,20% e verse-ne a 0,02%⁹.

Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi composto de partes iguais de meio de Eagle, duas vezes concentrado, mais 10% de soro de vitelo e ágar (Bacto-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 meio mínimo de Eagle, duas vezes concentrado, mais 10% de SV, ambos a uma temperatura de 44°C, e aplicado sobre a camada de células previamente crescidas nas placas de Petri.

Método

O método utilizado para análise de citotoxicidade *in vitro* foi o da difusão em camada de ágar *overlay* sobre monocamadas de cultura celular.

As células foram semeadas em placas de Petri de vidro neutro de 50 mm de diâmetro, na concentração de $1,5 \times 10^5$ cel/ml de MME com 10% de SV, sem antibiótico, no volume de 6,0 ml e incubadas por 48 horas, a 37°C, em estufa com ambiente de CO₂, a 5%. Em seguida, este meio de crescimento foi substituído pelo meio *overlay* e colocado sobre o tapete celular no volume constante de 5,0ml. Antes que esta camada de ágar solidificasse completamente, as amostras eram colocadas no centro da placa de Petri e mantidas no escuro por 30 minutos para evitar ação fototóxica do corante, tempo necessário para o total endurecimento do meio *overlay*. As placas eram incubadas novamente na posição invertida em ambiente de 5% de CO₂, por 24 horas, a 37°C. As leituras dos resultados nas placas foram feitas: macroscopicamente, onde a presença de citotoxicidade era constatada por halo claro, ao redor do material tóxico, correspondente às células mortas e, microscopicamente, para verificação de alterações morfológicas circundando a amostra. Quando presente, o diâmetro dos halos resultantes do efei-

to tóxico sobre as células era cuidadosamente medido, usando régua milimetrada. Consideramos como negativas as placas sem presença de halo ao redor do material e também aquelas em que foram observadas somente alterações morfológicas celulares sob o material testado.

Em todos os testes foram incluídos um material conhecidamente positivo e outro negativo.

A leitura das placas e a avaliação do comprimento do diâmetro foram sempre efetuadas por dois dos autores.

RESULTADOS

Das vinte amostras estudadas, oito apresentaram efeito citotóxico para algumas linhagens celulares utilizadas e para a cultura primária de embrião de galinha (EG). Este efeito consistia na formação de halo incolor ao redor da amostra, correspondente às células mortas não impregnadas pelo corante vital (vermelho neutro) incorporado ao *overlay* (figura da página seguinte).

Verificou-se, nestes experimentos, que a difusão do efeito tóxico sobre as células foi, sob o ponto de vista macroscópico, homogênea e circular, facilitando a visualização e avaliação dos halos formados. Ainda, a modulação na forma quadrada e dimensões praticamente constante que demos aos materiais examinados favoreceram a leitura dos resultados.

As amostras nº 7, 8, 9, 18, 19, 66, 86, 87, 152, 153, 172 e 173 foram rotuladas como negativas ao teste, isto é, não apresentaram qualquer halo ou alterações celulares circundando a amostra em todas as culturas de células utilizadas (tabela 1). As amostras nº 17, 20, 77, 78, 79, 127, 199 e 200 foram qualitativamente positivas, isto é, revelaram a presença de halo correspondente à difusão do efeito tóxico sobre as monocamadas das células em experimento, com evidências microscópicas de alterações e lise celular (tabela 1).

Em relação à sensibilidade de cada sistema celular usado, nossos resultados permitem qualitati-

TABELA 1

Resultado dos testes de toxicidade realizados em sete amostras positivas frente aos diferentes sistemas celulares

Material testado	Amostra nº	Diâmetro (em mm) dos halos nas duas placas com culturas celulares						
		HeLa	RC-IAL	NCTC clone 929	Vero	RV-IAL	E.G.	AV ₃
Placas e/ou tecido de látex	17	17 13	17 15	17 13	15 13	13 13	21 25	11 13
	20	11 11	13 15	15 15	11 15	9 11	25 21	11 9
	77	9 7	15 13	13 0	0 7	7 7	17 17	0 11
	78	11 9	31 35	15 0	0 0	0 0	15 13	0 13
	79	11 13	31 31	13 15	0 6	15 11	15 23	9 9
Tiras ou placas de silicone	127	13 13	13 11	0 15	15 0	0 0	15 15	0 0
	200	29 23	19 17	17 17	15 17	13 13	17 21	11 13
Látex	Controle positivo	19	25	23	15	23	45	15
Papel de filtro	Controle negativo	0	0	0	0	0	0	0

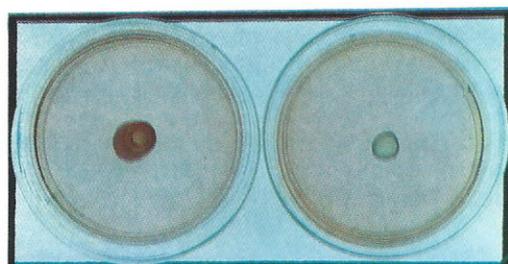


FIGURA — Halo observado em células RC-IAL na presença de material tóxico (a); ausência de halo nas células RC-IAL na presença de material tóxico (b).

vamente afastar as linhagens Vero, RV-IAL e AV₃, como as menos sensíveis, porque não exibiram difusão do fator citotóxico frente aos materiais n^o 78 e 127. Ainda, sob este critério qualitativo, as linhagens AV₃, Vero e NCTC clone 929 responderam diferentemente nas duas placas utilizadas frente aos materiais n^o 77, 78, e 127 (NCTC clone 929), 77, 79, e 127 (Vero) e 77, 78, 199 (AV₃).

Podemos inferir, por simples apreciação, que estas linhagens celulares demonstraram menor sensibilidade aos materiais testados quando comparadas as outras linhagens em experimento.

Nas oito amostras positivas, os comprimentos dos diâmetro dos halos apresentaram variações apreciáveis segundo o tipo de célula usada.

Pela impossibilidade de calcularmos a medida das amostras, é óbvio que pequenas variações, avaliadas em 2-6 mm (média de 4 mm) de diâmetro de difusão do fator citotóxico, corram por conta destas imperfeições.

Relacionando as medidas dos halos, as células que mostraram maior sensibilidade ao efeito tóxico foram as células primárias de embrião de galinha (EG) e as linhagens celulares RC-IAL e HeLa. Isto porque, nas oito amostras que resultaram positivas, tivemos cinco vezes a presença de maior halo de citotoxicidade, quando os materiais n^o 17, 20, 77, 127 e 199 foram testados na cultura primária de E.G. (tabela 1 e 2). Por duas vezes (amostras n^o 78 e 79) tivemos maior halo de citotoxicidade apresentado na linhagem RC-IAL e, por uma vez (amostra n^o 200) na linhagem celular HeLa (tabelas 1 e 2).

As linhagens que apresentaram resultados mais homogêneos e comparáveis frente aos variados

TABELA 2

Resultado dos testes de citotoxicidade das oito amostras positivas

Material testado	Amostra n ^o	Média dos diâmetros (em mm) dos halos de citotoxicidade nas diferentes culturas celulares						
		HeLa	RC-IAL	NCTC clone 929	Vero	RV-IAL	E.G.	AV ₃
Placas e/ou tecidos de látex	17	15,0	16,0	15,0	14,0	13,0	23,0	12,0
	20	11,0	14,0	15,0	13,0	10,0	23,0	10,0
	77	8,0	14,0	6,5	3,5	7,0	17,0	5,5
	78	10,0	33,0	7,5	0,0	0,0	14,0	6,5
	79	12,0	31,0	14,0	3,0	13,0	19,0	9,0
Tiras e/ou placas de silicone	127	13,0	12,0	7,5	7,5	0,0	15,0	0,0
	200	26,0	18,0	17,0	16,0	13,0	19,0	12,0
Lâminas de poliuretano	199	18,0	16,0	14,0	15,0	11,0	20,0	6,5
Média geral	—	14,1	19,2	12,1	9,0	8,4	18,7	7,7

materiais foram as células E.G., RC-IAL e HeLa (tabelas 1 e 2).

Se considerarmos a média dos diâmetros dos halos exibidos nas diferentes células, verificamos que os sistemas celulares RC-IAL, E.G. e HeLa foram os que apresentaram as maiores médias decorrentes da maior sensibilidade destas células (tabela 2). Exceções foram as variações em milímetros verificadas nas amostras n.º 199 (poliuretano) e 78 (látex) que apresentaram diferenças de 13 mm quando foi empregada a linhagem celular AV₃, 15 mm quando as amostras n.º 78 e 127 foram testadas frentes à linhagem celular NCTC clone 929, e 15 mm quando as amostras n.º 77 e 127 foram testadas frente à linhagem Vero, ocorrendo justamente nas placas em que o mesmo material foi positivo em uma placa e negativo em outra (tabela 1).

O material controle positivo também apresentou maior halo de citotoxicidade frente à cultura celular primária E.G., seguida pela RC-IAL. O controle negativo não deu halo em qualquer cultura celular usada.

DISCUSSÃO

Apesar de não haver metodologia oficial no Brasil, nos últimos anos tem havido interesse das indústrias paulistas em analisar, como controle de qualidade, a toxicidade das suas matérias primas e produtos finais que entram em contato com o ser humano. Importantes subsídios para o aspecto legal deste problema foram apresentados por PINTO & SAITO¹³.

Os testes de toxicidade *in vivo* demonstram séria de desvantagens, pois os animais mais utilizados (coelhos, camundongos, *hamsters* etc.) apresentam fatores de variação, tais como, idade, sexo, nutrição, predisposição genética (mesmo temporária) que acarretam diferenças qualitativas nos testes frente aos produtos tóxicos. Ainda, o tempo gasto para estes testes é bem mais longo e mais oneroso, e o uso dos animais é criticado e combatido pela Sociedade Protetora dos Animais.

Confrontando as condições técnicas dos ensaios *in vivo* e *in vitro*^{14,21}, não há dúvida de que este último é mais simples e de melhor reprodutibilidade, pois trabalha em condições mais fixas, possibilitando resultados em menor espaço de tempo e com maior sensibilidade^{3,11,16,18,21}.

Há divergências entre autores quanto aos resultados dos testes *in vitro* com culturas celulares. Assim, o método do contato direto da amostra

sobre as células foi o de maior sensibilidade, quando comparado ao método de extração do produto tóxico⁷; porém, apresenta dificuldades técnicas como a flutuação, no meio de cultura, dos materiais de menor densidade, prejudicando o resultado final¹⁸. Também, neste método, há necessidade imperiosa de esterilização do material antes do teste.

O método da difusão em camada de ágar exhibe as seguintes vantagens: a) não há necessidade de extração do fator tóxico da amostra; b) possibilita a fixação da amostra; c) o ágar protege as células contra agressões mecânicas da amostra; d) facilita a leitura da resposta citotóxica, que é evidenciada pelo halo claro em 24 horas ou menos^{4,8}; e) é praticamente tão sensível quanto o método do contato direto, principalmente após a redução do volume da camada de ágar⁸; f) não há necessidade de esterilização prévia do material. Por estas razões e pelo fato de dispormos de numerosas linhagens celulares de várias origens é que escolhemos este método para a realização das análises de citotoxicidade da Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

Pela ótima sensibilidade, muitos autores recomendam o uso das células NCTC-clone 929, quando comparadas às outras linhagens celulares^{8,14,16}. Outros autores afirmam que a cultura primária de embrião de galinha foi a cultura mais sensível¹⁸.

Esse nosso trabalho, a linhagem celular NCTC-929 não se mostrou tão sensível. Entretanto, esta célula é de fácil manuseio e visualização da toxicidade devido a sua morfologia e tamanho. Verificou-se, também, que a linhagem primária EG foi a mais sensível, secundada pelas linhagens RC-IAL e HeLa. Por questão de facilidade operacional, a RC-IAL e a HeLa são as células mais indicadas para a execução dos futuros testes. Com efeito, são linhagens estabelecidas e a cultura de embrião de galinha, além das razões citadas, depende da disponibilidade e da idade dos ovos embrionados. Não temos notícia através da literatura nacional e internacional de que outro autor tenha utilizado células de rim de coelho e de vitelo para testes de citotoxicidade *in vitro* para materiais de uso médico-hospitalar.

A questão da escolha de células com maior sensibilidade é de extrema importância, principalmente quando se analisam produtos com níveis tóxicos baixos. Estes produtos poderiam não afetar pessoas com respostas considerada normal mas, para outras com deficiência em sua resposta imunológica, poderiam acarretar problemas mais sérios.

Não consideramos como positivos os testes em que as culturas mostraram discretas alterações celulares visualizadas através do exame microscópico.

Outro fato que merece comentário é: porque não escolher células de origem humana, como indicador do teste, se os materiais a serem testados terão contato direto ou indireto com o ser humano?

Em nosso trabalho, incluímos duas linhagens de origem humana, as células HeLa e AV₃. Alguns autores preconizam o uso de células humanas diplóides por se mostrarem mais sensíveis^{3,7,16}; entretanto, há dificuldade de se manterem estas células, e sua duração e sensibilidade geralmente são variáveis após a 20ª passagem seriala.

Em relação ao resultado esperado, isto é, o mesmo material que foi positivo em uma placa era negativo em outra, não encontramos qualquer explicação para isso porque as placas foram adquiridas do mesmo fabricante, a altura do *overlay* não excedeu a 5mm, a colocação do material sólido foi delicada, com discreta pressão para fixá-lo no ágar. O aspecto da cultura celular era sempre examinado antes do teste para seleção das placas que apresentassem ótimo crescimento e aspecto microscópico.

Embora a prova de citotoxicidade em culturas celulares seja a mais sensível, é sabido que a resposta aos materiais a serem testados pode, even-

tualmente, variar frente à mesma linhagem celular ou frente às células provenientes do mesmo frasco ou garrafa¹¹.

Por estas razões, consideramos que as provas deverão ser efetuadas sempre em duplicata ou triplicata, em placas diferentes da mesma linhagem celular. As possibilidades de respostas mais condizentes com a realidade serão maiores. Obviamente, se as provas solicitadas forem efetuadas em dois sistemas celulares, a acuidade dos resultados e a sensibilidade do método será melhorada.

Em nosso trabalho, foram fixadas algumas variáveis como, o tempo de leitura, a dimensão do material sólido e a sensibilidade através da formação ou não de halo, e o comprimento do diâmetro como sugerido por outros autores^{4,8,14,18}.

O objetivo final das provas de toxicidade *in vitro* ou *in vivo* seria estabelecer a correlação entre os resultados destas provas e a resposta no ser humano. Esta resposta carece de qualquer confirmação^{6,10,22}, ainda que a correlação entre DL₅₀ em animais e TL₅₀ em culturas tenha sido descrita²⁰.

Com relação a este trabalho, os objetivos foram atingidos: podemos selecionar, entre outras linhagens, as células RC-IAL e HeLa por serem as mais sensíveis; o Instituto Adolfo Lutz dispõe agora de mais um método para avaliação da toxicidade de materiais que entram em contato com o ser humano e a Indústria, através deste teste, poderá melhorar a qualidade de seus produtos.

RIALA6/627

CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O. & GOMES, L.F.S. — Cell culture for detecting toxicity of biocompatible materials. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 47(1/2):51-57, 1987.

ABSTRACT: In vitro citotoxic test using agar diffusion method was performed in medical practice, hospitalar and others materials. The test was carried out in six cell lines and one primary culture of chick embryo cells. In 20 tested materials the chick embryo cells showed best sensibility following by RC-IAL (rabbit kidney) and HeLa cell lines. The citotoxic effect was evaluated by presence and size of diameters of diffused halos compared with controls. Because of operational difficulties in handling primary cultures we suggest that the use of citotoxic method assaying these materials will be done in duplicate plates with RC-IAL and/or HeLa cell lines.

DESCRIPTORS: cells, cultured; biocompatible materials; test for toxicity.

CRUZ, A.S.; CUPPOLONI, K.M.; MARTINEZ, C.H.O. & GOMES, L.F.S. — 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION — *Catalogue of cell lines & hybridomas*. 5th ed. Rockville, Md., ATCC, 1985. 305 p.
2. BALLS, M. & CLOTHIER, R. — Differentiated cell and organ culture in toxicity testing. *Acta pharmacol. toxicol.*, 52(2):115-37, 1983.
3. BANDO, B.M. & ROSEMBAUM, M.J. — Toxicity in HeLa cells mediated by plastic wraps. *Lab. Pract.*, 22:26-31, 1973.
4. CHABBERT, Y.A. & VIAL, H. — Étude des substances toxiques pour les cultures de tissus en couche monocellulaire par une méthode de diffusion en gélose. *Exp. Cell Res.*, 22:264-274, 1961.
5. CRUZ, A.S.; SAKUMA, M.E. & MARTINEZ, C.H. — RV-IAL. Nova linhagem celular de rim de vitelo. Características e susceptibilidade a alguns vírus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 44(1): 55-59, 1984.
6. EKWALL, B. — Screening of toxic compounds in tissue culture. *Toxicology*, 17: 127-142, 1980.
7. GILL, M. — Direct cell contact screening for materials and devices. *Med. Device Diagn. Ind.*, 4(3):72-6, 1982.
8. GUESS, W.L.; ROSENBLUTH, S.A.; SCHMIDT, B. & AUTIAN, J. — Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J. Pharm. Sci.*, 54: 1545-7, 1965.
9. LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J., ed. — *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington, D.C., APHA, 1979. 1138p.
10. NARDONE, R.M. — The LD₅₀ test and "in vitro" toxicology strategies. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 52(2):65-79, 1983.
11. NARDONE, R.M. — The interface of toxicology and tissue culture and reflections on the carnation test. *Toxicology*, 17:105-11, 1980.
12. PINTO, T.J.A. — Controle de qualidade de produtos médico-hospitalares. I — Característica de biocompatibilidade de materiais polimérico. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 21(1): 41-61, 1985.
13. PINTO, T.J.A. & SAITO, T. — Controle de qualidade de produtos médico-hospitalares: aspecto legal. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo*, 21(2):188-98, 1985.
14. ROSENBLUTH, S.A.; WEDDINGTON, G.R.; GUESS, W.L. & AUTIAN, J. — Tissue culture method for screening toxicity on plastic materials to be used in medical practices. *J. Pharm. Sci.*, 54:156-9, 1965.
15. STAREK, M. & JANDEJSEK, J. — Standardization of test for toxicity for some materials used in tissue cultures laboratory. *Progr. Immunobiol. Stand.*, 4:450-2, 1970.
16. STAMMATI, A.P.; SILANO, V. & ZUCCO, F. — Toxicology investigations with cell culture systems. *Toxicology*, 20:91-153, 1981.
17. TAKAHASHI, N. — Citotoxicity of mercurial preservatives in cell culture. *Ophthalmic Res.*, 14:63-69, 1982.
18. VASINGTON, P.J.; PIERSMA, H.D.; CORBETT, J.J. & BITTLE, J.L. — Cytotoxicity of rubber closures in tissue culture systems. *J. Pharm. Sci.*, 56:1276-79, 1967.
19. WALUM, E. & PETERSON, A. — Acute toxicity testing in culture of mouse neuroblastoma cells. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 52(2): 100-14, 1983.
20. WENZEL, D.G. & COSMA, G.N. — A quantitative metabolic inhibition test for screening toxic compounds with culture cells. *Toxicology*, 29:173-82, 1983.
21. WILLIAMS, G.M.; DUNKEL, V.C. & RAY, V.A. — Cellular systems for toxicity testing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 407:1-484, 1983.
22. ZUCCO, F. — Introduction to the workshop on the application of tissue culture in toxicology. *Toxicology*, 17:101-4, 1980.

Recebido para publicação em 24 de junho de 1987.

