

DETECÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE MATERIAIS BIOCOMPATÍVEIS NAS LINHAGENS CELULARES MRC-5, HELA E RC-IAL.

Aurea S. CRUZ, Cristina A. FIGUEIREDO, Cláudia H. O. MARTINEZ &
Luís F. de SALLES GOMES

RESUMO

A sensibilidade de uma linhagem celular diplóide e duas heteroplóides, para a detecção de citotoxicidade através do método de difusão em camada de ágar sobre culturas celulares, foi avaliada experimentalmente com solução de ácido ascórbico em diferentes concentrações e, na prática, frente a 562 amostras de 21 diferentes materiais industriais enviados para análise na Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

A linhagem celular heteroplóide designada RC-IAL apresentou, em relação às linhagens MRC-5 e HeLa, maior sensibilidade porque revelou a presença de efeito citotóxico nas menores concentrações utilizadas (10 e 25 ug/ml) do ácido ascórbico e apresentou maior diâmetro do halo citotóxico em 15 amostras e igual diâmetro em 16 das 43 amostras (7,6%) que resultaram positivas.

Nas 43 amostras positivas, a linhagem MRC-5 não revelou citotoxicidade em 3 amostras de espuma e 1 de resina acrílica. O polivinilcloreto (PVC) e o polietileno, raramente revelaram positividade, enquanto plástico, algodão e resinas acrílicas revelaram citotoxicidade ao redor de 5%.

Em vista dos resultados é discutida a proposta da utilização da linhagem RC-IAL e HeLa para a continuidade das futuras análises solicitadas ao Instituto Adolfo Lutz.

UNITERMOS: Culturas celulares, testes de citotoxicidade, sensibilidade, materiais biocompatíveis.

INTRODUÇÃO

A seleção do tipo de células apropriadas para detectar o efeito citotóxico específico de qualquer material a ser testado vem, acerca de cinco anos, chamando a atenção dos pesquisadores.

A determinação do efeito citotóxico, principalmente nos materiais de uso médico-hospitalar que entram em contato direto ou indireto com o corpo humano, e nas várias substâncias ligadas à terapêutica em geral, sintetizam a importância dessas avaliações.

Embora alguns autores^{16,17} tenham verificado que as culturas celulares primárias são as que oferecem maior sensibilidade aos materiais tóxicos, o

uso de linhagens celulares contínuas apresentam uma série de vantagens por proporcionarem populações celulares mais homogêneas e possibilitarem a propagação contínua. Neste sentido, há vários autores^{4,8,15} que preconizam o uso de linhagens finitas de células humanas por apresentarem maior sensibilidade.

Em experimento anterior⁶, mostramos que a sensibilidade das linhagens celulares contínuas denominadas RC-IAL (rim de coelho - Instituto Adolfo Lutz) e HeLa (carcinoma de cervix uterino humano) foram as mais sensíveis entre as seis culturas celulares contínuas usadas para detectar o efeito citotóxico em materiais médico-hospitalares

e outros que entram em contato com o ser humano, através do método da difusão do efeito tóxico em camada de ágar sobre as monocamadas da cultura celular.

Neste trabalho, apresentamos a sensibilidade das linhagens celulares RC-IAL e HeLa relacionadas à linhagem celular diplóide de pulmão de feto humano, designada MRC-5, avaliadas experimentalmente com uma substância conhecidamente tóxica escolhida aleatoriamente^{10,13}. Como aplicação prática, apresentamos os resultados das avaliações da citotoxicidade nestas três linhagens celulares frente a mais de 500 amostras de materiais enviados pelas indústrias do Brasil à Seção de Culturas Celulares do Serviço de Virologia do Instituto Adolfo Lutz.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

No período de 1987 a 1990, foram testadas 562 amostras identificadas como látex, adesivos, plásticos, tintas, elásticos, espumas, essências, papel, algodão, tecido, tecido não tecido, resina acrílica, náilon, celulose, flúor, soluções antissépticas, silicone, poliuretano, polietileno, polivinilcloreto (PVC) e policarbonato, para avaliação da citotoxicidade "in vitro".

As amostras sólidas foram recortadas e utilizados 5mm², que eram colocados em placa de Petri. As amostras líquidas foram embebidas em discos de 5mm de diâmetro de papel de filtro atóxico que absorvem 0,004ml da substância e colocados em placa de Petri. Estas amostras não foram submetidas a qualquer tratamento prévio, como esterilização, extração ou outros procedimentos.

Foram testadas experimentalmente, nas três linhagens celulares, soluções de ácido ascórbico diluídas em água bidestilada, que embebiam discos de 5mm de diâmetro de papel de filtro atóxico de maneira que cada disco continha as concentrações finais de 10, 25, 50, 75 e 100 ug/ml da substância.

Como controles positivo e negativo, foram utilizados fragmentos de látex conhecidamente tóxicos e papel de filtro conhecidamente atóxico. A análise de cada amostra e de cada concentração foi feita em placa de Petri, respectivamente em duplicata e quadruplicata para cada tipo celular utilizado.

Culturas Celulares

Três linhagens celulares foram utilizadas: HeLa (ATCC-CCL 2)¹, linhagem de células epiteliais oriundas de carcinoma de colo de útero humano; MRC-5 (ATCC-CCL-171)¹, linhagem diplóide fibroblástica de pulmão de feto humano e RC-IAL, linhagem fibroblástica de rim de coelho isolado e mantido no Instituto Adolfo Lutz.

As linhagens celulares RC-IAL e HeLa foram cultivadas em meio mínimo de Eagle (MME) com 10% de soro fetal bovino (SFB), sem antibióticos, e a linhagem celular MRC-5 foi cultivada em partes iguais de meio mínimo de Eagle e meio 199 com 15% SFB sem antibióticos, e incubadas a 36°C. Para dispersão do tapete celular, foi utilizada uma associação de tripsina 0,20% e versene 0,02%¹¹.

Meio de Cultura

O meio utilizado foi composto de partes iguais de meio de Eagle, duas vezes concentrado sem soro e ágar (Bacto-Difco) a 1,8%, contendo 0,01% de vermelho neutro como corante vital. No momento do uso, o ágar era fundido e misturado na mesma proporção com o meio de Eagle duas vezes concentrado, ambos à temperatura de 44°C e colocados sobre a camada de células previamente crescidas na placa de Petri.

Método

De acordo com o método de difusão em ágar^{4,6,9}, as células foram semeadas em placas de Petri de 50mm, na concentração de $1,5 \times 10^6$ céls/ml de meio de cultura com SFB e incubadas por 48 horas a 36°C em estufa com ambiente de 5% de CO₂. Em seguida, este meio de crescimento foi substituído pelo meio "overlay", o qual foi colocado sobre o tapete celular. Antes que esta camada de ágar solidificasse completamente, as amostras eram colocadas no centro da placa de Petri e, após o completo endurecimento do meio "overlay", as placas eram incubadas novamente em ambiente de 5% de CO₂, na posição invertida por 24 horas, a 36°C. A leitura dos resultados obtidos foi feita macroscopicamente, onde a presença da citotoxicidade era constatada por halo claro ao redor do material tóxico correspondente às células mortas e microscopicamente para a verificação de alterações morfológicas das células circundando a amostra. Quando presente, os diâmetros dos halos resultantes do efeito tóxico, eram cuidadosamente medidos, usando régua milimétrica.

RESULTADOS

Ao compararmos a sensibilidade das três linhagens celulares, utilizando cinco diferentes concentrações (10, 25, 50, 75 e 100 ug/ml) de ácido ascórbico, constatamos nos testes que a linhagem celular RC-IAL foi a única que mostrou a presença do efeito citotóxico frente às concentrações de 10 e 25 ug/ml, isto é, as menores concentrações usadas no teste. Em contraste, as linhagens celulares HeLa e MRC-5 só apresentaram efeito citotóxico a partir da terceira concentração usada, que foi de 50 ug/ml (Tabela 1). Quanto ao tamanho ou diâmetro dos halos de difusão do efeito citotóxico, pudemos observar que em todas as concentrações de ácido ascórbico usadas, o diâmetro foi sempre maior na linhagem celular RC-IAL quando comparadas às outras duas linhagens celulares utilizadas nos testes.

As médias dos diâmetros obtidos com ácido ascórbico evidenciaram não somente a maior sensibilidade da linhagem RC-IAL sobre as outras duas linhagens utilizadas como também, a similaridade em relação à sensibilidade das linhagens celulares MRC-5 e HeLa (Figura 1). Também ficou evidenciado, com os dados obtidos nas células RC-IAL, que o diâmetro da zona do efeito tóxico obtido neste método é função da concentração do produto testado dentro dos limites das concentrações usadas. Ainda na Figura 1, pudemos verificar para a RC-IAL uma relação linear entre os diâmetros das zonas de efeito citotóxico e o logaritmo da concentração da substância usada (ácido ascórbico).

Em relação à parte aplicada deste trabalho, das 562 amostras testadas, 43 (7,6%) foram consideradas positivas, porque apresentaram efeito citotóxico caracterizado pela formação de halo claro ao redor do material testado.

Todas as amostras foram positivas para as três linhagens celulares usadas, com exceção de quatro amostras de nºs 471, 472, 678 (espuma) e 722 (acrílico), que não apresentaram efeito tóxico na linhagem MRC-5, isto é, foram negativas nesta célula. Entretanto, estas amostras, apresentaram efeito tóxico nas outras duas linhagens celulares usadas (Tabela 2). Esta observação foi confirmada por repetição dos testes com estas quatro amostras.

Entre as amostras positivas, pudemos observar algumas variações resultantes na medida dos diâmetros dos halos formados, como os verificados com as quinze amostras de nºs 329, 330, 378, 390, 392, 393, 396, 485, 486, 492, 518, 611, 639, 661 e 662, que apresentaram maior diâmetro do efeito tóxico para a linhagem RC-IAL. As seis amostras de nºs 458, 466, 501, 660, 694 e 731 apresentaram maior diâmetro do efeito tóxico para a linhagem celular MRC-5; enquanto as cinco amostras de nºs 471, 515, 589, 703 e 867 apresentaram maior diâmetro do efeito tóxico para a linhagem celular HeLa (Tabela 2).

Também pudemos observar que seis amostras de nºs 361, 495, 708, 737, 962 e 963 apresentaram diâmetro igual com as três linhagens celulares utilizadas. Por outro lado, dez amostras de nºs 394, 458, 472, 501, 599b, 678, 722, 960, 961 e 965 apresentaram diâmetro do efeito tóxico igual com as linhagens celulares RC-IAL e HeLa. Três amostras de nºs 599a, 703 e 733 apresentaram diâmetro do efeito tóxico igual com as linhagens celulares RC-IAL e MRC-5. Quando comparamos a linhagem celular HeLa e MRC-5, notamos que oito amostras de nºs 330, 390, 396, 485, 486, 492, 500 e 662 apresentaram diâmetro do efeito tóxico igual com estas células (Tabela 2).

Ao considerarmos a média dos diâmetros dos

Tabela 1

Diâmetros (mm) dos halos do efeito citotóxico em quatro placas de cada linhagem celular nas diferentes concentrações de ácido ascórbico

ac. ascórbico ug/ml	Linhagem celular														
	RC-IAL				Média	HeLa				Média	MRC-5				Média
10	10	10	20	10	12,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25	12	15	19	15	15,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
50	20	30	25	25	25,00	10	10	10	12	10,50	8	7	10	7	8,0
75	37	35	15	15	25,50	10	13	10	9	10,50	10	10	9	9	9,5
100	31	31	32	30	31,00	15	14	10	10	12,25	12	10	7	9	9,5

Tabela 2

Médias dos diâmetros (mm) do halo de citotoxicidade das 43 amostras positivas nas diferentes linhagens celulares

Amostra nº	RC-IAL*	MRC-5*	HeLa*
329	29	25	22
330	27	18	18
361	5	5	5
378	27	15	12
390	9	7	7
392	8	6	5
393	10	7	8
394	8	7	8
396	40	25	25
458	15	19	15
466	20	23	14
471	10	0	17
472	5	0	5
485	15	11	11
486	6	5	5
492	12	11	11
495	5	5	5
500	11	12	12
501	10	11	10
515	10	11	14
518	40	16	15
589	8	7	9
599a	15	15	10
599b	15	10	15
611	25	21	15
639	23	20	18
660	8	13	9
661	40	32	22
662	37	32	32
678	5	0	5
694	10	14	11
703	10	10	12
708	5	5	5
722	5	0	5
731	18	24	19
733	25	25	22
737	40	40	40
867	15	20	25
960	50	35	50
961	50	35	50
962	50	50	50
963	50	50	50
965	50	25	50
Média geral das amostras	20,37	16,79	17,86
Média dos Controles	22,86	16,53	17,44

* Média dos diâmetros em 2 placas de cada linhagem celular.

halos obtidos nas amostras e nos controles nas três linhagens celulares, verificamos que a linhagem RC-IAL exibiu nas amostras a média de 20,37mm e nos controles a média de 22,86mm. A linhagem MRC-5 exibiu nas amostras a média de 16,79mm e nos controles 16,53mm. A HeLa mostrou média nas amostras de 17,86mm e nos controles a média de 17,44mm (Tabela 2). As diferenças encontradas entre a RC-IAL e MRC-5 nas médias dos diâmetros das amostras e controles foram respectivamente 3,58 mm e 6,33 mm. A diferença entre a RC-IAL e HeLa foram respectivamente 2,51mm e 5,42mm. Entre a HeLa e MRC-5 foram respectivamente 1,07mm e 0,91mm. Estes achados vêm confirmar a maior sensibilidade da RC-IAL sobre as outras duas linhagens celulares.

Na Tabela 3 apresentamos a lista e os números que representam a quantidade de cada material que foi submetido ao teste de citotoxicidade nas três linhagens celulares, obedecendo à designação contida nas embalagens. Seguem, o número de materiais negativos, positivos e percentagem dos materiais positivos. Nesta tabela, verificamos que algumas substâncias apresentaram percentagem de positividade elevada, tais como: essências, gel flúor e látex, entretanto, o número de amostras recebidas destas substâncias foi pequeno, não permitindo qualquer conclusão. Por outro lado, substâncias como: não tecido, tintas, policarbonato, silicone e soluções antissépticas, embora não apresentassem número razoável de amostras, nenhuma resultou positiva nos testes. Se levarmos em consideração que amostras com número aproximado de 30 ou mais poderiam ser indicativas de tendências de toxicidade ou ausência de fator tóxico, teríamos que, papel, espumas, plásticos e adesivos mostraram positividade variável de 5,6 a 14,8%. Algumas substâncias, como polietileno, resinas acrílicas e algodão apresentaram número de amostras ao redor ou acima de 50, mostrando índices de percentagem de positividade menores que 5%. A única substância que apresentou número de amostras maior que 100 para exame foi o polivinilcloro, demonstrando percentagem de positividade abaixo de 1%. Por simples inspeção da tabela, notamos que o PVC e o polietileno raramente revelaram testes positivos de citotoxicidade, enquanto o plástico e o algodão revelaram citotoxicidade ao redor de 5% destas amostras enviadas.

COMENTÁRIOS

Na Seção de Culturas Celulares do IAL, a

Tabela 3

Amostras submetidas à prova de citotoxicidade em três linhagens celulares

	nº de amostras	nº de amostras negativas	nº de amostras positivas	% de amostras positivas
resinas acrílicas	52	50	2	3,8
náilon	24	23	1	4,1
celulose	10	9	1	10,0
sols. antissépticas	12	12	0	0
silicone	7	7	0	0
poliuretano	13	12	1	7,6
polietileno	55	54	1	1,8
P.V.C.	101	100	1	0,9
policarbonato	15	15	0	0
látex	18	7	11	61,1
adesivos	41	36	5	12,1
plásticos	53	50	3	5,6
tintas	11	11	0	0
elásticos	5	4	1	20,0
espumas	36	33	3	0,9
essências	2	1	1	50,0
papel	27	23	4	14,8
algodão	48	46	2	4,1
tecido	21	19	2	9,5
não tecido	7	7	0	0
gel flúor	4	0	4	100,0
Total	562	519	43	7,6

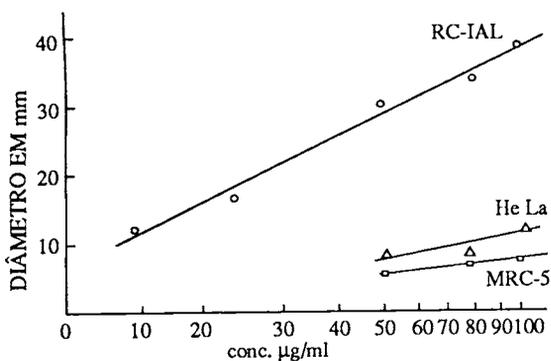


Fig. 1. Médias dos diâmetros dos halos do efeito citotóxico relacionados às concentrações do ácido ascórbico nas três linhagens celulares.

citotoxicidade "in vitro" é avaliada pela viabilidade celular com o auxílio do corante vital denominado vermelho neutro^{3,9,13} e, devido ao tipo e a finalidade da grande maioria dos materiais por nós testados, utilizamos com sucesso o método da difusão em ágar "overlay" sobre a camada celular, como indicado por vários autores^{4,9,12}.

A observação, quando usamos o ácido

ascórbico, de que o diâmetro da zona do efeito citotóxico é função da concentração da substância usada, e que entre os diâmetros das zonas e o logaritmo da concentração existe uma relação linear, são fatos já anteriormente estabelecidos por CHABBERT & VIAL⁵, em estudo, usando o método de difusão do agente tóxico em camada de ágar sobre a cultura celular, utilizando seis substâncias tóxicas conhecidas. Em nosso trabalho com o ácido ascórbico, pudemos observar estes fatos dentro das concentrações usadas.

A escolha de uma linhagem celular sensível para a realização dos testes de citotoxicidade é de extrema importância, porque deverá detectar níveis baixos do produto tóxico antes que entrem em contato com o corpo humano e o meio ambiente^{2,16}, evitando sérios problemas de saúde pública. A divergência sobre a preferência da linhagem celular é patente. Muitos autores sugerem o uso da linhagem celular NCTC-929 como sendo a mais sensível^{9,14,15}; outros sugerem a cultura primária de embrião de galinha¹⁷ e, ainda outros, células diplóides de origem humana⁸.

Confirmando nossos achados anteriores⁶, os resultados indicam que a linhagem celular RC-IAL, comparativamente à linhagem HeLa e à linhagem diplóide MRC-5, foi a mais sensível sob o ponto de vista experimental e na aplicação prática em quinhentos e sessenta e dois materiais recebidos para avaliação do efeito citotóxico. Na prática, a HeLa revelou maior sensibilidade em relação à linhagem MRC-5.

Além disso, deve ser ressaltado que em 43 materiais que resultaram positivos pelas células RC-IAL e HeLa, 4 foram negativos em MRC-5, isto é, cerca de 10% dos materiais positivos não foram detectados pela linhagem MRC-5, sendo portanto, nestas células resultados falso-negativos. A extrapolação deste número, poderia levar à conclusão de que parcela da população inadvertidamente, poderia correr riscos no contacto ou no uso prolongado com substâncias citotóxicas.

Pode parecer estranho e incongruente, a preferência por células derivadas de rim de coelho, mesmo sendo mais sensíveis que outras células humanas, quando testadas frente aos produtos que entram em contato com o corpo humano. Sabemos que as linhagens celulares testadas em nosso trabalho são destituídas de qualquer característica funcional específica e, por conseqüência, são células não diferenciadas, nas quais a reação aos agentes tóxicos pode ser designada de citotoxicidade basal.

Desta maneira, a detecção da citotoxicidade basal pode ser detectada por linhagens celulares de origem humana, como de origem animal, não sendo de maior importância qual delas seja a escolhida. Por similaridade de espécie, poderia ser preferida nos testes dos materiais que entram em contato com os corpos humanos, a de origem humana⁷. O fato de selecionarmos uma linhagem de órgão (rim de coelho) não apresenta obstáculo, pois até hoje não foi demonstrada a persistência das funções especializadas de um epitélio, a partir de órgãos em culturas celulares seriadas⁷.

Como a tendência geral dos pesquisadores é a do uso combinado de dois sistemas celulares para testar a citotoxicidade, não temos dúvidas em escolher a combinação das linhagens RC-IAL e HeLa (célula de origem humana), que demonstraram experimentalmente, e na rotina, sensibilidade superior à linhagem diplóide MRC-5.

Entretanto, podemos assegurar sem dúvida

que o resultado obtido experimentalmente foi confirmado na rotina em 21 materiais de origens diferentes. Primeiro, pela concordância em 519 testes que resultaram negativos nas três linhagens celulares utilizadas. Segundo, pelo desempenho apresentado nas 43 amostras de diferentes origens, que resultaram positivas nos testes. Neles, a RC-IAL demonstrou maior diâmetro do halo em 15 amostras e igual diâmetro em outras 16 amostras, ou seja, 31 amostras ou, em 72% das amostras positivas, houve melhor ou igual desempenho relacionado às outras duas linhagens de células utilizadas. Finalmente, a média geral dos diâmetros obtidos nos controles positivos, que eram realizados todas as vezes que eram feitos os testes, indica que a maior foi a obtida pela linhagem RC-IAL. Se considerarmos como parâmetro a proposição de alguns autores¹², a diferença das médias dos diâmetros obtidos em relação às outras duas linhagens celulares foi por simples inspeção, amplamente favorável à RC-IAL.

Deve ser destacado, em vista dos conhecimentos atuais, que a maior sensibilidade, superioridade ou qualquer outro mérito que determinada linhagem celular possa apresentar em relação às outras, depende em grande parte do objetivo ou finalidade que se pretende analisar^{2,7}.

Para finalizar, nossa escolha tem como suporte uma série de vantagens, tais como: 1) o uso de linhagens contínuas, não finitas; 2) de fácil manuseio e manutenção; 3) de baixo custo; 4) de resultados reproduzíveis; 5) de maior sensibilidade; 6) evitam maior número de resultados falsos-negativos e 7) atendem a substituição dos testes em animais por testes "in vitro".

SUMMARY

MRC-5, HeLa and RC-IAL cell lines sensitivity for detection of cytotoxicity of biocompatible materials.

The sensitivity of diploid and heteroploid cell lines for detection of cytotoxicity using the agar diffusion method on cell culture, was tested with ascorbic acid solution of different concentrations. A total of 562 samples of 21 various materials were tested.

The heteroploid cell line, RC-IAL, showed in relation to the MRC-5 and HeLa cell lines, greater sensitivity because it showed the presence of cyto-

toxic effect with the lowest concentration used (10 and 25ug/ml) of ascorbic acid and showed greater diameter of cytotoxic halo in 15 samples and equal diameter in 16 of the 43 positive samples (7.6%).

Out of 43 positive samples, the MRC-5 line did not show cytotoxicity in 3 sponge samples and 1 of acrylic resin. The PVC (polyvinylchloride) and polyethylene rarely showed positivity, while, the plastic, cotton and acrylic resin demonstrated cytotoxicity in about 5% of samples. We thus suggest the use of the RC-IAL and HeLa cell lines for continuation of this type of analysis at Adolfo Lutz Institute.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION - Catalogue of cell lines of hybridomas. 5 ed. Rockville, ATCC, 1985. 305p.
2. BALLS, M. & CLOTHIER, R. - Differentiated cell and organ culture in toxicity testing. *Acta pharmacol. toxicol.*, 52: 115-137, 1983.
3. BORENFREUND, E.; BABICH, H. & MARTIN-ALGUACIL, N. - Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxic. in vitro*, 2: 1-6, 1988.
4. CELL CULTURE TEST METHODS, ASTM STP 810. S.A. Brown Ed. American Society for Testing and Materials, 1983.
5. 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.
6. 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: 51-57, 1987.
7. EKWALL, B. & EKWALL, K. - Comments on the use of diverse cell systems in toxicity testing. *ATLA*, 15: 193-201, 1980.
8. GILL, M. - Direct cell contact screening for materials and devices. *Med. Device Diagn. Ind.*, 4: 72-76, 1982.
9. 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: 1545-1547, 1965.
10. KNOX, P.; UPHILL, P.F.; FRY, J.R.; BENFOR, J. & BALLS, M. - The Frame Multicentre Project on in vitro cytotoxicology. *Food chem. Toxicol.*, 24: 457-463, 1986.
11. LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J. - *Diagnostic procedures for viral, rickettsiae and chlamydia infections*. 5 ed. Washington, APHA, 1979. 1138p.
12. O'BRIEN, K.A.F.; JONES, P.A. & ROCKLEY, J. - Evaluation of an agarose overlay assay to determine the eye irritation potential of detergent-based Products. *Toxic. in vitro*, 4: 311-313, 1990.
13. RIDELL, R.J.; CLOTHIER, R.H. & BALLS, M. - An evaluation of three in vitro cytotoxicity assays. *Food chem. Toxicol.*, 24: 469-471, 1986.
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 practice. *J. pharm. Sci.*, 54: 156-159, 1965.
15. STAMMATI, A.P.; SILANO, U. & ZUCCO, F. - Toxicology investigation with cell culture systems. *Toxicology*, 20: 91-153, 1981.
16. STARK, D.M.; SHOPSIS, C.; BORENFREUND, E. & BABICH, H. - Progress and problems in evaluating and validating alternative assays in toxicology. *Food chem. Toxicol.*, 24: 449-455, 1986.
17. VASINGTON, P.J.; PIERSMA, H.D.; CORBETT, J.J. & BITTLE, J.L. - Cytotoxicity of rubber closures in tissue culture systems. *J. pharm. Sci.*, 56: 1276-1279, 1967.

Recebido para publicação em 15/5/1991.

Aceito para publicação em 30/3/1992.