

Re-01-GEN-015-03

Buenos Aires

Informe N°: 1286	Protocolo N°2545-20
Título de ensayo	Ensayo de Citotoxicidad MTT según ISO 10993-5:2009
Procedimiento interno: IDT-003-05	Fecha de emisión de Informe: 8/01/2020

Lugar de realización de Ensayo	Datos del Solicitante de Ensayo
BioAplicada	Bioing. Fabricio Basso– Nairotech Desarrollo e Innovación S.A.
Av. Melian 3466	Catamarca 3521
CABA (1430)	Mar del Plata (7600)- Provincia de Buenos Aires
Argentina	Argentina

RESUMEN

Se realizaron estudios de biocompatibilidad *in vitro* sobre muestras:

Identificación: NCu_1L

Lote N°: 201214_BT

Env.: 15/12/2020

Ref/Partida: no informado

Vencimiento: no informado

Envase: Envase plástico estéril descartable con 125 cc; Estéril

BioAplicada no es responsable por el muestreo ni por el rotulado de las muestras recibidas para su Análisis.

La valoración del carácter citotóxico de la muestra se realizó mediante el ensayo cuantitativo de citotoxicidad (MTT) *in vitro* descrito en la norma ISO 10993-5 (3ª edición, 2009).

El ensayo se realizó utilizando células L-929 cultivadas en la fase exponencial del crecimiento.

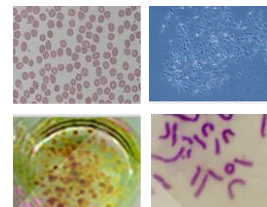
Se realizaron diluciones del material anteriormente citado y se agregaron a un cultivo de células L-929- La muestra y los controles se prepararon según norma ISO 10993-12 (4ª edición, corregida 2012) y se agregaron a un cultivo de células L-929. Luego de 24hs a 37°C y 5% CO₂ se evaluó citotoxicidad.

En base a los resultados presentados en este informe, interpretados de acuerdo a la norma ISO 10993-5 (3ª edición, 2009), el producto testeado en las condiciones descriptas se considera **NO CITOTÓXICO a partir de la dilución 1/40 [concentración de 2,5% v/v]**.

Estos resultados son aplicables únicamente al material ensayado.

Directora del Ensayo: Dra. Paula Cameo

PAULA CAMEO
Dra. en CIENCIAS BIOLÓGICAS



Re-01-GEN-015-03

Ensayo de citotoxicidad (evaluación cuantitativa)

Informe N°: 1286	Protocolo N°2545-20
Título de ensayo	Ensayo de Citotoxicidad MTT según ISO 10993-5:2009
Procedimiento interno: IDT-003-05	Fecha de emisión de Informe: 8/01/2020

Se realizaron ensayos *in vitro* de reactividad biológica solicitados por **Nairotech Desarrollo e Innovación S.A.** sobre la muestra descrita en el punto siguiente.

El objetivo final fue evaluar, utilizando técnicas cuantitativas, la respuesta biológica de células de mamífero enfrentadas al material citado a continuación.

Fechas:

Recepción de muestras: 17/12/2020

Siembra de células: 28/12/2020

Inicio de tratamiento: 29/12/2020

Finalización técnica: 30/12/2020

1. Descripción de la muestra

Identificación: NCu_1L

Lote N°: 201214_BT

Env.: 15/12/2020

Envase: Envase plástico estéril descartable con 125 cc; Estéril

Ref/Partida: no informado

Vencimiento: no informado

BioAplicada no es responsable por el muestreo ni por el rotulado de las muestras recibidas para su Análisis.

Las muestras se conservan a temperatura ambiente hasta el momento de su análisis.

Los pasos siguientes se realizaron siguiendo la norma ISO 10993-5 (3ª edición, 2009).

2. Elección del tipo de ensayo

La naturaleza de la muestra indica realizar "Ensayos directo por diluciones".

3. Preparación de la muestra

Por las características físicas de la muestra (a temperatura ambiente: una fase acuosa con partículas en suspensión), se preparan siete diluciones en medio control.

La muestra y los extractos se prepararon en base a la norma ISO 10993-12 (4ª edición, corregida 2012).

Todo el procedimiento se realizó en condiciones asépticas.

Vehículo de extracción: Medio de cultivo suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB).

3.1. Condiciones de extracción:

Recipientes cerrados, estériles y químicamente inertes.

24hs a 37 ± 2 °C con agitación

Nota: Debido a la presencia de partículas en suspensión en la mayor concentración ensayada (20% V/V), la misma se centrifugó antes de diluirla y ponerla en contacto con la monocapa celular.

Se determinó el pH de los extractos realizados.

3.2. Controles del ensayo

Los controles positivo y negativo se eligieron en base a las sugerencias de la norma ISO 10993-12.

Control positivo de citotoxicidad: látex estéril, y DMSO.

Control negativo de citotoxicidad: polipropileno estéril testeado.

Para el control positivo y negativo se utilizaron las mismas condiciones de extracción que para la muestra en estudio.

Para el blanco, se utilizó medio de cultivo suplementado con 5% de SFB incubado durante 24hs a 37 ± 2 °C con agitación.

4. Línea celular

L-929 es una línea derivada de tejido normal conectivo subcutáneo areolar y adiposo de ratón (*Mus musculus*). Esta es una línea celular establecida y bien caracterizada, que ha demostrado resultados reproducibles. Es comúnmente utilizada para ensayos de toxicidad.

Proviene de ABAC- Asociación Banco Argentino de Células, certificada como libre de micoplasmas.

Se descongeló 1 criotubo y se realizaron repiques antes de comenzar el ensayo (según ISO 10993-5).

5. Medio de cultivo

Las células L-929, fueron cultivadas en Minimum Essential Medium, GIBCO, estéril.

6. Ensayos de citotoxicidad

Procedimiento

La muestra se ensayó en 6 concentraciones distintas: 20%, 10%, 5%, 2.5%, 1,25% y 0,625%. Como diluyente se utilizó medio de cultivo estéril suplementado con 5% de SFB extraído 24hs a 37 ± 2 °C con agitación.

Los controles positivo, negativo y el blanco se usaron al 100% de concentración. Los extractos y diluciones descritas se aplicaron por cuadruplicado a una monocapa celular reemplazando el medio de cultivo de crecimiento.

Evaluación de la respuesta biológica

Pasadas las 24h de incubación con los extractos en las distintas concentraciones y los controles, se reemplazó el medio por MTT (3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), y se incubó con las células por 2h más (37°C y 5% CO₂). Posteriormente se cuantificó la densidad óptica a 570nm (ref 650nm) como medida de actividad metabólica y viabilidad celular.

Resultados

Tabla I. Registro de pH

Extracto	pH	Condición de extracto
Blanco	8.0	Sin modificación de color/ turbidez
Extracto muestra	8.0	Sin modificación de color/ con partículas en suspensión
Control negativo	8.0	Sin modificación de color/ turbidez
Control positivo	7.5	Sin modificación de color/ turbidez

Tabla II: Evaluación cuantitativa de citotoxicidad de NCu_1L

	OD570nm Promedio	SD	% Viabilidad
Ctrl. (+) 100 %	0,007	<i>0,00276</i>	0,5
Ctrl.(-)	1,309	<i>0,03293</i>	100,4
Test 20%	0,009	<i>0,0022</i>	0,7
Test 10%	0,049	<i>0,00741</i>	3,8
Test 5 %	0,085	<i>0,00404</i>	6,55
Test 2,5 %	1,049	<i>0,03041</i>	80,49
Test 1,25 %	1,149	<i>0,04661</i>	88,13
Test 0,625 %	1,190	<i>0,0363</i>	91,26
Blanco	1,304	<i>0,05948</i>	100

Referencias: Ctrl.(+)= control positivo; Ctrl.(-)= control negativo; Test 20%= dilución 1/5; Test 10%= dilución 1/10; Test 5%= dilución 1/20; Test 2,5%= dilución 1/40; Test 1,25%= dilución 1/80; Test 0,625%= dilución 1/160.

% Viabilidad= (OD test/OD blanco) * 100

Viabilidad menor que 70% es considerado potencialmente citotóxico.

Como se puede observar en la Tabla II, la viabilidad celular de los cultivos que estuvieron en contacto con las diferentes diluciones de la muestra **NCu_1L**, es mayor al 70% (**No citotóxico**) a partir de la dilución 1/40 [concentración 2,5% v/v].

Tanto el control positivo como el negativo se comportaron acorde a lo esperado.

Controles de calidad del ensayo:

El ensayo supero todos los controles:

Promedio OD 570 de los blancos >0,2

Control de sembrado de células:

Promedio OD 570 blancos izquierda: 1,2534

Promedio OD 570 blancos derecha: 1,35375

Promedio OD 570 todos los blancos: 1,3036

7. CONCLUSIONES GENERALES

La muestra testada, identificada como **NCu_1L**, cumplió con los requerimientos del ensayo, y se clasifica como un producto **NO CITOTOXICO** a partir de la dilución 1/40 [concentración 2,5% v/v].

- El blanco y los controles positivo y negativo se comportaron acorde a lo esperado.
- Todos los procedimientos se realizaron siguiendo la norma ISO 10993-5:2009

Estos resultados son aplicables únicamente al material ensayado:

Identificación: NCu_1L

Lote N^o: 201214_BT

Env.: 15/12/2020

Envase: Envase plástico estéril descartable con 125 cc; Estéril

Ref/Partida: no informado

Vencimiento: no informado

BioAplicada no es responsable por el muestreo ni por el rotulado de las muestras recibidas para su Análisis.

Cualquier extrapolación de estos datos a otras muestras es responsabilidad del cliente.

La reproducción del informe de resultados, salvo en su totalidad, debe ser aprobada en forma escrita por BioAplicada.

Analista
Firma y aclaración

Director del Ensayo
Firma y aclaración