

	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE POR CAPTAÇÃO DE VERMELHO NEUTRO	NORMA N° NIT-LABIO-120	REV. N° 00
		PUBLICADA EM JUN/2019	PÁGINA 1/13

SUMÁRIO

- 1 **Objetivo**
- 2 **Campo de Aplicação**
- 3 **Responsabilidade**
- 4 **Documentos de Referência**
- 5 **Documentos Complementares**
- 6 **Definições**
- 7 **Reagentes/Soluções**
- 8 **Materiais**
- 9 **Equipamentos**
- 10 **Limitações**
- 11 **Preparativos para o Ensaio**
- 12 **Controles**
- 13 **Determinação de Solubilidade da Substância Teste**
- 14 **Protocolo do Teste**
- 15 **Preparo da Solução de Vermelho Neutro**
- 16 **Preparo Solução Reveladora**
- 17 **Análise dos Dados**
- 18 **Critérios de Aceitação do Teste**
- 19 **Histórico de Revisão e Quadro de Aprovação**

1 OBJETIVO

Esta norma estabelece o procedimento para a realização do ensaio de citotoxicidade com base no documento guia da OECD no. 129, utilizando a linhagem Balb/c 3T3 clone A31.

2 CAMPO DE APLICAÇÃO

Esta norma se aplica ao Labio.

3 RESPONSABILIDADE

A responsabilidade pela aprovação, revisão e cancelamento desta norma é do Labio.

4 DOCUMENTOS DE REFERÊNCIA

OECD GD 129	Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests
-------------	---

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 2/13
---	---------------	------------	----------------

5 DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

NIT-Labio-101	Preparo de solução tampão fosfato-salino de Dulbecco - DPBS
NIT-Labio-102	Preparo de meio Eagle modificado por Dulbecco com alta concentração de glicose - DMEN High
NIT-Labio-119	Cultivo de linhagem celular Balb 3T3 clone A31

6 DEFINIÇÕES

6.1 Siglas

As siglas das UP/UO do Inmetro podem ser acessadas em: <http://intranet.inmetro.gov.br/tema/qualidade/docs/pdf/siglas-inmetro.pdf>.

CP	Controle Positivo.
CN	Controle Negativo
CO ₂	Dióxido de Carbono
CQ-Dimav	Coordenador da Qualidade Da Dimav
CV	Controle do Veículo
DMEN High 10% soro	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose</i> (Meio Eagle Modificado Por Dulbecco Com Alta Concentração De Glicose) Com 10% De Soro De Bezerro.
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Fosfato-Salino De Dulbecco).
SDS	Dodecil Sulfato De Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
R ²	Coeficiente De Determinação
VN	Vermelho Neutro
σ	Desvio Padrão
IC ₅₀	Concentração de substância capaz de inibir o crescimento de células em 50%.

6.2 Termos

Balb/c 3T3 clone A31 – Clone da linhagem celular obtida de embriões de camundongo Balb/c pelo protocolo 3T3.

Solução reveladora – Solução utilizada para dissolver o VN.

7 REAGENTES/SOLUÇÕES

7.1 Ácido acético glacial.

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 3/13
---	--	--	--

7.2 Água destilada.

7.3 DMEM High com vermelho de fenol, conforme NIT-Labio-102.

7.4 DMEM High sem vermelho de fenol, conforme NIT-Labio-102.

7.5 DMSO.

7.6 DPBS, conforme NIT-Labio-101.

7.7 Etanol.

7.8 Pó do corante VN.

7.9 SDS.

7.10 SFB.

8 MATERIAIS

8.1 Espátula para pesagem.

8.2 Linhagem Balb/c 3T3 clone A31, cultivada conforme NIT-Labio-119.

8.3 Papel alumínio.

8.4 Papel toalha.

8.5 Pipetas sorológicas.

8.6 Placa para cultura de células de 96 poços.

8.7 Ponteiras.

8.8 Tubos de 15 mL e 50 mL.

9 EQUIPAMENTOS

9.1 Balança analítica.

9.2 Banho-maria.

9.3 Cabine de segurança biológica, Classe AII.

9.4 Centrífuga.

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 4/13
---	--	--	--

9.5 Espectrofotômetro com filtro de 540 nm $\pm$ 10 nm.

9.6 Estufa incubadora de CO₂.

9.7 Micropipeta multicanal (podendo ser substituída por micropipeta monocanal).

9.8 Microscópio óptico invertido.

9.9 Vórtex.

10 LIMITAÇÕES

10.1 A disponibilidade da substância teste pode ser reduzida por proteínas do soro.

10.2 As células da linhagem 3T3 apresentam baixa ou nenhuma metabolização de xenobióticos.

10.3 As excretas celulares permanecem no cultivo e podem entrar em contato com as demais células.

10.4 Cultivos celulares podem diferir dos animais quanto ao alvo de ação da substância teste, assim, se a substância teste age em um órgão específico, o modelo teste pode não sofrer toxicidade ou apresentar por mecanismos diferentes em culturas originadas de um órgão diferente.

11 PREPARATIVOS PARA O ENSAIO

11.1 Cultivo das células para o ensaio

11.1.1 As células utilizadas no ensaio são da linhagem permanente de fibroblastos murinos, Balb/c 3T3 clone A31, que deve ser obtida de bancos de células bem qualificados.

11.1.2 A NIT-Labio-119 estabelece o cultivo da linhagem celular Balb 3T3 clone A31.

11.1.3 Todas as células, e os meios de cultivo utilizados no ensaio devem ter testes negativos para micoplasma e contaminações bacterianas e fúngicas e devem ser testadas e observadas rotineiramente.

11.1.4 A cultivo rotineiro para as células Balb/c 3T3 clone A31 deve utilizar DMEM High glicose (4.5 g/L) suplementado com 10% de Soro, preferencialmente não inativado por calor, e 4mM L-glutamina.

11.1.5 Antibióticos (geralmente, os mesmos utilizados na cultura das células empregadas no ensaio) devem ser utilizados no meio de cultivo que contém a substância teste.

11.1.6 As condições de cultivo são 37 °C $\pm$ 1°C, 90% $\pm$ 10% de umidade e 5% $\pm$ 1% CO₂.

11.1.7 Deve ser assegurado que o tempo do ciclo celular esteja dentro da curva histórica da linhagem no laboratório.

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 5/13
---	----------------------	--------------------	------------------------

11.1.8 As células Balb 3T3 clone A31 criopreservadas devem ser subcultivadas pelo menos duas vezes antes de utilizá-las no ensaio e tripsinizar-las quando alcançarem entre 50 e 80% de confluência.

11.1.9 É recomendável limitar as passagens de 3T3 a partir de estoques criopreservados a 18, não ultrapassando a passagem 100, para evitar a alteração de características fenotípicas e genotípicas.

11.2 Preparação da substância teste em solução

11.2.1 Equilibrar a substância teste à temperatura ambiente.

11.2.2 Preparar a substância teste em meio, imediatamente antes do uso.

11.2.3 A solução deve estar límpida e livre de precipitados.

11.2.4 A avaliação microscópica pode ser utilizada para auxiliar a determinação da solubilidade da substância teste.

11.2.5 Preparar para cada placa de 96 poços, cerca de 1 mL a 2 mL de cada diluição do estoque da substância teste para assegurar que haja volume adequado para cada coluna de poços.

11.2.6 É recomendado que as substâncias teste fotossensíveis sejam preparadas sob luz vermelha ou amarela.

11.2.7 Caso não haja um solvente adequado conhecido para a substância teste o solvente preferencial é meio de cultura, seguido de DMSO e etanol.

11.2.8 Preparação de substâncias teste em meio de cultura devem seguir as etapas do item 13.

11.2.9 Para substâncias dissolvidas em DMSO ou etanol, a concentração final do solvente não deve ultrapassar 0,5% (v/v), e deve ser a mínima suficiente para solubilizar a substância teste.

11.2.10 Preparar a solução estoque para cada substância teste à maior concentração solúvel encontrada no teste de determinação de solubilidade (item 13)

11.2.11 As maiores concentrações teste aplicadas às células em um teste *range finder* são as seguintes:

- a) 0,5 vezes a maior concentração encontrada no teste de solubilidade, se a substância for solúvel em meio de cultura, ou;
- b) 1/100 a maior concentração encontrada no teste de solubilidade se a substância for solúvel em DMSO ou etanol.

11.3 Preparação da substância teste para o teste *range finder*

11.3.1 Identificar os 8 tubos que receberão a substância teste.

11.3.2 Dissolver a substância teste em DMSO ou etanol a 100mg/mL para preparar a solução estoque da substância teste.

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 6/13
---	---------------	------------	----------------

11.3.3 Preparar as sete concentrações menores, por diluição logaritma seriada 1:10 através da diluição de uma parte da substância teste dissolvida em cada tubo com 9 partes de meio (por exemplo, 0,1 mL de substância teste em DMSO ou etanol + 0,9 mL de meio) para originar as oito diluições.

11.3.4 A substância teste diluída em meio ou solvente pode precipitar após transferir para o meio de cultura de rotina, caso isto ocorra deve ser registrado.

11.4 Preparação da substância teste para o teste principal

11.4.1 O teste principal requer um fator de diluição menor que o do teste *range finder*.

11.4.2 Uma diluição seriada em concentrações geométricas decimais é recomendada e pode ser usada em testes toxicológicos.

11.4.3 O fator de diluição 3,16 ($= 2\sqrt{10}$) divide em duas concentrações equidistantes, 2,15 ($= 3\sqrt{10}$) em três concentrações, 1,78 ($= 4\sqrt{10}$) divide em 4 concentrações, 1,47 ($= 6\sqrt{10}$) em 6 concentrações (ver Tabela 1), e 1,21 ($= 12\sqrt{10}$) em 12 concentrações.

11.4.4 O fator de diluição de 1,21 é o menor aplicável para evitar erros de pipetagem. Por exemplo, para realizar diluições com o fator de diluição 1,47 deve-se diluir 1 volume da maior concentração adicionando 0,47 volumes de diluente. Após equilibrar, diluir 1 volume desta solução adicionando 0,47 volumes de diluente, repetir até a última concentração.

Tabela 1 - Exemplos de concentrações seguindo o fator de diluição 1,47

Número de diluições iguais (Fator de diluição)	Unidades de concentração (µL/mL)
6 (1,47)	100 68,1 46,4 31,6 21,5 14,7 10

Fonte: OECD GD 129

11.5 Preparação da substância teste em meio

11.5.1 A maior concentração do estoque da substância teste em meio para o teste principal é 100 mg/mL, ou a maior concentração solúvel dividida por 2.

11.5.2 Se não for encontrada citotoxicidade no teste range finder a dose máxima deve ser encontrada seguindo os passos:

- Preparar uma solução estoque de até 250 mg/mL para o teste principal, pesando a quantidade necessária em um tubo (preferencialmente vidro mas poliestireno pode ser utilizado);
- Homogeneizar a solução utilizando os procedimentos de solubilização da substância teste;
- Caso a substância seja solúvel em meio de cultura na concentração selecionada prepare as outras sete concentrações a partir do estoque;
- Caso a substância seja insolúvel em meio de cultura na concentração selecionada, adicionar meio em pequenos volumes e tentar diluir através dos procedimentos de solubilização da substância teste;
- Se forem observados precipitados nas diluições de uso, continue o teste e faça os registros adequados na documentação pertinente ao ensaio;
- Procedimentos adicionais podem ser empregados para auxiliar a homogeneização; e

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 7/13
---	--	--	--

g) Empregue a maior concentração solúvel da solução estoque para preparar as outras sete soluções.

11.6 Doses máximas para substância teste diluída em DMSO ou etanol para o teste principal

11.6.1 Se a solução de 100 mg/mL usada no teste *range finder* não produzir toxicidade, preparar uma solução de até 250 mg/mL.

11.6.2 A concentração máxima para o teste principal é baseada na concentração máxima de DMSO ou etanol que pode ser adicionada ao meio de cultura sem causar toxicidade (0,5% v/v).

11.6.3 A maior concentração a ser aplicada às células no teste principal deve ser menor ou igual 2,5 mg/mL, dependendo da solubilidade máxima no solvente.

11.6.4 Preparar uma solução estoque de até 250 mg/mL para o teste principal, pesando a quantidade necessária em um tubo (preferencialmente vidro mas poliestireno pode ser utilizado). Homogeneizar a solução utilizando os procedimentos de solubilização da substância teste.

11.6.5 Caso a substância seja solúvel na concentração selecionada prepare as outras sete concentrações a partir do estoque.

11.6.6 Caso a substância seja insolúvel em solvente na concentração selecionada, adicionar solvente em pequenos volumes e tentar diluir através dos procedimentos de solubilização da substância teste.

11.6.7 Empregue a maior concentração estoque solúvel para preparar as outras sete soluções.

11.6.8 Se forem observados precipitados nas diluições de uso, continue o teste e faça os registros adequados na documentação pertinente ao ensaio.

11.6.9 Procedimentos adicionais podem ser empregados para homogeneizar.

12 CONTROLES

12.1 Controle positivo (CP)

12.1.1 O controle positivo empregado é o Dodecil sulfato de sódio (SDS).

12.1.2 Preparar uma placa de 96 poços com oito concentrações do controle positivo de modo a obter uma curva dose-resposta.

12.1.3 Uma placa de CP pode ser utilizada para várias substâncias teste.

12.1.4 A placa do controle positivo segue os mesmos procedimentos usados para as substâncias teste.

Nota – Pode ser utilizada como controle positivo outra substância com citotoxicidade caracterizada.

12.2 Controle do veículo (CV)

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 8/13
---	--	--	--

12.2.1 Consiste em utilizar o mesmo meio utilizado para diluir as substâncias teste ou o controle positivo.

13 DETERMINAÇÃO DE SOLUBILIDADE DA SUBSTÂNCIA TESTE

13.1 Procedimento

13.1.1 Pesar em balança analítica 100 mg da substância teste em tubo de vidro e adicionar 0,5 mL de meio DMEM High, para obter uma solução em concentração de 200mg/mL. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

13.1.2 Pesar em balança analítica 10 mg da substância teste e adicionar 0,5 mL de meio DMEM High, para obter uma solução em concentração de 20 mg/mL. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

13.1.3 Adicionar à solução de 20 mg/mL, preparada conforme o item anterior, 4,5 mL de DMEM High, obtendo uma solução na concentração de 2 mg/mL. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

13.1.4 Caso a substância teste não se mostre solúvel em meio de cultura em concentração de 2 mg/mL, pesar em balança analítica 100 mg da substancia teste e adicionar 0,5 mL DMSO, para obter uma solução em concentração de 200 mg/mL. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

13.1.5 Se a substância teste não dissolveu em DMSO, pesar em balança analítica 100 mg da substancia teste e adicionar 0,5 mL ETOH, para obter uma solução em concentração de 200 mg/mL. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

13.1.6 Testar novamente a solubilidade em meio de cultura, adicionar 45 mL de DMEM à solução em concentração de 2 mg/mL, previamente preparada, obtendo uma concentração de 0,2 mg/mL. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

13.1.7 Testar a solubilidade em DMSO e etanol (nesta ordem) na concentração de 20 mg/mL. Adicionar 4,5mL de solvente na solução saturada de 200 mg/mL, previamente preparada. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

13.1.8 Testar novamente DMSO e etanol (nesta ordem) na concentração de 2 mg/mL. Adicionar 45 mL de solvente na solução saturada de 20 mg/mL, previamente preparada. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 9/13
---	--	--	--

13.1.9 Pesar em balança analítica duas amostras de 10 mg da substância teste e adicionar 50 mL de DMSO ou etanol, caso necessário, para obter uma solução em concentração de 0,2 mg/mL. Realizar os procedimentos de homogeneização. Observar se a solução está homogênea. Caso apresente sinais de turbidez ou precipitados, realizar o próximo item.

13.2 Procedimentos de homogeneização

13.2.1 Homogeneizar a solução no vórtex, por cerca de 1 a 2 minutos.

13.2.2 Aquecer no banho-maria ou incubadora a 37°C cerca de 5 min a 60 min, pode ser utilizado aquecimento sob agitação.

13.2.3 Realizar a inspeção visual.

13.2.4 Se necessário, repetir os itens 13.2.1 e 13.2.2.

14 PROTOCOLO DO TESTE

14.1 Teste range finder

14.1.1 Deve ser realizado para determinar as concentrações a serem utilizadas no teste principal.

14.1.2 São testadas oito concentrações da substância teste ou controle positivo (CP) através da diluição da solução estoque da substância teste em diluições logarítmicas (por exemplo, 1:10, 1:100, 1:1000) para cobrir uma grande faixa de concentrações.

14.2 Teste Principal

14.3 Utilizar como valor central o IC50 encontrado no teste range finder e ajustar as concentrações maiores e menores em intervalos iguais.

14.4 Pode-se utilizar também concentrações próximas ao IC50 como valor central.

14.5 Cobrir as concentrações relevantes acima e abaixo do IC50 (> 0% e < 100%), utilizando de preferência sete pontos, mas no mínimo dois, um acima e um abaixo do IC50.

14.6 Utilizar pelo menos dois testes principais por substância teste e calcular a média dos IC50 encontrados.

14.7 Ensaio de captação de vermelho neutro

14.7.1 Primeiro dia

14.7.1.1 Em Cabine de segurança biológica, plaquear $2,0-3,0 \times 10^3$ células (Balb/c 3T3 clone A31), em 100 µL de meio DMEM High suplementado com 10% SBF, 4 mM de l-glutamina, 200 µg/mL de estreptomicina e 200 IU/mL de penicilina, por poço, apenas nos poços centrais. Adicionar 100µL de meio de cultura sem células nos poços da periferia.

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 10/13
---	--	--	---

14.7.1.2 Manter as células fora da estufa por cerca de 15 minutos para diminuir o efeito de borda.

14.7.1.3 Incubar a placa em estufa incubadora de CO₂ por 24 h ± 2 h. Passado este tempo a cultura apresentará em torno de 50% de confluência.

14.8 Segundo dia

14.8.1 Equilibrar a substância a ser testada a temperatura ambiente, antes de dissolver ou diluir.

14.8.2 Remover o meio de cultura da placa de 96 poços, com as células previamente plaqueadas e aderidas, com o auxílio de uma pipeta multicanal.

14.8.3 Nas colunas 1, 2, 11e 12, em todos os poços, acrescentar 50 µL/poço de DMEM High suplementado com 10% SBF, 4 mM de l-glutamina, 200 µg/mL de estreptomicina e 200 IU/mL de penicilina.

14.8.4 Entre as colunas 3 e 10, em todos os poços, acrescentar 50 µL/poço da substância-teste diluída em DMEM High suplementado com 4 mM de l-glutamina, 200 µg/mL de estreptomicina e 200 IU/mL de penicilina.

NOTA - o veículo de diluição não é suplementado com SBF. No final, cada poço terá o volume de 100 µL de DMEM High com 5% SBF.

14.8.5 Incubar a placa em estufa incubadora de CO₂ durante 48 h ± 0,5 h.

14.9 Quarto dia

14.9.1 Após pelo menos 46 horas de incubação, examinar ao microscópio óptico invertido identificando eventuais erros de plaqueamento e características de crescimento das células controle e tratadas.

14.9.2 Registrar quaisquer alterações na morfologia das células devidas aos efeitos citotóxicos da substância teste. Registrar também outras características indesejáveis (por exemplo, poços contaminados, sem células ou com precipitados da substância teste).

14.9.3 Após esse período de incubação, remover o conteúdo líquido de todos os poços com auxílio da pipeta multicanal.

14.9.4 Acrescentar 250 µL de DPBS em todos os poços da placa e remover.

14.9.5 Acrescentar 250 µL de solução de uso de VN (25 µg/mL e DMEN com 5% de soro) em todos os poços da placa.

14.9.6 Incubar por 3 h ± 0,1 h em estufa de CO₂.

14.9.7 Passado este tempo, remover a solução de uso de VN com auxílio da pipeta multicanal, ou verter em recipiente e depois secar encostando em papel toalha;

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 11/13
---	--	--	---

14.9.8 Lavar todos os poços adicionando 250 µL DPBS, verter em recipiente e depois secar encostando em papel toalha.

14.9.9 Acrescentar 100 µL/poço da solução reveladora em todos os poços.

14.9.10 Agitar a placa por 20 a 45 minutos, protegida da luz (sugere-se envolver em papel alumínio).

14.9.11 Pode-se deixar a placa em repouso por 5 minutos após a agitação.

14.9.12 Com espectrofotômetro realizar a leitura a 540 nm ± 10nm, no máximo até 60 minutos depois da adição da solução reveladora, usando o branco como referência.

15 PREPARO DA SOLUÇÃO DE VERMELHO NEUTRO

15.1 Solução estoque (2,5mg/mL)

15.1.1 Deve ser armazenada em temperatura ambiente, por no máximo 2 meses.

15.1.2 Procedimento

15.1.2.1 Pesar na balança analítica 0,025 g do pó de VN para cada 10 mL de água destilada.

15.1.2.2 Homogeneizar no vórtex.

15.1.2.3 Identificar, ao menos, com o nome da solução, data de preparo, concentração, validade e o nome do técnico responsável pelo preparo.

15.1.2.4 Envolver o tubo com papel alumínio e realizar a identificação conforme item anterior.

15.2 Solução de uso (25 µg/mL)

15.2.1 Deve ser preparada, imediatamente, antes da utilização.

15.2.2 Procedimento

15.2.2.1 Deixar a solução estoque de VN overnight à 37⁰ C e centrifugar no mínimo 600G por 10 minutos, para separar possíveis cristais.

15.2.2.2 Em cabine de segurança biológica, retirar com auxílio de uma pipeta o volume de solução estoque de VN necessário para as placas de 96 poços a serem testadas e filtrar.

15.2.2.3 Adicionar o volume necessário de DMEM High sem vermelho de fenol suplementado com 5% de SFB de modo que se dilua 100 vezes a solução estoque, dando origem a uma solução em concentração de 25 µg/mL.

15.2.2.4 Homogeneizar a solução com auxílio de uma pipeta sorológica.

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 12/13
---	---------------	------------	-----------------

15.2.3 Descarte de vermelho neutro

15.2.3.1 Descarte os resíduos de solução de vermelho neutro em local apropriado conforme orientação do laboratório.

16 PREPARO SOLUÇÃO REVELADORA

16.1 A solução reveladora deve ser preparada no máximo 1 hora antes do uso.

16.2 Procedimento

16.2.1 Tendo como base o volume a ser utilizado, acrescentar em recipiente adequado 49% de água destilada, 50% de etanol e 1% de ácido acético glacial.

16.2.2 Homogeneizar.

17 ANÁLISE DOS DADOS

17.1 Deve-se excluir, quando houver justificativa científica, poços inadequados para a análise dos dados.

17.2 Cálculos no Excel

17.2.1 Os dados obtidos da leitura das placas no espectrofotômetro são transferidos para uma planilha do programa Excel. Nesta planilha, são calculados os seguintes parâmetros:

- Média geral das D.O. dos brancos;
- Média das D.O. dos brancos das substâncias teste;
- Média corrigida das D.O. dos controles do veículo 1 (esquerdo);
- Média corrigida das D.O. dos controles do veículo 2 (direito);
- Média geral das D.O. de todos os controles do veículo;
- Média corrigida das D.O. de todas as concentrações de substância teste; e
- Viabilidade relativa das células tratadas com cada concentração do ativo, expressa em porcentagem do controle do veículo (considerado como 100% de viabilidade).

17.2.2 Os dados de viabilidade relativa são então transferidos para o software *Sigma Plot*[®], onde é realizada a análise estatística e gerado o gráfico com a curva dose-resposta do ativo testado, conforme item seguinte.

17.3 Análise estatística

17.3.1 Pode ser realizada com qualquer ferramenta, porém descreve-se neste documento a análise utilizando o software *Sigma Plot*[®].

17.3.2 Após abrir o Sigma Plot selecionar *create new blank notebook* ou *create new blank notebook from Excel file*, para abrir uma planilha e adicionar os dados ou utilizar a planilha já existente no Excel.

	NIT-LABIO-120	REV. 00	PÁGINA 13/13
---	---------------	------------	-----------------

17.3.3 Na planilha *Data*, inserir os dados: na primeira coluna as concentrações da curva com a substância teste, na segunda as viabilidades relativas obtidas e na terceira o número 50, correspondente ao IC50.

17.3.4 Selecione a aba Pharmacology e em seguida Standard Curves Analysis.

17.3.5 Em equation escolha Four Parameter Logistic e marque Predict unknowns selecionando column 3 e em predict marcando Xs from Ys, abaixo marque plot predicted values.

17.3.6 No final da caixa de conversa aparecerá a frase *Results placed in column* (Resultados colocados na coluna), seguido do número da coluna onde será inserido o IC50.

17.3.7 Clique em OK.

18 CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO DO TESTE

18.1 Branco deve apresentar DO₅₄₀ de aproximadamente 0,05.

18.2 A DO₅₄₀ esperada para o CV é 0,476 ± 0,117 para 3T3.

18.3 O IC50 esperado do CP deve ser 41,5 ± 4,8 µg/mL para 3T3 devendo estar dentro de 2,5 desvios padrões da média histórica do laboratório estabelecida com pelo menos dez testes de citotoxicidade.

18.4 A média corrigida de CV1 e a média corrigida de CV2 não devem diferir mais de 15% da média corrigida de todos os CVs.

18.5 Deve ser encontrado pelo menos um valor de citotoxicidade maior que 0% e menor ou igual 50% e pelo menos um valor maior 50% e menor que 100%.

18.6 O teste também pode ser aceito se, cumulativamente, houver apenas um ponto entre 0 e 100%, o fator de diluição utilizado tenha sido 1,21 e os outros critérios de aceitação do teste forem satisfeitos.

18.7 O Controle Positivo deve apresentar um R² maior ou igual a 0,85 calculado pela função Hill.

19 HISTÓRICO DA REVISÃO E QUADRO DE APROVAÇÃO

Revisão	Data	Itens Revisados
00	Jun/2019	▪ Não se aplica

Quadro de Aprovação		
	Nome	Atribuição
Elaborado por:	Carla Gomes	Bolsista Pronametro
Verificado por:	Luciene Bottentuit López Balottin	Pesquisador-Tecnologista em Metrologia e Qualidade
Aprovado por:	Leonardo Boldrini	Chefe da UO