

## ANÁLISE DO POTENCIAL CITOTÓXICO DE ANTIFÚNGICOS PUROS E COMPLEXADOS COM $\beta$ -CICLODEXTRINA SOBRE FIBROBLASTOS 3T3

Nathaly Mayer Tozetto (PIBIC/CNPq/FA/UEPG), Marcela Alves de Mattos, Gustavo Simão Moraes, Kátia Sabrina Paludo, Karin Hermana Neppelenbroek, Vanessa Migliorini Urban (Orientador), e-mail: nathalytozetto@hotmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Ponta Grossa, PR.

### Área de Odontologia e subárea de Materiais Odontológicos

**Palavras-chave:** Testes de Toxicidade, Antifúngicos, Fibroblastos.

### Resumo

Este estudo avaliou a citotoxicidade da clorexidina (Clx) e nistatina (Nis) em suas formas puras e complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) sobre células fibroblásticas 3T3. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de  $1 \times 10^3$  células/poço com meio RPMI suplementado com 1% de soro fetal bovino e mantidas durante 48 h em incubadora. Na sequência, os tratamentos foram aplicados na faixa de concentrações inibitórias mínimas de *Candida albicans*. Após 72 h em contato com as células, a viabilidade celular foi avaliada utilizando os ensaios do Vermelho Neutro (VN) e do brometo de tetrazólio (MTT). Esse experimento foi realizado em triplicata. Ademais, a morfologia celular foi analisada utilizando a coloração May Grünwald-Giemsa. Os dados foram analisados por ANOVA 1-fator/teste de Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ). A Clx apresentou citotoxicidade significativa na concentração de 8  $\mu$ g/mL ( $10,6 \pm 12,5\%$  no VN e  $12,9 \pm 9,6\%$  no MTT), e promoveu alterações morfológicas importantes. Os demais fármacos apresentaram viabilidade acima de 70% nos dois testes e não provocaram alterações morfológicas às células, indicando serem opções biocompatíveis para o tratamento de infecções causadas por *Candida*.

### Introdução

A candidose bucal é a infecção fúngica mais frequente em humanos (AKPAN e MORGAN, 2002) e quando está associada ao uso de próteses removíveis recebe a denominação de estomatite protética (COELHO et al., 2004). A estomatite protética possui etiologia multifatorial (BANTING e HILL, 2001), sendo causada principalmente por *Candida albicans* (MARTINS e DE LACERDA GONTIJO, 2017).

Mesmo quando a terapia antifúngica é instituída, é comum observar um quadro de reinfecção da mucosa bucal em até duas semanas após o tratamento. Essa reincidência tem sido atribuída a fatores como a rápida dissolução e eliminação dos fármacos da cavidade bucal devido ao fluxo salivar, movimentos da língua (BANTING e HILL, 2001) e da deglutição (URBAN et al., 2006).

Uma modalidade de tratamento que vem sendo estudada é a incorporação de fármacos antifúngicos em materiais condicionadores de tecidos e reembasadores resilientes (BUENO et al., 2015). Dessa forma, os fármacos ficariam por mais tempo em contato com os tecidos infectados e haveria a eliminação do contato da superfície interna contaminada das próteses com os tecidos bucais (SCHNEID, 1992). A incorporação de nistatina (Nis) e clorexidina (Clx) nesses materiais mostrou-se efetiva na inibição do crescimento de biofilme de *C. albicans* (BUENO et al., 2015) e não resultou em alterações significativas em suas propriedades físico-mecânicas (BUENO et al., 2017). A fim de aumentar a estabilidade, reduzir a toxicidade e otimizar a atividade antimicrobiana desses fármacos, a formação de complexos de inclusão com ciclodextrinas tem sido proposta (DUCHÈNE e WOUESSIDJEWE, 1990).

Anteriormente à realização de estudos com humanos, é necessário comprovar a efetividade e segurança desses novos tratamentos. Com isso, o objetivo desse estudo é avaliar a citotoxicidade da Clx e Nis puras e complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina sobre células fibroblásticas 3T3.

## **Materiais e métodos**

### *Materiais*

Foram utilizados os antifúngicos nistatina (Nis; Amanda Manipulações Farmacêuticas, Ponta Grossa, PR, Brasil) e clorexidina (Clx; Sigma Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, MO, EUA) em suas formas puras ou complexadas com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD; Sigma Aldrich<sup>®</sup>).

### *Cultivo Celular*

Células de fibroblasto murino (3T3) (Banco de Células do Rio de Janeiro, código 0017) foram cultivadas em meio de cultivo completo (RPMI, 10% de soro fetal bovino e antibióticos). As células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### *Tratamento do cultivo celular e testes de citotoxicidade*

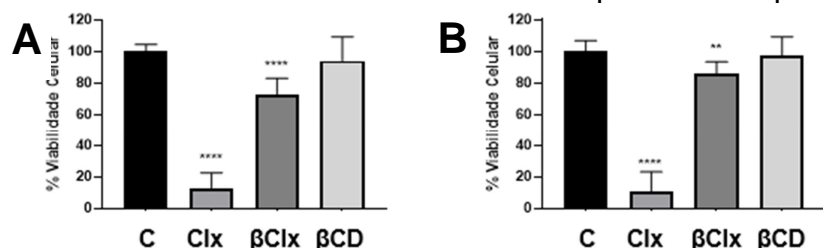
As células foram adicionadas em placas de 96 poços (1×10<sup>3</sup> células/poço). Após 24 h, o meio de cultura foi retirado e, então, foram adicionados os tratamentos: Clx: 8  $\mu$ g/mL; Clx: $\beta$ CD: 8  $\mu$ g/mL; Nis: 0,125  $\mu$ g/mL; Nis: $\beta$ CD: 4  $\mu$ g/mL; e  $\beta$ CD: 32  $\mu$ g/mL. Como controle negativo, as células foram incubadas com DMSO (Sigma–Aldrich<sup>®</sup>). A citotoxicidade foi avaliada com os métodos Vermelho Neutro (VN) e MTT. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos em três ocasiões diferentes. A morfologia celular foi analisada utilizando a coloração May Grünwald-Giemsa.

### *Análise estatística*

Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA 1-fator) e pós-teste de Tukey HSD. Foi adotado um nível de significância de 95% e  $\alpha = 0,05$ . Os testes foram realizados utilizando o *software* GraphPad Prisma (versão 7.00, San Diego, Califórnia, EUA).

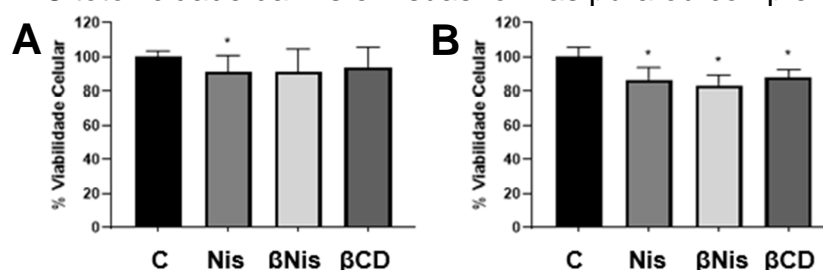
## **Resultados e Discussão**

Figura 1 – Citotoxicidade da Clx em suas formas pura ou complexada



C: controle (DMSO); Clx: clorexidina; βClx: clorexidina complexada com β-ciclodextrina; e βCD: β-ciclodextrina. (A): MTT, (B): Vermelho Neutro. Cada barra representa a média ± o desvio padrão da média. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$  em relação ao controle.

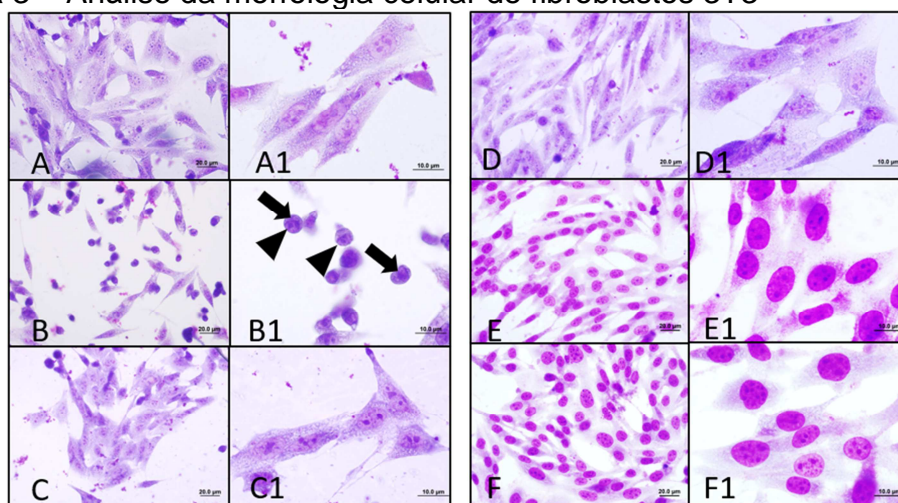
Figura 2 - Citotoxicidade da Nis em suas formas pura ou complexada



C: controle (DMSO); Nis: nistatina; βNis: nistatina complexada com β-ciclodextrina; e βCD: β-ciclodextrina. (A): MTT, (B): Vermelho Neutro. Cada barra representa a média ± o desvio padrão da média. \*  $p < 0,05$  em relação ao controle.

A Clx apresentou alto potencial citotóxico, enquanto sua forma complexada com βCD não. A Nis não apresentou atividade citotóxica nem mesmo em sua forma pura. Apesar dos valores de viabilidade dos grupos Nis, βNis e βCD terem apresentado diferença significativa quando comparados ao controle, tal diferença não é biologicamente relevante, visto que valores de VN e MTT acima de 70% não são considerados citotóxicos (ISO 10993).

Figura 3 – Análise da morfologia celular de fibroblastos 3T3



Alterações morfológicas encontradas nas células de fibroblasto murino 3T3 após incubação com meio RPMI suplementado e o veículo (DMSO, A), Clx (B),  $\beta$ Clx (C),  $\beta$ CD (D), Nis (E) ou  $\beta$ Nis (F). Aumento de 400x (letras) e 1000x (letra +1). Coloração de May Grünwald-Giemsa.

Pode-se perceber que as células expostas à Nis,  $\beta$ Clx,  $\beta$ Nis e  $\beta$ CD não apresentaram alterações morfológicas. No entanto, as células expostas à Clx apresentaram características de comprometimento celular, tais como condensação da cromatina ( $\Rightarrow$ ) e arredondamento celular ( $\blacktriangle$ ).

### Conclusões

Dentre os fármacos testados, somente a Clx pura apresentou atividade citotóxica. Os demais fármacos não causaram danos celulares significativos, indicando serem opções biocompatíveis para o tratamento de infecções causadas por *Candida*.

### Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Vanessa Migliorini Urban, às professoras Kátia Sabrina Paludo e Karin Hermana Neppelenbroek, ao meu coorientador Gustavo Simão Moraes e ao programa PIBIC/CNPq e à UEPG pela oportunidade e bolsa de iniciação científica concedida.

### Referências

- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgrad Med J**, London, 2002.
- BANTING, D. W.; HILL, S. A. Microwave disinfection of dentures for the treatment of oral candidiasis. **Spec Care Dentist**, Chicago, v. 21, n. 1, 2001.
- BUENO, M. et al. Effect of antimicrobial agents incorporated into resilient denture relines on the *Candida albicans* biofilm. **Oral Dis**, Copenhagen, 2015.
- BUENO, M. G. et al. Surface Properties of Temporary Soft Liners Modified by Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungals. **Braz Dent J**, v. 28, 2017.
- COELHO, C. M.; SOUSA, Y. T.; DARE, A. M. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. **J Oral Rehabil**, Oxford, v. 31, 2004.
- DUCHÈNE, D.; WOUESSIDJEW, D. Pharmaceutical uses of cyclodextrins and derivatives. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 16, 1990.
- INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993- 5. Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Geneva: International Organization for Standardization, 2009
- MARTINS, K. V.; DE LACERDA GONTIJO, S. M. Treatment of denture stomatitis: literature review. **Rev Bras Odontol**, v. 74, n. 3, p. 215-220, 2017.
- SCHNITZLER, T. R. An in vitro analysis of a sustained release system for the treatment of denture stomatitis. **Spec Care Dentist**, Chicago, 1992.
- URBAN, V. M. et al. Effect of the association of nystatin with a tissue conditioner on its ultimate tensile strength. **J Prosthodont**, Hoboken, 2006.