

Uso de anfotericina B como antifúngico no meio de cultura para células pulpares humanas

Use of amphotericin B as antifungal agent in a culture medium for human dental pulp cells

Resumo

Objetivo: O presente trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento de células da polpa, de terceiros molares humanos, cultivadas na presença ou ausência de um antifúngico (anfotericina B).

Metodologia: As células pulpares foram obtidas de seis terceiros molares inclusos, após extração por motivos ortodônticos. A polpa foi cortada em fragmentos e estes foram incubados a 37°C, por 60 minutos, em solução tampão contendo 0,2% de colagenase. A suspensão de células foi dividida em 2 tubos e centrifugada, sendo um pellet ressuspensão em meio – DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 0,45µg/mL de gentamicina e 3,7mg/L HEPES, e o outro ressuspensão no mesmo meio, porém contendo 2,5µg/mL de anfotericina B. As células foram semeadas em placas de cultura plásticas e incubadas em atmosfera 5% de CO₂/95% de ar a 37°C.

Resultados: Dos seis dentes testados, dois não apresentaram crescimento celular em qualquer dos meios testados. Nos demais quatro dentes, houve crescimento celular em ambos meios, sendo este mais proeminente no meio sem anfotericina B.

Conclusão: Apesar da anfotericina B ser importante para a prevenção de contaminações por fungos, concluiu-se que esta dificulta o estabelecimento de células pulpares humanas em cultura.

Palavras-chave: Anfotericina B; cultura de células; polpa dentária

Abstract

Purpose: The aim of the present work is to evaluate the behavior (survival and proliferation) of human third molar pulp cells cultivated in the presence or absence of amphotericin B.

Methods: The cells were obtained from six impacted third molars extracted for orthodontic reasons. The pulp was minced into pieces, which were incubated at 37°C for 60 minutes in buffer containing 0.2% collagenase. The cell suspension was divided into two tubes, centrifuged, and resuspended in DMEM medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin, 0.45µg/mL gentamicin, and 3.7mg/L HEPES with or without 2.5µg/mL of amphotericin B. The cells were plated in plastic culture dishes and incubated with 5% CO₂/95% air at 37°C.

Results: Two out of the six tooth samples did not growth at any of the tested media. The other four samples growth in both media. The growth was more effective in the medium without amphotericin B.

Conclusions: Although amphotericin B may prevent fungal contamination, it was concluded that amphotericin B may difficult the culture of human pulp cells.

Key words: Amphotericin B; cell culture; dental pulp

**Simone Bonato Luisi^a
João Jorge Diniz Barbachan^b
José Artur Bogo Chies^c
Manoel Sant'ana Filho^{a,b}**

^aFaculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^bFaculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

^cPrograma de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondência:

Simone Bonato Luisi
Faculdade de Odontologia da PUCRS
Avenida Ipiranga, nº 6681 – Prédio 6
Porto Alegre, RS – Brasil
90619-900
E-mail: simoneluisi@terra.com.br

Recebido: 01 de fevereiro, 2006
Aceito: 10 de maio, 2007

Introdução

Entre os principais tipos microbianos que contaminam as culturas celulares encontram-se bactérias, fungos, micoplasmas e vírus. Para evitar contaminações são adicionados antimicrobianos aos meios de cultura, tais como anfotericina B, penicilina, estreptomina e gentamicina. A adição de antimicrobianos aos meios de cultura deve ser criteriosamente realizada, pois estes devem apresentar simultaneamente um amplo espectro de ação e um mínimo efeito nocivo para o cultivo.

Para o estabelecimento de um sistema de cultura de células pulpare de terceiros molares humanos deve-se ainda evitar a contaminação pela microbiota bucal normal, no momento da coleta do material. A boca é um ambiente naturalmente séptico onde se encontram mais de 350 espécies bacterianas, além de fungos, protozoários e vírus (1).

Diferentes estratégias de uso de antimicrobianos são empregadas em sistemas de cultivo de células pulpare humanas. Para obterem uma ação antifúngica e antimicrobiana, Shirakawa et al. (2) e Tjäderhane et al. (3) adicionaram 2,5µg/mL de fungizona (anfotericina B), 100 unidades/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomina ao meio de cultura de células pulpare humanas. Por sua vez, Palosaari et al. (4) não só adicionaram ao meio de cultura 100 unidades/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomina como também dois antifúngicos (0,25µg/mL de anfotericina B e 50UI/mL de nistatina). Por outro lado, Gronthos et al. (5,6), Batouli et al. (7) e Saito et al. (8) não adicionaram antifúngicos ao meio de cultura; os autores adicionaram 100 unidades/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomina.

Com relação à contaminação por fungos, a anfotericina B é um dos antifúngicos mais antigos e é considerada a droga de referência para o tratamento da maioria das infecções fúngicas (9,10). Seu efeito antifúngico se dá mediante a interação direta com o ergosterol da membrana celular fúngica (10). A anfotericina B não interfere na síntese da membrana, mas sim a desestabiliza, facilitando a formação de fendas que permitem a perda de íons e componentes celulares (11,10).

Convém salientar que a anfotericina B é capaz de se ligar ao colesterol da membrana das células humanas (9) e induzir efluxo de potássio (K⁺) (12,13) e também apoptose em células eucarióticas (12). Marklund et al. (13) demonstraram que a anfotericina B aumenta significativamente o efluxo de K⁺ em células P31 (linhagem de células humanas de mesotelioma pulmonar) em cultura. Dessa forma, justificase avaliar o comportamento (viabilidade e proliferação) das células da polpa, de terceiros molares humanos, cultivadas em meio de cultura na presença ou ausência deste medicamento.

Metodologia

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFRGS. As células pulpare foram obtidas de seis terceiros molares

humanos inclusos, com raiz completamente formada, após terem sido extraídos (sem odontossecação) por motivos ortodônticos, na Disciplina de Cirurgia da Faculdade de Odontologia da PUCRS. Foram incluídos no estudo pacientes com idades entre 20 e 21 anos, que não apresentavam comprometimento de saúde de ordem sistêmica. As diretrizes e normas que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos foram seguidas de acordo com Goldim (14). Os pacientes foram esclarecidos sobre os objetivos do presente estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, doando os dentes extraídos para a realização do experimento.

Imediatamente após a extração, os dentes foram colocados em frascos contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco, New York, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 0,45µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil) e 2,5µg/mL anfotericina B (fungizone, Gibco). Um sulco horizontal de 2mm de profundidade foi feito na superfície radicular, abaixo da junção cimento-esmalte, com uma ponta diamantada, em alta rotação e sob refrigeração, ao lado da chama de uma lamparina. Imediatamente após, o dente foi transportado para o Instituto de Genética da UFRGS. Os procedimentos foram realizados em uma capela de fluxo laminar, sob condições estéreis. A coroa foi separada da raiz por meio de formão e martelo e a polpa foi cortada com uma lâmina de bisturi em pequenos fragmentos. Os fragmentos de tecido foram incubados a 37°C, por 60 minutos, em tampão contendo 25mmol/L HEPES (N-2 Hidroxiethyl piperazine - N² - 2 ácido sulfônico etano pH 7,4 [Gibco]), 10mmol/L NaH₂PO₄ (fosfato de sódio monobásico [Nuclear, São Paulo, Brasil]), 100mmol/L NaCl (cloreto de sódio [Dinâmica, São Paulo, Brasil]), 3mmol/L KH₂PO₄ (fosfato de potássio (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil)), 1mmol/L CaCl₂ (cloreto de cálcio [Synth, São Paulo]), 24mmol/L KCl (cloreto de potássio [Synth]), 0,5% de glicose (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), 12mmol/L de manitol (Synth), 0,2% de albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich), 45µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough) e 0,2% de colagenase bacteriana (Gibco). A suspensão de células foi dividida igualmente em dois tubos e centrifugada a 800g por 10 minutos a 4°C. O material resultante foi ressuspenso nos seguintes meios: Meio A: 1,5mL de meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 100 unidades/mL de penicilina/100µg/mL de estreptomina (Gibco), 0,45µg/mL de gentamicina (Garamicina, Shering-Plough) e 3,7mg/L HEPES (Gibco); e meio B: meio A acrescido de 2,5µg/mL de anfotericina B (fungizone, Gibco).

A ressuspenção tanto para o meio A quanto para o meio B foi realizada em placas de cultura plásticas (TPP, Trasadigen, Suíça) de 24 poços, e estas foram incubadas em atmosfera 5% de CO₂/95% de ar a 37°C. As células de cada poço foram mantidas separadamente em culturas monocamada. Quando as células tornaram-se confluentes, estas foram colhidas com tripsina (0,5%)/EDTA10X (5,3mM) (Sigma-Aldrich) em meio Hank's livre de cálcio e magnésio

(Sigma-Aldrich) e transferidas para subculturas, na razão 1:2, no respectivo meio de cultivo. Os meios de cultura foram trocados a cada três dias.

Tanto os meios utilizados no experimento quanto o tampão para dissociação celular foram preparados e filtrados em uma capela de fluxo laminar, ao lado da chama de uma lamparina e armazenados. Todos os dentes foram processados com os meios armazenados, não ocorrendo variação no lote do material ou no preparo dos meios. As células foram observadas ao microscópio de campo invertido AxioVert 25 (Zeiss, Alemanha).

Resultados

A polpa coronária, de todos os seis dentes, apresentava-se rígida, resistente ao corte, com coloração rósea e superfície lisa.

No grupo controle, o qual as células foram cultivadas no meio A (sem anfotericina B), em dois casos não houve crescimento celular, em três casos havia poucas células e estas não proliferaram e em um caso as células se organizaram em pequenos núcleos de crescimento (Fig. 1A) e tornaram-se confluentes. Após o primeiro repique, em dois novos poços as células não se organizaram em núcleos de crescimento, mas ficaram dispersas por toda a placa (Fig. 1B). Estas se tornaram confluentes, formando um grande tapete celular (Fig. 1C). Após sete dias foi realizado

um novo repique, porém, as células de cada poço foram repicadas em dois novos poços, sendo um no meio A e outro no meio B, dando origem novamente a dois grupos teste. Dos dois poços cultivados no meio B, um nitidamente apresentava-se, após uma semana, com o mesmo número de células que os poços cultivados no meio A (células confluentes com formação de tapete celular). No outro, porém, as células não se tornaram confluentes. Foi realizado novo repique em todos os poços mantendo os dois grupos teste. Após uma semana, as células cultivadas no meio A apresentavam-se em condições para um próximo repique e as células cultivadas no meio B, não se multiplicaram, inviabilizando futuros repiques. Na sétima passagem, foi possível observar uma diminuição na capacidade proliferativa das células cultivadas no meio A. A morfologia celular variou de células afiladas e estreladas. Observaram-se ainda muitas mitoses, células com núcleos avolumados e nucléolos bem evidentes e, também, a produção de grânulos no citoplasma que se desprendiam para o meio extracelular (Fig. 1D).

No grupo teste, o qual as células foram cultivadas no meio B (com anfotericina B), em dois casos não houve crescimento celular, em dois casos havia poucas células e estas não proliferaram e em dois casos as células inicialmente organizaram-se em pequenos núcleos de crescimento, porém após o primeiro repique, não proliferaram.

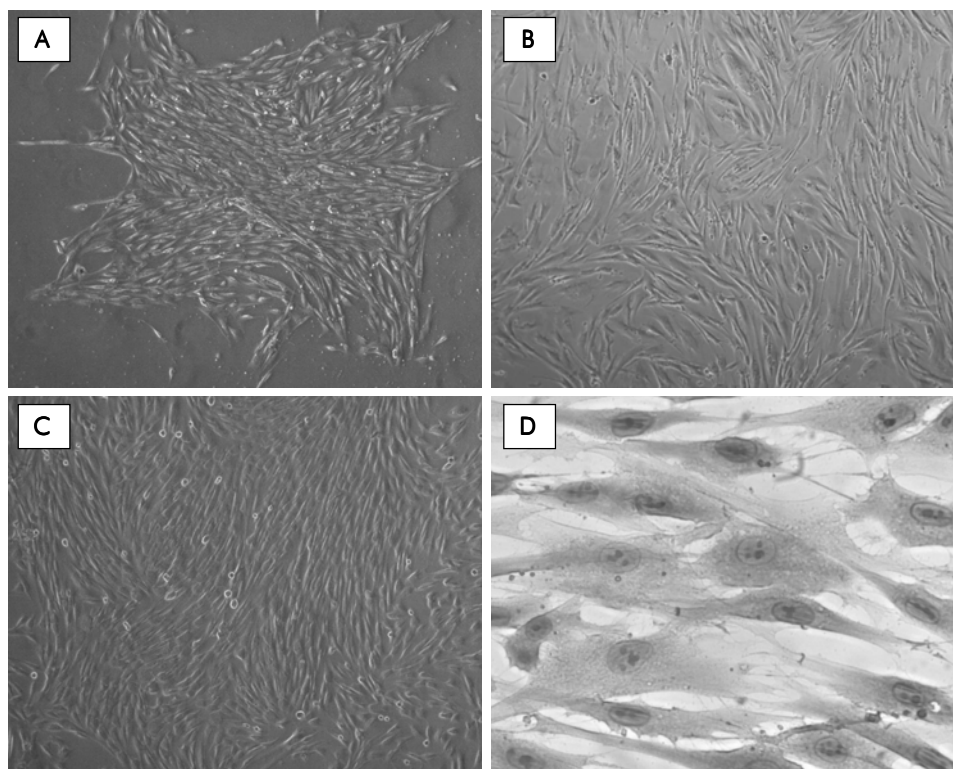


Fig. 1. Células cultivadas no meio A. (A) Formação inicial de núcleos de crescimento. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (B) Distribuição celular após os repiques. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (C) Células confluentes e formação de um grande tapete celular. Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 50X. (D) Células afiladas e estreladas, com núcleos avolumados e nucléolos bem evidentes (200X). Visualização em microscopia de contraste de fase, aumento 200X.

Discussão

Apesar de Shirakawa et al. (2) e Tjäderhane et al. (3) terem obtido sucesso no estabelecimento de culturas de células pulpares humanas utilizando 2,5µg/mL de anfotericina B, isso não foi possível no presente experimento. Até mesmo as células que estavam proliferando no meio A (sem anfotericina B), quando repicadas no meio B, apresentaram comportamento proliferativo menor. A anfotericina B é citotóxica para células eucarióticas, segundo Hoeprich (9), Marklund et al. (12) e Marklund et al. (13). Essa ação citotóxica pode explicar a dificuldade de crescimento das células da polpa de terceiros molares humanos nos meios de cultura com anfotericina B.

Não foi objetivo do trabalho avaliar a necessidade da anfotericina B no meio de cultura que foi utilizado como transporte, mas sim nos meios de cultura utilizados para incubação. Para todos os dentes, foram utilizados meios de transporte contendo anfotericina B, pois o sulco feito no dente, apesar de criteriosos cuidados de assepsia, foi realizado fora da capela de fluxo laminar, ao lado da chama de uma lamparina, em um laboratório odontológico. É lícito dizer que os laboratórios odontológicos são ambientes sépticos e o aerossol produzido pela caneta de alta rotação ao acioná-la é contaminado. No entanto, o fato do meio de transporte conter anfotericina B deve ser investigado, uma vez que em apenas um dente e no meio sem anfotericina B foi possível o estabelecimento da cultura das células pulpares.

O estabelecimento da cultura, nesse experimento, foi obtido na presença de 100 unidades/mL de penicilina/100µg/mL de estreptomicina e 45µg/mL de gentamicina ao meio de cultura. A penicilina e a estreptomicina exercem ação antibacteriana tanto para bactérias Gram+ quanto Gram- e a gentamicina exerce sua ação sobre micoplasmas (15). A detecção da contaminação da cultura por micoplasma é difícil e exige a utilização de técnicas específicas. Além disso, os efeitos da contaminação por micoplasma incluem redução nas taxas de crescimento, alterações morfológicas, aberrações cromossômicas e alterações no metabolismo dos aminoácidos e dos ácidos nucléicos. Entretanto, convém ressaltar que a freqüente inclusão dos aminoglicosídeos aos meios de cultura para combater a contaminação de bactérias e micoplasmas pode explicar a emergência de *Mycoplasma fermentans* resistente (15). Segundo Cumino et al. (16), o

uso indiscriminado de antibióticos pode levar ao desenvolvimento de cepas de micoplasmas resistentes.

No presente experimento, para evitar mudanças bruscas de pH foram adicionados 3,7mg/L de HEPES no meio de cultura, pois esta é uma solução com elevada capacidade tampoadora.

No estudo realizado por Shirakawa et al. (2) foram utilizadas placas de seis poços. Neste experimento foram utilizadas placas de 24 poços. Estas placas apresentam poços menores e foram selecionadas, pois como as células da polpa do mesmo dente deveriam dar origem a duas culturas iniciais, o número de células seria muito reduzido para ser cultivado em poços que requerem grandes volumes. As células necessitam para se estabelecerem, além das condições de cultura de sinalizações intercelulares. A baixa densidade celular (pobre sinalização) pode ser uma razão para a ausência de estabelecimento celular em alguns dos dentes testados. Uma vez que a metodologia foi repetida criteriosamente em todas as amostras a variável pode estar na própria amostra. Não foi possível correlacionar qualquer fator como sexo, idade, aspecto visual da polpa coronária, grau de formação da raiz e se o dente era um terceiro molar superior ou inferior com o estabelecimento das células pulpares em cultura. É de se destacar que o estudo de Shirakawa et al. (2) foi realizado a partir de células de quatro terceiros molares, sugerindo que os autores também podem ter encontrado dificuldades no estabelecimento das células pulpares em cultura devido ao número reduzido da amostra. Além disso, na metodologia utilizada por Shirakawa et al. (2) não está descrita a temperatura de centrifugação, após a utilização do tampão com collagenase. Nesse experimento as condições ideais para a realização desta centrifugação foram obtidas na temperatura de 4°C. Como as células cultivadas são aderentes, a baixa temperatura impede que se percam células por aderência das mesmas às paredes do tubo. Outros estudos devem dar continuidade ao estabelecimento das células da polpa de humanos em cultura, uma vez que este modelo permite a realização de inúmeras investigações.

Conclusão

Os achados sugerem que a anfotericina B pode dificultar o estabelecimento de células pulpares humanas em cultura.

Referências

1. Bamann LL, Estrela C, Aspectos microbiológicos em Endodontia. In: Estrela C, Figueiredo AJR. Endodontia: princípios biológicos e mecânicos. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p.167-89.
2. Shirakawa M, Shiba H, Nakanishi K, Ogawa T, Okamoto H, Nakashima K. et al. Transforming growth factor-beta-1 reduces alkaline phosphatase mRNA and activity and stimulates cell proliferation in cultures of human pulp cells. J Dent Res. 1994;73:1509-14.
3. Tjäderhane L, Salo T, Larjava H, Larmas M, Overall CM. A novel organ culture method to study the function of human odontoblasts

- in vitro: gelatinase expression by odontoblasts is differentially regulated by TGF-beta1. *J Dent Res.* 1998;77:1486-96.
4. Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönka H, Sorsa T, Salo T et al. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *J Dent Res.* 2000; 79:77-84.
 5. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13625-30.
 6. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531-5.
 7. Batouli S, Miura M, Brahimi J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res.* 2003;82:976-81.
 8. Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod.* 2004;30: 205-8.
 9. Hoepflich PD. Clinical use of amphotericin B and derivatives: lore, mystique, and fact. *Clin Infect Dis.* 1992;14:114-9.
 10. Fica CA. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas. III parte: anfotericina B, aspectos farmacoeconómicos y decisiones terapéuticas. *Rev Chil Infect.* 2004;21:317-26.
 11. Hsu S, Burnette RR. Characterization of the effects of amphotericin B on ion channels in MDCK cells using the patch-clamp technique. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1329:26-38.
 12. Marklund L, Behnam-Motlagh P, Henriksson R, Grankvist K. Bumetanide annihilation of amphotericin B-induced apoptosis and cytotoxicity is due to its effect on cellular K⁺ flux. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:781-6.
 13. Marklund L, Henriksson R, Grankvist K. Amphotericin B-induced apoptosis and cytotoxicity is prevented by the Na⁺, K⁺, 2Cl⁻-cotransport blocker bumetanide. *Life Sci.* 2000;66:319-24.
 14. Goldim JR. Pesquisa em Saúde: leis, normas e diretrizes. 3. ed. Porto Alegre: HCPA; 1997.
 15. Hannan PC. Antibiotic susceptibility of *Mycoplasma fermentans* strains from various sources and the development of resistance to aminoglycosides in vitro. *J Med Microbiol.* 1995;42:421-8.
 16. Cumino AC, Córdoba P, Zapata TM. Presence of *Mycoplasma* in laboratory cell cultures from Córdoba, Argentina. *Rev Argent Microbiol* 1998;30:147-53.