

Estudo de citotoxicidade do Hidrogel Poloxamer 407/108 em MC3T3

Hermann Windisch Neto*, Monica Helena Monteiro do Nascimento*, Daniele Araújo**, Christiane B. Lombello*,

*UFABC, São Bernardo do Campo, Brasil

**UFABC, Santo André, Brasil

e-mail: Hermann.windisch@ufabc.edu.br

Abstract – *The osteoarthritis is a prevalent disease among patients over 60 years. It is progressive and incapacitating. In order to minimize the inflammation effects and improve the life quality, new controlled delivering drugs are in research. The present article aims to show the first results of the cytotoxicity tests of the Poloxamer Hidrogel. A mixture of Poloxamer 407 and Poloxamer 188 was solubilized in culture medium and placed in contact with the MC3T3 cell line for 24h. After this time, it was analyzed the cell morphology by light microscopy and the cell viability by the MTT and Neutral Red methods. The results showed us a low toxicity of the Poloxamer 407/108 until a concentration of 2% (w/v). There was a 25% cell nuclear diameter reduction in the 2% Poloxamer treatment. This must be further investigated in order to exclude other cell health issues. Since the cytotoxicity behavior in different cell lines varies significantly, it is necessary to test the Poloxamer with the target cell cultures, i.e. human synoviocytes and chondrocytes.*

Palavras-chave: Sulforafano, Poloxamer, liberação intra-articular, Osteoartrite.

Introdução

As principais patologias articulares estão relacionadas com a degeneração do revestimento condral na superfície óssea e o respectivo processo inflamatório.

Dentre elas, a osteoartrite (OA) é a mais prevalente em pacientes acima de 60 anos. Além de multifatorial e progressiva, normalmente torna-se incapacitante, prejudicando significativamente a qualidade de vida. A OA foi por muito tempo considerada um processo de desgaste mecânico relacionado à idade e sobrecarga articular. Estudos mais recentes mostram um caráter predominantemente inflamatório e enzimático, sendo a sobrecarga e o trauma apenas parte dos diversos mecanismos (1).

Na OA, a membrana sinovial, a cartilagem articular e o tecido adiposo infra patelar são responsáveis pela ativação de substâncias catabólicas. Os condrócitos e sinoviócitos, quando devidamente estimulados pela

cascata inflamatória, secretam agreganases e colagenases. Estas enzimas degradam a matriz extracelular da cartilagem causando erosão da mesma, a qual acaba realimentando o ciclo inflamatório

O sulforafano (SFN), um isotiocianato encontrado em vegetais crucíferos (como Brócolis), é um promissor agente anti-inflamatório, agindo diretamente como bloqueador do fator nuclear NF- κ B, principal ativador do processo inflamatório intracelular.

Devida à sua baixa meia vida, faz-se necessário um mecanismo de liberação controlada deste fármaco. Uma administração oral de sulforafano não é eficaz pois a biodisponibilidade local é restrita. Por sua vez, uma administração endovenosa pode acarretar efeitos tóxicos e sistêmicos potencialmente perigosos

Assim, uma sugestão para administração do SFN seria via intra-articular, a partir de um sistema de liberação composto por hidrogéis termorreversíveis como o Poloxamer (PL) e um polímero mucoadesivo como o ácido hialurônico (AH).

O Poloxamer é um copolímero tribloco de polioxietileno e polioxipropileno.

A principal característica do Poloxamer é a sua termo-reversibilidade. Em temperaturas abaixo de 25°C o Poloxamer se apresenta numa fase líquida e, à medida que é aquecido, passa a gelificar. A temperatura de transição sol-gel é determinada pelas concentrações de Poloxamer 407 e Poloxamer 188.

O presente estudo visa analisar a citotoxicidade de hidrogéis de Poloxamer 407-108, para a determinação de concentrações terapêuticas e seguras do mesmo.

Nesta etapa, os experimentos foram realizados com a linhagem MC3T3 como referência para os efeitos do Poloxamer.

Materiais e métodos

Materiais:

Meio DMEM + Glutamina; Solução tampão PBS; Solução MTT; Vermelho Neutro; Fenol; DMSO 99,8%; Tripsina; Poloxamer 407/188 10-10% em peso (Sigma Aldrich);

Cultura de células:

Linhagem MC3T3-E1 (pré-osteoblasto clonal de calvária de ratos: fonte ATCC) na passagem 18.

As células foram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ com troca de meio a cada 3 dias e um repique semanal ao atingir a semi confluência.

Preparação dos extratos:

Foram preparados extratos a partir de uma solução estoque de Poloxamer 407-108 10-10% (m/v) com concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1 e 2% em meio de cultura MEM com 10% de SFB, durante 24 horas. Estas soluções ficaram 24h em contato com as células que foram previamente inoculadas em placas de cultura de 96 poços (densidade de aproximadamente 15.000 células / 100µL por poço).

Como controle positivo foi utilizado fenol a 0,25% e o controle negativo foi feito com a cultura sem interferência.

O ensaio foi feito em sextuplicata e o tratamento estatístico dos dados foi feito pelo método ANOVA-one way.

Para a avaliação qualitativa, os poços foram observados por microscopia de luz, com contraste de fase, para analisar a morfologia celular.

Para a avaliação quantitativa da viabilidade celular, foram aplicados o MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolona) e o método de (Vermelho Neutro) para medir a atividade metabólica celular.

Após 4 horas de incubação com a solução de MTT em estufa (37°C, 5% CO₂), os poços foram lavados com PBS e foi aplicado DMSO para a lise celular e respectiva liberação dos cristais de formazan.

Seguiu-se imediatamente a leitura da absorbância a 570nm.

No caso do VN, após 2,5 horas de estufa, os poços foram lavados com PBS e foi aplicada uma solução de Etanol 50% com 1% de ácido acético. A leitura de absorbância foi a 540nm

Resultados

Análise Qualitativa (morfológica):

As células em contato com o PL (PL 407-108), apresentaram morfologia preservada comparável ao controle negativo em todas as concentrações.

As principais características observadas foram: células multinucleadas com diversas projeções alongadas e aderidas à placa.

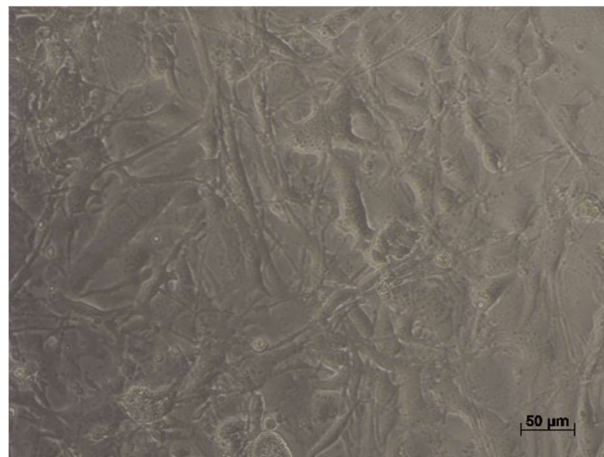


Figura 1. Morfologia da MC3T3 após 24h em meio de cultura (controle negativo)

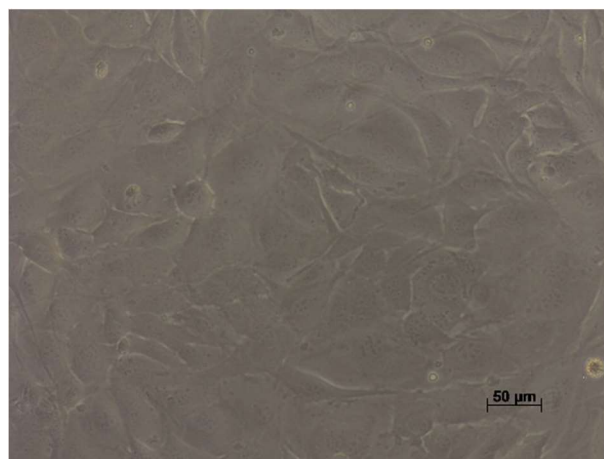


Figura 2. Morfologia da MC3T3 após 24h em contato com PL 407-108 0,1% (m/v)

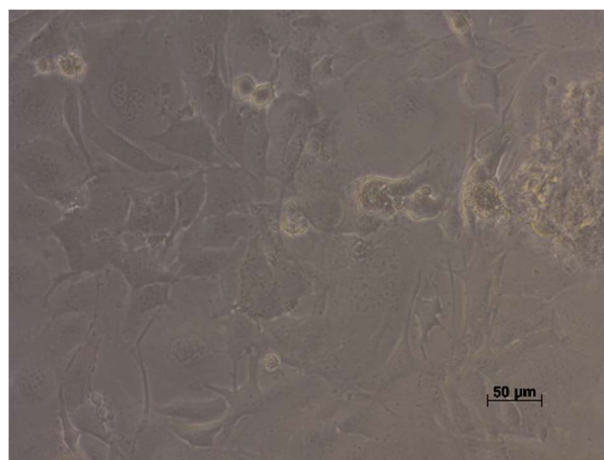


Figura 3. Morfologia da MC3T3 após 24h em contato com PL 407-108 0,5% (m/v)



Figura 4. Morfologia da MC3T3 após 24h em contato com PL 407-108 1% (m/v)



Figura 5. Morfologia da MC3T3 após 24h em contato com PL 407-108 2% (m/v)

O controle positivo (fenol a 0,25%) apresentou uma morfologia distinta com arredondamento celular, perda das projeções e da aderência no poço.

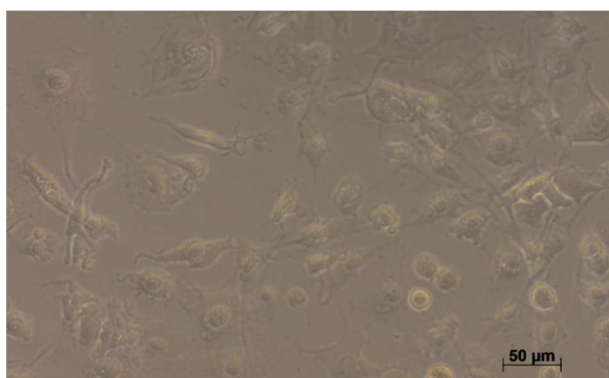


Figura 6. Morfologia da MC3T3 após 24h com fenol a 0,25%, controle positivo para citotoxicidade.

Análise Quantitativa:

A leitura de absorbância do MTT e VN foram utilizadas para calcular a viabilidade celular relativa. Pelo método ANOVA one-way foram analisadas as variâncias das diversas concentrações e não foram observadas diferenças significativas entre as médias de viabilidade do controle negativo e das soluções de PL.

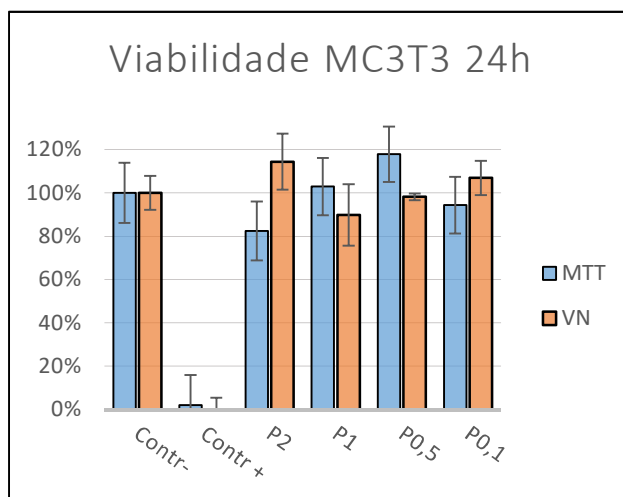


Figura 7. Citotoxicidade do Poloxamer 407/188 em MC3T3. Os valores são reportados como $\bar{X} \pm s$. $P < 0,05$. $n=6$ (MTT) e $n=4$ (VN)

Através do software AxioVision, foi feito um comparativo de diâmetros nucleares entre o controle negativo e o poloxamer 2%.

Observou-se um diâmetro nuclear médio de $25,7\mu\text{m}$ nas células do controle negativo, contra $19,4\mu\text{m}$ nas células tratadas com Poloxamer 2%. (Desvio padrão $6,6$ e $4,7\mu\text{m}$ respectivamente)

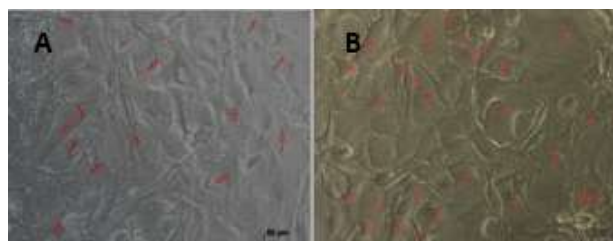


Figura 8. Medição do diâmetro nuclear. A: Controle negativo. B: Tratamento com Poloxamer a 2%.

Discussão

Os resultados de citotoxicidade do Poloxamer na linhagem MC3T3 se mostraram condizentes com a literatura científica.

Apesar da análise quantitativa de MTT e VN não mostrarem variações significativas de viabilidade celular entre o controle e as diversas concentrações de Poloxamer, verificamos uma diminuição significativa do tamanho nuclear. A retração nuclear pode ser um indício de citotoxicidade [8].

Conforme *dos Santos ACM* et al. [2], vemos que a citotoxicidade do Poloxamer pode variar significativamente com a linhagem celular em estudo. Nascimento et al., (2016) também avaliou o potencial citotóxico de diferentes concentrações do sistema binário PL 407-108 (0,02 a 10% m/v) em células da linhagem SW1353, um condrosarcoma humano. Neste caso, a análise de viabilidade celular foi realizada através do teste do vermelho neutro. Os resultados mostraram que as concentrações de 0,5, 2 e 10 % de PL 407/108 apresentaram diferença significativa ($p < 0,0001$) em relação ao controle negativo, e demonstraram aumento de citotoxicidade diretamente relacionado a concentração dos polímeros.

Conclusões

O Poloxamer não se mostrou citotóxico em concentrações de até 2% em massa e condiz com a literatura disponível.

A discreta redução do diâmetro nuclear nas células tratadas com poloxamer a 2% pode ser um indício de citotoxicidade.

Como próxima etapa, pode-se desenvolver uma análise de imagens automática para uma “quantificação” da morfologia celular. As tentativas feitas com as microfotografias das culturas sem corante não apresentaram um bom resultado pela falta de contraste das estruturas celulares. O uso do protocolo Hoechst para análise em software como o ImageJ será o procedimento mais apropriado.

Com base nas diferenças dos resultados de citotoxicidade encontrados entre linhagens diversas, é necessário testar a citotoxicidade *in vitro* deste

composto em culturas primárias de condrócitos e sinoviócitos para viabilizar os estudos *in vivo* e uma futura etapa de sua aplicação clínica no tratamento da OA.

Referências

- [1] BERENBAUM, F. (2013). Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthritis!). *Osteoarthritis and Cartilage*, 21(1), 16–21. <http://doi.org/10.1016/j.joca.2012.11.012>
- [2] DOS SANTOS, A. C. M. et al. Poloxamer-based binary hydrogels for delivering tramadol hydrochloride: Sol-gel transition studies, dissolution-release kinetics, *in vitro* toxicity, and pharmacological evaluation. *International Journal of Nanomedicine*, v. 10, p. 2391–2401, 2015.
- [3] NASCIMENTO et al. (2016). Hidrogéis de poloxamer-ácido hialurônico como sistemas para liberação de sulforafano no tratamento da osteoartrite.
- [4] ELOY, J. O. et al. Preparation, characterization and evaluation of the *in vivo* trypanocidal activity of ursolic acid-loaded solid dispersion with poloxamer 407 and sodium caprate. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 51, n. 1, p. 101–109, 2015.
- [5] MUSUMECI, G. et al. Osteoarthritis in the XXIst century: Risk factors and behaviours that influence disease onset and progression. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 3, p. 6093–6112, 2015.
- [6] ROMAN-BLAS, J. A.; JIMENEZ, S. A. NF- κ B as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 14, n. 9, p. 839–848, 2006.
- [7] DAVIDSON, R. K. et al. Sulforaphane represses matrix-degrading proteases and protects cartilage from destruction *in vitro* and *in vivo*. *Arthritis and Rheumatism*, v. 65, n. 12, p. 3130–3140, 2013.
- [8] ABRAHAM, V. C. et al. Application of a High-Content Multiparameter Cytotoxicity Assay to Prioritize Compounds Based on Toxicity Potential in Humans. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 13, n. 6, p. 527–537, 2008.