

O EFEITO DO ALOPURINOL NA VIABILIDADE DE HEPATÓCITOS MURINO, IN VITRO

EFFECT OF THE ALOPPURINOL IN THE VIABILITY OF IN VITRO HEPATOCYTES MURINE

Sandra Maria Ferreira, João Eduardo Leal Nicoluzzi, João Carlos Domingues Repka,
Carlos Alberto Mayora Aita, Carlos Fernandes Alves.

RESUMO

Objetivo: Observar o efeito protetor do alopurinol nos hepatócitos em cultura, pelo seu efeito inibidor da xantina oxidase na geração de radicais livres de oxigênio. **Métodos:** Os hepatócitos foram isolados a partir de fígado de ratos, por dissociação enzimática segundo a técnica descrita em 1969 e modificada em 1976. As técnicas cirúrgicas foram realizadas na sala de cirurgia experimental da PUC/PR. Foram realizadas contagens iniciais, e a viabilidade foi calculada pelo teste de exclusão pelo azul de trypan. As concentrações de albumina e de malondialdeído foram analisadas por testes bioquímicos colorimétricos. **Resultados:** O rendimento dos hepatócitos isolados após digestão enzimática utilizando-se colagenase foi de $1,5 \times 10^6$ cel/gr/fígado para GC e $1,7 \times 10^6$ cel/gr/ fígado para GE, com viabilidade inicial de 60% para ambos os grupos. O resultado para albumina foi de 0,1868 mg/ml (+/- 0,023) para GC e 0,1384 mg/ml (+/- 0,019) para GE. Para o malondialdeído, os resultados foram 0,3963 nmol/mg de proteínas (+/-0,098) para GC e 0,2040 nmol/mg de proteínas (+/-0,058) para GE. **Conclusão:** O alopurinol diminui a produção do malondialdeído, demonstrando menor estresse oxidativo nas células tratadas previamente com o medicamento. Porém, essa diminuição não chega a interferir na manutenção da viabilidade celular.

Descritores: hepatocytes; transplantation; culture.

INTRODUÇÃO

O transplante de fígado é usado na terapêutica do estágio terminal de doenças crônicas como as hepatites fulminantes ou erros inatos de metabolismo.^{1,2}

Atualmente, o isolamento de hepatócitos para transplante isolado como recurso para suprir a insuficiência hepática poderá ser, em certos casos, alternativa ao transplante de fígado inteiro.^{1,3}

Provavelmente, cada doença ou cada paciente necessite de um número específico de células, e, para tanto, seria necessária a realização de vários transplantes⁴ ou recorrer ao cultivo primário de hepatócitos para aumentar o número de células a serem transplantadas.²

O cultivo de hepatócitos vem sendo estudado de maneira sistemática em modelos experimentais há quase três décadas, e, apesar dos esforços, ainda não foi encontrado um meio de cultivo ideal.⁵ Contudo, antes de pensar em uma futura aplicação clínica, será preciso determinar o comportamento dos hepatócitos *in vitro* e quanto essas células podem sobreviver, além de preservar suas funções após a dissociação e cultivo.⁶ Um dos principais fatores que pode interferir na sobrevivência dessas células *in vitro* é o radical livre que contribui para o dano celular, pois ele tem envolvimento direto com os mecanismos relacionados à lesão e morte celular.⁷ Muitas linhagens celulares, como por exemplo os hepatócitos, são dependentes do substrato, o que significa que a proliferação da célula não tem início até que tenha havido aderência a ele.⁸

O objetivo principal deste estudo é avaliar o efeito protetor do alopurinol nos hepatócitos em cultura, pelo seu efeito inibidor da xantina oxidase na geração dos radicais livres de oxigênio.

Instituição:

Setores de Cirurgia Experimental e Laboratório de Cultivo Celular Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUC – Curitiba/PR, Brasil

Correspondência:

Sandra Maria Ferreira
Décima Primeira Avenida, 334 – Apto. 309 – CEP 74605-060 – Goiânia – GO
E-mail: sandramaria@hlagyn.com
Fax. 62 3094-8001

Recebido em: 03.09.2007

Aceito em: 28.09.2007

MÉTODOS

Foram utilizados durante todo o trabalho como doadores de hepatócitos, 18 ratos (*Rattus Norvegicus norvegicus*, Wistar) machos, com 235 (+/-29) gramas, criados pelo Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná em condições determinadas pelo COBEA. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética desta Universidade sob Parecer N°. 21/04/ CEPA-PUCPR. Os animais foram separados em dois grupos: **Grupo 1** – Grupo Controle: GC – sem tratamento com Alopurinol (N total=9); **Grupo 2** – Grupo de Estudo: GE – com tratamento com Alopurinol (N total=9).⁴ As técnicas cirúrgicas foram realizadas na sala de cirurgia experimental da PUC/PR. A dissociação foi realizada pela técnica de dissociação enzimática descrita em 1969 e modificada em 1976. A suspensão final de células foi submetida à contagem total de hepatócitos utilizando-se câmara de Neubauer e microscópio óptico comum. Para verificação de viabilidade foram utilizados dois corantes: o azul de trypan e o corante fluorescente FQAE100 (One Lambda), que contém duas substâncias distintas: o brometo de etídio, que cora as células mortas em vermelho, e o acridine orange, que cora as células vivas. Após várias modificações, o meio de cultura final foi composto por 5ml de meio Leibovitz L-15, antibióticos (estreptomicina e penicilina 1%/100 ml), soro bovino fetal e aminoácidos (L-glutamina 2mM),⁸ IUL de insulina bovina,⁹ 25ml de fator de crescimento (hipotálamo bovino)¹⁰, e foi acrescentado ao meio IUL de heparina.¹¹ As garrafas foram mantidas a 37°C em estufa úmida e 5% de CO₂.⁸ Os hepatócitos mantiveram-se aderidos até o quinto dia de cultura. A cada 24 horas, o meio de cultura era trocado e o sobrenadante armazenado para as dosagens bioquímicas.

A dosagem de albumina foi realizada pelo método do verde de bromocresol (VBC), kit comercial Bioclin. A dosagem do Malondialdeído (MDA) foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA) de 1994, e os resultados foram analisados em curva de calibração. Para a análise dos resultados foram utilizados testes não-paramétricos de Mann-Whitney e de Wilcoxon, em que valores de $p < 0,05$ indicam significância estatística. Várias práticas de dissociação foram realizadas até que houvesse aderência dos hepatócitos ao substrato plástico.

RESULTADOS

O rendimento dos hepatócitos foi em média $1,55 \times 10^6$ cel/grama de fígado para o GC e $1,75 \times 10^6$ cel/grama de fígado para o GE, e a viabilidade celular inicial foi de 60% para os dois grupos. Com estes resultados, as células foram colocadas em garrafas plásticas, e o cultivo celular foi mantido até o quinto dia, com células aderidas ao substrato. Os resultados das dosagens de albumina estão apresentados na Tabela 1, na qual é mostrada a média diária por grupo. Os resultados dos dias 4 e 5 não aparecem na tabela por não ter sido possível determinar a dosagem de albumina nesses dois dias. Na Figura 1 pode-se observar melhor a diferença entre as dosagens desse metabólito.

Os resultados das dosagens de malondialdeído são apresentados na TABELA 2, na qual é mostrada a média diária por grupo. Os resultados dos dias 4 e 5 não aparecem na tabela por não ter sido possível determinar a dosagem naqueles dois dias. Na FIGURA 2 pode-se observar melhor a diferença entre as dosagens.

Tabela 1. Resultados de albumina, comparando-se os grupos a cada dia de cultivo celular.

ALBUMINA	GRUPO	n	mg/ml	DP	Valor P
DIA 1	C	5	0,1515	0,0295	0,0079
DIA 1	E	5	0,0734	0,0221	
DIA 2	C	5	0,0640	0,0113	0,6905
DIA 2	E	5	0,0717	0,0119	
DIA 3	C	5	0,3451	0,0282	0,0079
DIA 3	E	5	0,2701	0,0259	

Legenda: n = número da amostra; mg = miligrama; ml = mililitro; DP = desvio padrão

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Figura 1. Gráfico de comparação dos valores de albumina entre os dois grupos (controle e estudo) nos três dias de cultivo, $p < 0,05$ nos dias 1 e 3, demonstrando significância estatística. Concentração da albumina em mg/ml.

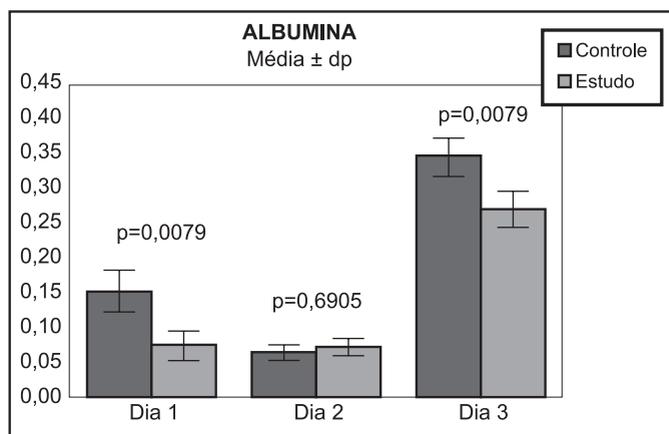


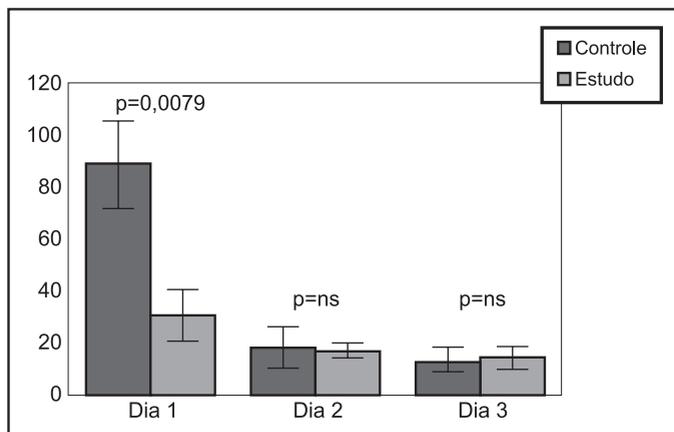
Tabela 2. Resultados de malondialdeído, comparando-se os grupos a cada dia de cultivo celular.

MALON-DIALDEÍDO	GRUPO	n	Nmol/mg	DP	Valor P
DIA 1	C	5	0,8820	0,1676	0,0079
DIA 1	E	5	0,3070	0,1013	
DIA 2	C	5	0,1800	0,0830	0,8413
DIA 2	E	5	0,1670	0,0280	
DIA 3	C	5	0,1270	0,0444	0,5476
DIA 3	E	5	0,1380	0,0456	

Legenda: n = número da amostra; mg = miligrama; ml = mililitro; DP = desvio padrão

*Teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Figura 2: Gráfico de comparação dos valores de malondialdeído entre os dois grupos (controle e estudo) nos três dias de cultivo, $p < 0,05$ no dia 1 demonstrando significância estatística. Concentração do malondialdeído em Nmól/mg de proteínas.



DISCUSSÃO

O rendimento dos hepatócitos foi o esperado, corroborando outros estudos que afirmam que, apesar de muitas investigações, o procedimento que utiliza a colagenase como enzima de dissociação promoveu considerável melhora no rendimento dos hepatócitos obtidos.¹² Outros autores afirmam que as técnicas de dissociação que utilizam a colagenase aumentam em cerca de 75% o rendimento dos hepatócitos obtidos de fígado de ratos, quando comparadas às técnicas anteriores.^{5, 12}

As células dissociadas pela colagenase apresentam na sua maioria, membranas intactas ao microscópio e não são coradas pela azul de trypan.¹³ Este trabalho obteve a viabilidade média de 60% para o GC e 55% para o GE quando utilizado o azul de trypan, 60% para GC e 65% para o GE utilizando o corante fluorescente, contrariando a maioria dos autores afirmam que a viabilidade inicial, quando utilizada a dissociação enzimática, é de aproximadamente 90%.¹⁴ Os resultados deste trabalho não foram muito diferentes dos obtidos por outros pesquisadores, que conseguiram viabilidade de 70% utilizando a dissociação enzimática.¹²

O maior problema para a realização do trabalho foi o cultivo celular, pois as células não se fixavam ao substrato plástico. Várias alterações foram empregadas, tendo em mente danos causados durante a dissociação, mas que pudessem culminar com a morte dos hepatócitos em médio prazo. Foram alteradas velocidades de centrifugação, agitação e reagente para a dissociação celular.

Na tentativa de fazer com que os hepatócitos aderissem ao substrato, o meio de cultura também foi modificado durante o desenvolvimento do trabalho, acrescentando-se a ele insulina bovina. A insulina é utilizada para manter a viabilidade e as funções dos hepatócitos.^{9,15} Apenas a adição da insulina bovina, porém, não trouxe o resultado descrito na literatura, ou seja, não houve aumento da adesão celular.

Muitos trabalhos mostram que hepatócitos adultos em cultura primária não apresentam proliferação celular satisfatória; pode-se tentar contornar tais problemas com a adição de fatores que estimulem a divisão celular com a insulina e o fator de crescimento.¹⁰ Procurou-se, então, melhorar o desenvolvimento dessas células

adicionando-se o fator de crescimento (hipotálamo de boi) ao meio. Porém, mais uma vez, o resultado não foi satisfatório como os descritos na literatura, pois após a adição do fator de crescimento, não foi possível perceber mudança nas células em cultura.

A dificuldade de adesão dos hepatócitos ao meio pode ter ocorrido por se ter trabalhado com células adultas; essas células muitas vezes não sobrevivem mais que 24 horas em cultura simples,^{16,17} não conseguindo aderir e tampouco proliferar;^{18,19} em 48 horas se desintegram no meio.

Foi então acrescentada ao meio de cultura, junto com a insulina e o fator de crescimento, a heparina, que atua como uma ponte entre o fator de crescimento, as células e o substrato, ajudando na aderência dos hepatócitos¹¹ e facilitando a cultura, por contribuir para a organização e aderência das células, e as interações entre a heparina e os hepatócitos mantêm as funções destas células em cultura em longo prazo. Os resultados alcançados neste estudo comprovam a literatura, pois a heparina aumentou a capacidade dos hepatócitos se fixarem ao substrato, e as células permaneceram aderidas por cinco dias.

A concentração sérica da albumina pode ser um indicador útil da alteração da função hepática. A metodologia utilizada foi escolhida por ser rápida, fácil de realizar e apresentar baixo custo, além de ser capaz de detectar baixas concentrações de albumina.

Este trabalho foi concordante com a maioria dos autores, pois os hepatócitos em meio de cultura pouco suplementado não se fixaram às garrafas. Porém, segundo alguns autores, os hepatócitos em cultura pobre são capazes de fixar-se, podendo-se esperar uma secreção de 0,60 +/- 0,33 Ng/hora/106 de albumina. Para hepatócitos em meio de cultura básico, essa função poderia ser mantida por até duas semanas.^{8, 9,10}

Pode-se observar nos dias 1 e 3 um valor aumentado nos dois dias para ambos os grupos, com valor significativamente maior ($p < 0,0079$) para GC em relação a GE, também nos dois dias. Esse resultado era esperado para o primeiro dia de cultivo, porém, a concentração aumentada no terceiro dia entra em contradição com a literatura. Alguns pesquisadores demonstraram uma produção de 33,85 (+/- 9,7) pg/cel/dia em substrato de colágeno; outros observaram uma produção de 2,63 Ng/6X10⁶ hepatócitos em cultura de colágeno, e, segundo o autor, a síntese de albumina é perdida em um ou dois dias de cultura, quando utilizado meio de cultura básico.^{9,10}

Apesar de a metodologia para dosagem de albumina ter sido escolhida, levando-se em consideração as particularidades deste trabalho, alguns problemas foram detectados, como a necessidade de interpretar os resultados em conjunto com informações de outras avaliações. Essa limitação não permite definir com exatidão se a concentração da albumina encontrada é devida à síntese dos hepatócitos.

O processo de peroxidação lipídica gera subprodutos, sendo o MDA um deles, cuja determinação no plasma, em tecido ou na urina é uma maneira de avaliar o estresse oxidativo. A metodologia utilizada é a mais descrita na literatura para dosagem do MDA, sem necessidade de adquirir um kit comercial. É uma técnica simples e rápida, com alta reprodutibilidade de resultados.

Neste trabalho foi observada uma diferença significativamente menor na produção de MDA no dia 1 pelo GE=0,3070 nmol/mg de proteína (+/- 0,1013) e GC=0,8820 nmol/mg de proteína (+/- 0,1676), corroborando estudos realizados em 1998, com reperusão renal, em

que se observou uma elevação significativa de malondialdeído em animais não tratados com alopurinol em comparação com aqueles que receberam a medicação. Os resultados obtidos foram GC=1,687 (+/- 0,21) nmol/mg de proteínas e GE=1,161 (+/- 0,16) nmol/mg de proteínas.⁷ Resultados apresentados em 2003 demonstraram mais uma vez o efeito inibidor do alopurinol, onde foi observada diminuição na formação de RLO após tratamento de animais com o medicamento, sendo os resultados GC=2,0 nmol/mg de proteínas (+/- 0,4) e GE=0,60 nmol/mg de proteínas (+/- 0,06), confirmando também os resultados deste estudo.²⁰

Em 2002, um grupo de pesquisadores desenvolveu um trabalho com hepatócitos fetais *in vivo* e *in vitro*, tendo observado que, embora

o alopurinol diminua o estresse oxidativo, essa redução não chega a interferir no processo de morte celular,¹⁸ sendo esse resultado similar ao deste trabalho, que também não conseguiu demonstrar uma maior viabilidade celular dos hepatócitos extraídos do grupo de animais tratados com o medicamento.

CONCLUSÃO

O alopurinol diminui a produção do malondialdeído, demonstrando menor estresse oxidativo nas células tratadas previamente com o medicamento. Porém, essa diminuição não parece interferir na manutenção da viabilidade celular.

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this work was to observe the protective effect of the allopurinol on the hepatocytes in culture by its inhibitor effect of the xanthine oxidase in generating oxygen-free radicals. **Methods:** Hepatocytes have been isolated from the liver of rats by enzymatic dissociation, according to technique described on 1969 and modified on 1976. Surgical techniques were performed in the experimental operation room of PUC/PR. It were performed initial counting, and the feasibility was calculated using the exclusion test by Trypan blue. The albumin and malondyaldeide concentrations were analyzed using biochemical colorimetric tests. **Results:** The outcome of isolated hepatocytes after enzymatic digestion using collagenase was 1.5×10^6 cel/gr/liver for CG, and 1.7×10^6 cel/gr/liver for SG, with initial 60% feasibility for both groups. The outcome for albumin was of 0.1868 mg/ml (± 0.023) for CG, and 0.1384 mg/ml (± 0.019) for SG. For the malondyaldeide, results were 0.3963 nmol/mg proteins (± 0.098) for CG, and 0.2040 nmol/mg proteins (± 0.058) for SG. **Conclusion:** Allopurinol reduces the production of malondyaldeide, showing lower oxidizer stress in cells previously treated with that medication. But such reduction is not enough to interfere in the support of the cellular feasibility.

Keywords: Hepatocytes; Transplants, Free Radicals.

REFERÊNCIAS:

1. Strom SC. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Seminars in liver disease*. 1999;19:39-48.
2. Nicoluzzi JEL. Viabilidade do fígado bioartificial utilizando hepatócitos humanos protegidos por macroencapsulação. *Rev. Bras. Cir.* 2004;31:311-7.
3. Nordlinger B, Mariani P, Calmus Y. Transplantation d'hépatocytes isolés. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 1994;18:68-77.
4. Yamakami Lys, et al. Transplante de hepatócitos: estado atual dos transplantes. Hepato Ltda. 2002.
5. Xiao-LI, et al. Isolation and primary culture of rat hepatocytes. *HBPD*. 2002;1 77-
6. Sen S, Jalan R. Ideal Hepatocyte: Quest for the Holy Grail. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005;20:1-4.
7. Rhoden EL, et al. Taxa de mortalidade em ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática, tratados ou não com alopurinol. *Acta Cir. Bras.* 1999;4(14).
8. Crema E, et al. Transplante de hepatócitos. In: GONÇALVES E. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia: Transplante de hepatócitos. São Paulo: Robe; 1998. p. 580-6.
9. Nakagiri R, et al. Small scale rat hepatocytes primary culture with applications for screening hepatoprotective substances. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 2003;8(67):1629-35.
10. Kang YH, Berthiaume F, Nath BD, Yarmush ML. Growth factors and nonparenchymal cell conditioned media induce mitogenic responses in stable long-term adult rat hepatocytes culture. *Experimental Cell Research*. 2004;293:239-47.
11. Gonzalez JM. Effect of heparin II domain of fibronectin on actin cytoskeleton and adherens junctions in human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;7(47):2924-31.
12. Strain AJ. Isolated hepatocytes: use in experimental and clinical hepatology. *Leanding Article – Hepatology Series*. 1994;35:433-6.
13. Berry MN, Friends DS. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *The Journal of Biology*. 1969;43:506-0.
14. Thomas RJ, et al. Hepatic stellate cells on poly (DL-lactic acid) surfaces control the formation of 3D hepatocyte co-culture aggregates *in vitro*. *European Cells and Materials*. 2006;11:16-26.
15. Jesus RP, Waitzenberg DL, Campos FG. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. *Rev. Ass Méd Brasil*. 2000;3(46):242-54.
16. Ichihara A, Nakamura T, Tanaka K. Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. *Molecular and cellular Biochemistry*. 1982;43:145-60.
17. Kumar A, et al. Culture of neonatal rat liver cells: A preliminary observation. *Trends Bio. Artif. Organs*. 2002;1(16):34-47.
18. Herrera B, et al. The epithelial mesenchymal transition confers resistance to the apoptotic effects of transforming growth factor β in fetal rat hepatocytes. *Molecular Cancer Research*. 2002;1:68-78.
19. Hatakeyama M, et al. Heparin inhibits IFN-gamma-induced fractalkine/CX3CL1 expression in human endothelial cells. *Inflammation*. 2004;1(28):7-13.
20. Cassandro E. Effect of superoxide dismutase and allopurinol on impulse noise – exposed guinea pigs – electrophysiological and biochemical study. *Acta Otolaryngol.* 2003;123:802-7.