

EFEITOS DA VANCOMICINA, TETRACICLINA, TIGECICLINA E METRONIDAZOL NA PROLIFERAÇÃO/VIABILIDADE DE UMA LINHA DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS

Ana Paula Pacheco

Faculdade de Engenharia – UP
Faculdade de Medicina – UP
appacheco@netcabo.pt

Maria Pia Ferraz

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
mpferraz@ufp.edu.pt

Maria João Coelho

Professora Auxiliar
CEBIMED, Faculdade de Ciências da Saúde – UFP
mcoelho@ufp.edu.pt

Nuno Alegrete

Faculdade de Medicina – UP
nunoalegrete@gmail.com

Maria Helena Fernandes

Professora Catedrática
Faculdade de Medicina Dentária – UP
mhfernandes@fmd.up.pt

RESUMO

Neste estudo foram avaliados mecanismos citotóxicos de alguns antibacterianos usados nos tratamentos de infecções ósseas, nomeadamente vancomicina, tetraciclina, tigeciclina e metronidazol numa gama de concentrações de 0,005 µg/mL a 100 µg/mL. Relativamente à vancomicina não foi encontrada nenhuma evidência de citotoxicidade sobre as células MG63. A tetraciclina tem um efeito tóxico a partir da concentração de 0,5 µg/mL, efeito igualmente verificado na tigeciclina, no entanto para concentrações inferiores a 0,01 µg/mL parece ter ocorrido uma estimulação da divisão celular para este último antibiótico. No caso do metronidazol parece ocorrer logo uma diminuição da proliferação nas concentrações inferiores a 0,05 µg/mL.

PALAVRAS-CHAVE

Citotoxicidade, MG63, antibacterianos, infecções ósseas.

ABSTRACT

In this study the cytotoxicity of some antibacterials commonly used in bone infections, namely vancomycin, tetracycline, tigecyclin and metronidazol in a concentration range of 0.005 µg/mL to 100 µg/mL was evaluated. Vancomycin did not present any evidence of causing cytotoxic effects to MG63 cells. Tetracycline did present toxic effects in concentrations above 0.5 µg/mL. The same phenomena was observed with tigecycline, however in low concentrations (below to 0.01 µg/mL) proliferation of cells seemed to be increased. In the case of metronidazol proliferation was diminished in concentrations below to 0.05 µg/mL.

KEYWORDS

Citotoxicity, MG63 cells, antibacterial, bone infections.

1. INTRODUÇÃO

As infecções ósseas e osteo-articulares, como por exemplo as osteomielites, osteíte, espondilodiscites e a artrite séptica são relativamente frequentes e representam infecções graves em cirurgia ortopédica e traumatologia.

Estas infecções ósseas podem aparecer por disseminação hematogénica ou através de uma infecção contígua (por exemplo: infecção dos tecidos moles adjacentes ou infecção dentária), enquanto a infecção dos tecidos moles adjacentes pode ocorrer por traumatismo (mordedura, cirurgia ou ulceração da pele). Uma vez estabelecidas, estas infecções tendem a progredir para a cronicidade particularmente se a vascularização do local afectado é fraca.

Estas infecções podem ter origem endógena ou exógena (Arder e Salomon *et al.*, 2004) e são maioritariamente de natureza polimicrobiana, sendo as bactérias Gram positivo os microrganismos mais prevalentes, entre os quais assume particular relevância *Staphylococcus aureus*, quer nas infecções comunitárias, quer nas infecções nosocomiais, em indivíduos de todos os grupos etários. O aparecimento de resistência aos antibacterianos constitui outro dos graves problemas associado a estas bactérias. Normalmente o tratamento destas infecções requer a combinação do desbridamento cirúrgico e/ou uma terapia antimicrobiana adequada (Duewelhenke e Krut *et al.*, 2007).

Assim, só os antimicrobianos com elevada bioeficácia no tecido ósseo são aconselháveis nestes tratamentos, sendo normalmente administrados em doses elevadas e durante um longo período de tempo, pelo menos quatro a seis semanas (Duewelhenke e Krut *et al.*, 2007).

Para além do efeito antimicrobiano, estes fármacos podem exercer um efeito directo sobre os osteoblastos que pode ser traduzido na capacidade de regeneração tecidular (Holmes e Still *et al.*, 2004; Klapisz, Wolikow e Saffar, 1996). A caracterização da influência a nível celular reveste-se de particular interesse, uma vez que não existe um estudo sistemático sobre o efeito dos antibacterianos clinicamente usados em infecções do tecido ósseo no processo de remodelação óssea.

As elevadas taxas de insucesso nos tratamentos destas infecções com antimicrobianos estão bem documentadas. Os factores de risco associados a este insucesso são o inadequado desbridamento do tecido ósseo afectado, a presença de material protético, o tempo de duração da infecção e o insucesso do tratamento prévio. Assim, as osteomielites e as infecções osteo-articulares são particularmente difíceis de tratar (Lazzarini e Lipsky *et al.*, 2005).

A selecção do(s) antimicrobiano(s) depende inevitavelmente do(s) agente(s) etiológico(s) isolado(s) e do(s) seu(s) perfil(is) de susceptibilidade frente aos diferentes antimicrobianos (TSA – Teste de sensibilidade/susceptibilidade aos antimicrobianos) e dos factores farmacocinéticos destes, tais como as concentrações atingidas no local da infecção e eventuais efeitos colaterais (Lazzarini e Mader *et al.*, 2004; Mader e Calhoun *et al.*, 2000).

No tratamento cirúrgico destas infecções, idealmente todo o tecido ósseo afectado deveria ser removido, o que nem sempre é possível. Além disso, mesmo o desbridamento cirúrgico precoce implica cerca de três a quatro semanas para revascularização, num indivíduo adulto. Como resultado, no local infectado passa a existir uma baixa tensão de oxigénio e uma baixa penetração dos antimicrobianos. Assim, a anaerobiose nos locais de infecção profun-

da para além de fomentar o desenvolvimento de bactérias anaeróbias pode também alterar a actividade de alguns antibacterianos, como por exemplo a gentamicina e a vancomicina, enquanto a rifampicina e as cefalosporinas não sofrem qualquer alteração.

A penetração dos antibacterianos no tecido ósseo é muito variável e depende de vários factores. Ensaio clínicos comparativos demonstraram a eficácia das fluoroquinolonas em combinação quer com a rifampicina, quer com o ácido fusídico. Nas últimas décadas, o aparecimento de bactérias cada vez mais resistentes, como por exemplo *Staphylococcus aureus* metilicina-resistentes (MRSA) e *Enterococcus* vancomicina-resistentes (VRE) têm sido reconhecidos como agentes causadores de infecções ortopédicas, tendo-se conseguido bons resultados com a utilização de linezolid e quinupristina/dalfopristina.

A periodontite é uma doença na cavidade oral, que na sua forma mais severa promove a infecção do tecido ósseo com perdas significativas deste tecido. São normalmente considerados como agentes patogénicos mais relevantes *Actinobacillus actinomyces*, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus intermedius* (Socransky e Haffajee, 2002). O tratamento desta infecção envolve a administração sistémica de antibióticos durante longos períodos de tempo. Os antibacterianos mais comumente utilizados na terapia periodontal são a tetraciclina, minociclina e doxiciclina, eritromicina, clindamicina, ampicilina, amoxicilina e os nitro-imidazóis (metronidazol e ornidazol) (Mombelli, 2002).

Para as infecções do tecido ósseo existem vários antibacterianos que são clinicamente utilizados, com diferentes espectros de acção, de acordo com o tipo de infecção e o agente etiológico mais prevalente (com base em análises epidemiológicas) ou de acordo com o tipo de agente etiológico isolado e o seu TSA.

Neste estudo foi utilizada uma linha celular osteoblástica humana para avaliação da influência dos antibacterianos nestas células. Essa avaliação foi feita com base na quantificação de proliferação/viabilidade celular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS OSTEoblásticas NA PRESENÇA DE ANTIMICROBIANOS

A linha celular MG63 (ATCC) obtida de osteosarcoma humano foi cultivada em α -Minimum Essential Medium (α -MEM, GIBCO) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal, 1% (v/v) de penicilina – estreptomina (100UI e 100 mg/mL, respectivamente), 1% (v/v) de ácido ascórbico (50 μ g/mL) e 1% (v/v) de anfotericina B (2,5 μ g/mL) até atingirem a confluência. As células aderidas foram enzimaticamente libertadas (tripsina 1:250, Sigma), contadas usando um hemocitómetro e cultivadas a 5×10^3 células/cm² em placas de cultura de 96 poços de acordo com as condições experimentais previamente detalhadas (Ferraz e Knowles *et al.*, 2000).

As células em subcultura foram cultivadas (10^4 células/cm²) por um período de 3 ou 6 dias em condições controlo (ausência de antimicrobianos) e na presença de uma gama de concentrações de vancomicina, tetraciclina, tigeciclina e metronidazol (0,005 μ g/mL, 0,01 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 40 μ g/mL, 60 μ g/mL, 80 μ g/mL e 100 μ g/mL). As concentrações de 400 e 600 μ g/mL foram ainda testadas apenas para o

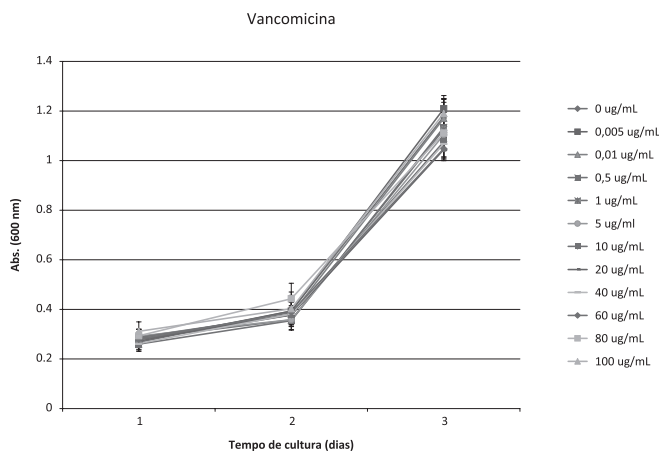
metronidazol, uma vez que o efeito destas concentrações já é conhecido para os outros antibacterianos testados. A monitorização das culturas foi feita diariamente, utilizando um microscópio de contraste de fase.

Foi utilizado o método colorimétrico MTT que consiste em medir indirectamente a viabilidade celular pela actividade enzimática mitocondrial das células vivas. Este método mede a redução do sal amarelo tetrazólio num produto insolúvel de formazan pelas mitocôndrias das células viáveis. Com efeito, as células foram incubadas com 10 μL de MTT (0,5 mg/mL) durante 3 horas em estufa humidificada a 37°C e contendo 5% de CO_2 . Após incubação, removeu-se o meio e adicionou-se 200 μL de DMSO para lisar as células e solubilizar os cristais coloridos. A absorvância foi posteriormente determinada num leitor de microplacas a 600 nm. Segundo este método, a intensidade de cor produzida é directamente proporcional ao número de células viáveis.

Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão. O significado estatístico foi analisado pelo teste-t de Student bi-caudal e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão representados na Figura 1 a-d.



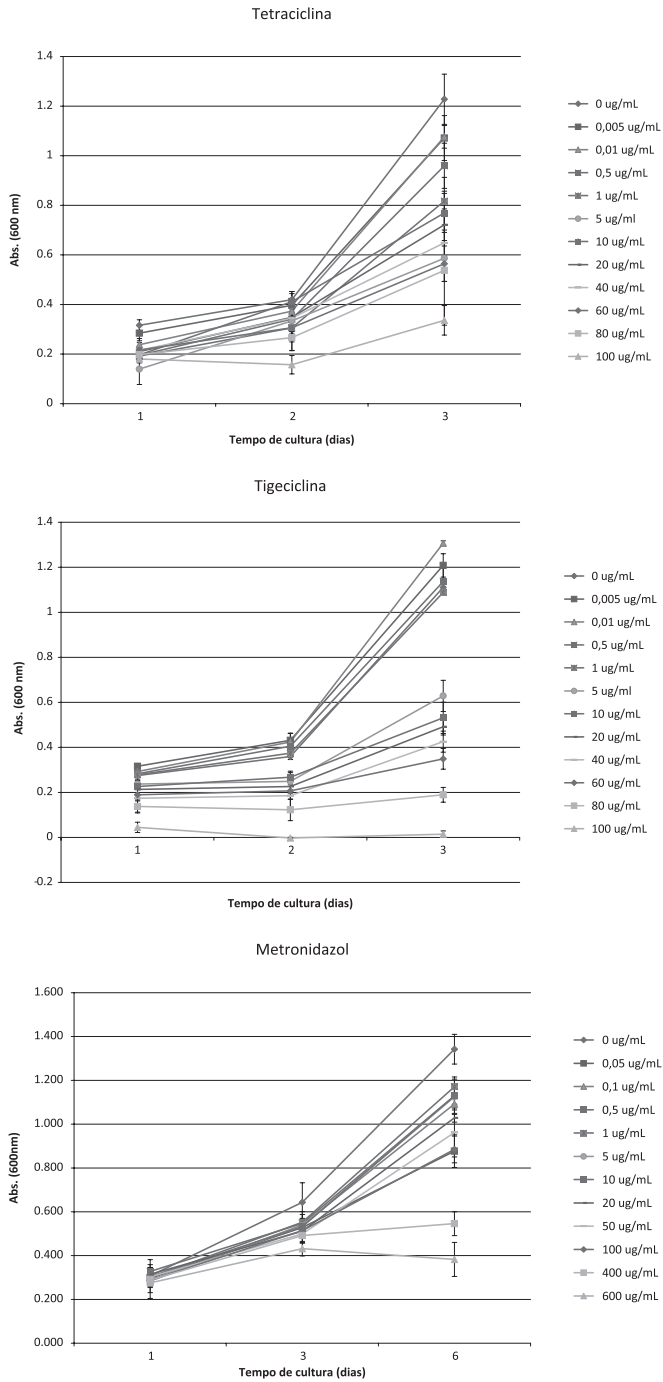


Figura 1. Efeito das diferentes concentrações de a) vancomicina, b) tetraciclina, c) tigeciclina e d) metronidazol na proliferação/viabilidade celular de células MG63.

Os resultados obtidos (Fig. 1a), quando comparados com o controlo (ausência de antibacteriano), demonstram que a vancomicina não possui um efeito citotóxico ou citostático sobre as células MG63, uma das razões possíveis poderá ser pelo facto de estes antibacterianos inibidores da síntese do peptidoglicano (estrutura única de células procaríotas), não conseguirem atingir o citosol da célula na ausência de receptores específicos.

Em contrapartida quando se utilizou tetraciclina ou tigeciclina este tipo de efeito já se observou. No caso da tetraciclina (Fig. 1b) notou-se uma diminuição gradual da proliferação celular para concentrações superiores a 0,5 µg/mL, observando-se uma diminuição mais acentuada para concentrações superiores a 80 µg/mL. No caso da tigeciclina (Fig. 1c) observou-se uma diminuição acentuada da proliferação celular a partir da concentração 0,5 µg/mL, no entanto para as concentrações 0,005 µg/mL e 0,01 µg/mL parece ter ocorrido uma estimulação da divisão celular. As moléculas pertencentes à família das tetraciclinas ou gliciliclinas são antibacterianos conhecidos por inibirem a síntese proteica em células procaríotas, eucariotas e até mesmo em mitocôndrias isoladas (Düwelhenke e Krut et al., 2007).

No caso do metronidazol (Fig. 1d) ocorre logo uma diminuição da proliferação nas concentrações entre 0,05 µg/mL até 100 µg/mL, embora a diminuição da proliferação se torne mais evidente para as concentrações superiores a 100 µg/mL. O metronidazol é um antimicrobiano que parece afectar a síntese de DNA.

4. CONCLUSÃO

Este estudo teve como finalidade tomar conhecimento da citotoxicidade de alguns antibacterianos usados nos tratamentos de infecções ósseas. Relativamente à vancomicina não foi encontrada nenhuma evidência deste efeito sobre as células MG63. A tetraciclina tem um efeito tóxico a partir da concentração 0,5 µg/mL, este mesmo efeito é verificado na tigeciclina, no entanto para concentrações inferiores a 0,01 µg/mL parece ter ocorrido uma estimulação da divisão celular para este último antibacteriano. No caso do metronidazol ocorre logo uma diminuição da proliferação nas concentrações acima de 0,05 µg/mL. Verificou-se uma significativa redução da proliferação celular para as concentrações de 400 µg/mL e 600 µg/mL de metronidazol, verificando-se que à semelhança do que acontece para os outros antibacterianos estudados (trabalho submetido a publicação) este efeito deve-se à precipitação das proteínas do soro e não a um efeito citotóxico directo.

Este estudo sugere que a utilização destes antimicrobianos em doses usadas sistemicamente não causa qualquer efeito negativo na proliferação de células osteoblásticas. No entanto, no caso de se equacionar a libertação local dos antimicrobianos aqui estudados, deve-se considerar os resultados obtidos.

BIBLIOGRAFIA

- ARDER, F., SALOMON, J., PERRONE, C.; BERNARD, L. (2004). Is Bone Infection of Endogenous or Exogenous Origin? A Pathophysiological Approach. *In: Médecine et Maladies Infectieuses*, 34, pp. 530 – 537.
- BRADY, R. A., LEID, J. G., COSTERTON, J. W., SHIRTLIFF, M. E. (2006). Identification of *Staphylococcus aureus* proteins recognized by the antibody-mediated immune response to a biofilm infection. *In: Infection and immunity*, 74(6), pp. 3415-3426.
- DARLEY, E. S. R., MACGOWAN, A. P. (2004). Antibiotic Treatment of Gram-positive Bone and Joint Infections. *In: Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), pp. 928-935.
- DUEWELHENKE, N., KRUT, O., EYSEL, P. (2007). Influence on Mitochondria and Cytotoxicity of Different Antibiotics Administered in High Concentrations on Primary Human Osteoblasts and Cell Lines. *In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), pp. 54-63.
- FERRAZ, M. P., KNOWLES, J. C., OLSEN, I., MONTEIRO, F. J., SANTOS, J. D. (2000). Flow cytometry analysis of the effects of pre-immersion on the biocompatibility of glass-reinforced hydroxyapatite plasma sprayed coatings. *In: Biomaterials*, 21 (8), pp. 813-820.
- HOLMES, S. G., STILL, K., BUTTLE, D. J., BISHOP, N. J., GRABOWSKI, P. S. (2004). Chemically Modified Tetracyclines Act Through Multiple Mechanisms Directly on Osteoclast Precursors. *In: Bone* ;35(2), pp. 471-478.
- KLAPISZ-WOLIKOW, M., SAFFAR, J. L. (1996). Minocycline Impairment of Both Osteoid Tissue Removal and Osteoclastic Resorption in a Synchronized Model of Remodeling in the Rat. *In: Journal of Cellular Physiology*, 167(2), pp. 359-368.
- LAZZARINI, L., LIPSKY, B. A., MADER, J.T. (2005). Antibiotic Treatment of Osteomyelitis: What Have We Learned from 30 years of Clinical Trials? *In: International Journal of Infectious Diseases*, 9(3), pp. 127-138.
- LAZZARINI, L., MADER, J. T., CALHOUN, J. H. (2004) Osteomyelitis in Long Bones. *In: Journal of Bone and Joint Surgery*, 86A(10), pp. 2305-2318.
- MADER, J. T., CALHOUN, J. H. (2000). Osteomyelitis. *In: Mandell, G. L., Bennett, J. E., Dolin, R. (Ed.). Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia, USA: Churchill Livingstone, pp. 150-210.
- MOMBELLI, A. (2002). Antibiotics in Periodontal Therapy. *In: Lindhe, J., Karring, T., Lang, N. P. (Ed.). Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, Copenhagen, Munksgaard, pp. 134-190.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D. (2002). Microbiology of Periodontal Disease. *In: Lindhe, J., Karring, T., Lang, N. P. (Ed.). Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, Copenhagen, Munksgaard, pp. 215-289.