***In Vitro* Effects of *Natrum muriaticum* in Kidney Cell Lines MDCK and LLC-PK1**

Rafael Cardoso Harduim, Venício Féo da Veiga, Vanessa da Silva Baldez,
Marcelo Einicker-Lamas, Carla Holandino.

Federal University of Rio de Janeiro – UFRJ, Brazil

ABSTRACT

Previous papers have indicated that homeopathic solutions modify the cellular and biochemical aspects of cells maintained in culture. In this study, the effects of *Natrum muriaticum*, a medicine used in the homeopathic clinic for the treatment of hypertension, were evaluated in kidney MDCK and LLC-PK1 cell lines. The following cellular parameters were analyzed: viability, morphology and expression of the (Na⁺-K⁺)-ATPase and the angiotensin II receptors AT₁ and AT₂. The cell lines were plated (5.0 x 10⁴ cells/mL) in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). After 24 hours at 37°C, DMEM was re-fed with the addition of 10% (V/V) and 1% (V/V) of the following samples: *Natrum muriaticum* 30CH, water 30CH and non-dynamized sterile distilled water to do the MTT assay. The results obtained from these groups were compared to those obtained by incubation of the cells in culture medium free of these solutions (Control). Cell viability was assessed by a colorimetric MTT ELISA assay (490nm). The values from four independent experiments performed in quintuplicate were plotted and statistically analyzed by Sigma Plot v.11 (Jandel Scientific). The morphology of MDCK cells was evaluated by optical microscope after Giemsa's staining. The expression of the (Na⁺+K⁺)-ATPase and AT₁/AT₂ of LLC-PK1 cells was evaluated by Western Blot (WB) analysis. For this experimental set, 5.0x10⁴ cells/mL were incubated in DMEM supplemented with 10% FCS and daily culture medium was replaced by a new one, containing: *Natrum muriaticum* 30CH and water 30CH. Additionally, cells were treated for 5, 10 and 15 days with 1% of specific solutions and the total protein was measured by the Lowry method, after cell lysis. The samples were analyzed by electrophoresis in SDS-PAGE (12% gel) and transferred to nitrocellulose membrane. This membrane was incubated with specific primary antibodies (anti-(Na⁺+K⁺)-ATPase, anti-AT₁ and AT₂ or anti-anti-beta-actin). The detection was performed using ECL system and Hyperfilm. MTT assays showed a statistically significant reduction in cellular mitochondrial activity (p<0.001) probably attributed to an osmotic effect due to the use of 10% (V/V) concentration rather than 1% (V/V). The optical microscopy analysis revealed no significant morphological changes in MDCK and LLC-PK1 cells submitted to the different treatments when compared to controls groups. The WB analysis indicated a proportional increase in (Na⁺+K⁺)-ATPase content according to an increase in the homeopathic stimuli. Although preliminary, these results show for the first time, that the homeopathic medicine is able to modify the expression of important physiological markers for LLC-PK1 cells, which are directly involved in the genesis of hypertension.

Keywords: Homeopathy, *Natrum muriaticum*, hypertension, MDCK, LLC-PK1.

Efeitos *in vitro* de *Natrum muriaticum* nas linhagens renais MDCK e LLC-PK1

RESUMO

Trabalhos prévios têm indicado que soluções homeopáticas modificam os aspectos celulares e bioquímicos de células mantidas em cultura. No presente estudo, os efeitos de *Natrum muriaticum*, medicamento usado na clínica homeopática para o tratamento de hipertensão, foram avaliados em células renais das linhagens MDCK e LLC-PK1. Os seguintes parâmetros celulares foram analisados: viabilidade, morfologia e expressão da (Na⁺-K⁺)-ATPase e dos receptores AT1 e AT2 da angiotensina II. As linhagens celulares foram plaqueadas (5,0 x 10⁴ células/mL) em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24 horas a 37°C, o meio DMEM foi substituído com a adição de 10% (v/v) e 1% (v/v) das seguintes amostras: *Natrum muriaticum* 30CH, água dinamizada 30CH e água destilada estéril, para a medida de viabilidade celular por MTT. As absorbâncias quantificadas em leitor de ELISA (490 nm) foram comparadas entre si e com os valores obtidos com o grupo controle (células isentas de tratamento). Os valores obtidos de quatro experimentos independentes realizados em quintuplicata foram tabulados e analisados estatisticamente pelo Software Sigma Plot v.11 (Jandel Scientific). A morfologia das células MDCK foi avaliada por microscópio óptico após coloração de Giemsa e a expressão da (Na⁺-K⁺)-ATPase e AT1/AT2 de células LLC-PK1 por *Western Blot* (WB). Para ambos experimentos, 5,0 x 10⁴ células/mL foram incubadas em DMEM suplementado com 10% SFB sendo o meio de cultura diariamente substituído por um novo, contendo 1% de *Natrum muriaticum* 30CH e água dinamizada 30CH, por 5, 10 e 15 dias. A quantificação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry, após lise celular. As amostras foram analisadas por eletroforese em SDS-PAGE (12%) e transferidos para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi incubada com anticorpos específicos primário (anti-(Na⁺-K⁺)-ATPase, anti-AT1 e AT2 ou anti-anti-beta-actina). A detecção foi realizada utilizando o sistema ECL e Hyperfilm. Os ensaios de MTT mostraram uma redução estatisticamente significativa na atividade mitocondrial celular (p <0,001), indicando um efeito osmótico decorrente da incubação com as soluções teste na concentração de 10% (v/v). Não foram detectadas alterações morfológicas significativas quando ambas as linhagens foram submetidas aos diferentes tratamentos. A análise por WB indicou um aumento proporcional da quantidade (Na⁺-K⁺)-ATPase expressa na linhagem LLC-PK1 em função do número de estímulos homeopáticos aplicado. Embora preliminares estes resultados evidenciam, pela primeira vez, que o estímulo homeopático parece modificar a expressão de importantes marcadores fisiológicos da linhagem LLC-PK1 que estão diretamente envolvidos na gênese da hipertensão arterial.

Keywords: Homeopatia, *Natrum muriaticum*, hipertensão arterial, MDCK, LLC-PK1.

Licensed to [GIRI](http://www.giri.org.br)

Support: CNPq, FAPERJ and FUJB

Conflict of interest: authors declare there is no conflict of interest

Correspondence author: Carla Holandino Quarema, cholandino@gmail.com

How to cite this article: Harduin RC, Veiga VF, Baldez VS, Einicker-Lamas M, Holandino C. *In vitro* effects of *Natrum muriaticum* in Kidney Cell Lines MDCK and LLC-PK1. Int J High Dilution Res [online]. 2011 [cited YYYY Month dd]; 10(36): 172-173. Proceedings of the XXV GIRI Symposium and VIII CBFH; 2011 Sep 04-07; Foz do Iguaçu (Brazil). GIRI and ABFH; 2011; Available from: <http://www.feg.unesp.br/~ojs/index.php/ijhdr/article/view/498/510>