

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNA GABRIELLE GOMES COUTINHO

**EFEITO DA GENTAMICINA EM CULTURA DE CÉLULAS TUBULARES
RENAIS (MDCK)**

**Curitiba
2010**

ANNA GABRIELLE GOMES COUTINHO

**EFEITO DA GENTAMICINA EM CULTURA DE CÉLULAS TUBULARES
RENAIS (MDCK)**

Monografia de Conclusão de Curso
de Graduação em Ciências
Biológicas, apresentado ao
Departamento de Fisiologia, do
Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Lúcia
Tararhuch.

**Curitiba
2010**

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho, a todos aqueles que estiveram presentes de alguma forma em minha vida, e me influenciaram de alguma maneira em minhas escolhas.

À minha mãe, Cristiane Gomes Coutinho, que durante todo o curso de Ciências Biológicas me ajudou e me incentivou a seguir em frente, todas as vezes em que quase desisti.

Aos meus colegas de curso, Ana Patrícia Mykito, Guilherme Damasio, Natascha Wosnick, Rhayla Gomes Meneguim e Ximene Baggio Hess. Agradeço por terem me proporcionado momentos tão felizes durante o curso e também por terem me ajudado sempre que precisei de algo.

Agradeço especialmente à Prof. Ana Lúcia Tararthuch, por ter me recebido em seu laboratório com tanto carinho e paciência. Agradeço a ela também pelo entusiasmo que demonstrou em trabalhar comigo, mesmo com os empecilhos que encontramos durante a realização do projeto.

Ao meu namorado e amigo, Fernando Maicon D'Aquino, que me deu muito carinho e incentivo para eu concluir minha monografia.

RESUMO

Há muito já se sabe que o antibiótico aminoglicosídico gentamicina é capaz de provocar danos em células renais, tanto tubulares como também glomerulares. Vários trabalhos têm sido documentados em relação aos danos nefrotóxicos em células tubulares proximais, alguns relacionados a danos glomerulares e muito poucos relacionados a danos de células tubulares distais. O trabalho presente busca justamente criar um modelo viável para futuras pesquisas com danos nefrotóxicos distais causados pela gentamicina. Foi utilizada cultura de células MDCK- C11, semelhantes às células do ducto coletor. Estas células foram cultivadas em *Minimum Essential Medium* (MEM), suplementado com soro bovino fetal a 10%. A partir deste meio de cultura, foram criados três grupos para análise de resultados: Grupo controle (C24), Grupo gentamicina (G24) e Grupo gentamicina com células em suspensão (GS). Após 24 horas, foi avaliada a viabilidade celular nos grupos C24 e G24. Já no grupo GS avaliou-se a viabilidade em um experimento agudo, já que foi acrescido de gentamicina 1,5mM enquanto as células ainda não se encontravam aderidas. Os grupos C24 e G24 foram submetidos também à análise da capacidade de proliferação celular, após 24 horas. Um último experimento consistiu na manutenção de células em placa, expostas as concentrações de 1,5 e 3,0mM de gentamicina. Essas foram depois fotografadas em microscópio invertido, para observação de possíveis diferenças no aspecto das células. Através desses experimentos constatou-se a capacidade de influência da gentamicina sobre as células MDCK.

Palavras-chave: gentamicina; células MDCK; danos nefrotóxicos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Eventos inflamatórios envolvidos na insuficiência renal progressiva.....	08
Gráfico 1 – Proliferação de células do controle e de células expostas à gentamicina 3,0mM.....	19
Gráfico 2 – Porcentagem de viabilidade de células controle e de células expostas à gentamicina.....	19
Gráfico 3 – Variação da viabilidade das células em diferentes intervalos de tempo.....	20
Fotografia1 - Células MDCK controle.....	21
Fotografia 2 – Células MDCK com gentamicina 1,5mM.....	21
Fotografia 3 – Células MDCK com gentamicina 3,0mM.....	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	07
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. CULTURA DO SUBTIPO C11 DE CÉLULAS MDCK	16
3.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	16
3.2.1 Viabilidade celular.....	17
3.2.2 Proliferação.....	17
3.2.3 Fotomicroscopia.....	18
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência renal é caracterizada por alteração das funções dos rins, nas quais esses órgãos são incapazes de eliminar as substâncias tóxicas do sangue de forma adequada. Além disso, a importante participação do rim no equilíbrio hidroeletrolítico e no equilíbrio ácido-base pode também estar comprometida. As causas da insuficiência renal são inúmeras, onde algumas acarretam diminuição rápida da função renal (insuficiência renal aguda), enquanto outras acarretam diminuição lenta e gradual da função renal (insuficiência renal crônica).

O termo insuficiência renal aguda (IRA) é utilizado para danos renais ocasionados por isquemia, agentes nefrotóxicos (drogas e venenos), ou ambos. A IRA abrange uma série de condições clínicas caracterizadas por retenção de compostos nitrogenados, associados com redução de volume urinário (SCHOR, 1997).

A patogênese envolvida na progressão da insuficiência renal ainda é desconhecida. Existem fortes evidências da participação de mecanismos celulares e inflamatórios no desenvolvimento de doenças renais.

A maioria dos eventos que resultam em uma doença renal progressiva, independentemente de qual seja o insulto renal inicial, (causado pelo uso de antibióticos, drogas, por hipertensão, diabetes, etc), estão mais intimamente ligados ao compartimento tubular. Embora, fatores mecânicos como hipertensão e hipertrofia glomerular sejam susceptíveis a contribuição de algumas formas de doença renal, lesões tubulares não podem ser simplesmente interpretadas como uma seqüela isquêmica da esclerose glomerular.

Nos últimos anos, mais atenção tem sido dada a presença de processos inflamatórios em diversos tipos de lesão renal progressiva. Segundo NORONHA (et al 2002), o desenvolvimento da doença renal progressiva ocorre mesmo após a resolução do insulto inicial, sugerindo que, as cascatas de eventos inflamatórios e celulares, uma vez ativadas, têm um modelo autônomo e progressivo. A inflamação nos túbulos inclui o afluxo e proliferação de células inflamatórias

capazes de produzir uma variedade de mediadores inflamatórios locais bem como ativação de outras células renais intrínsecas (FIG.1).

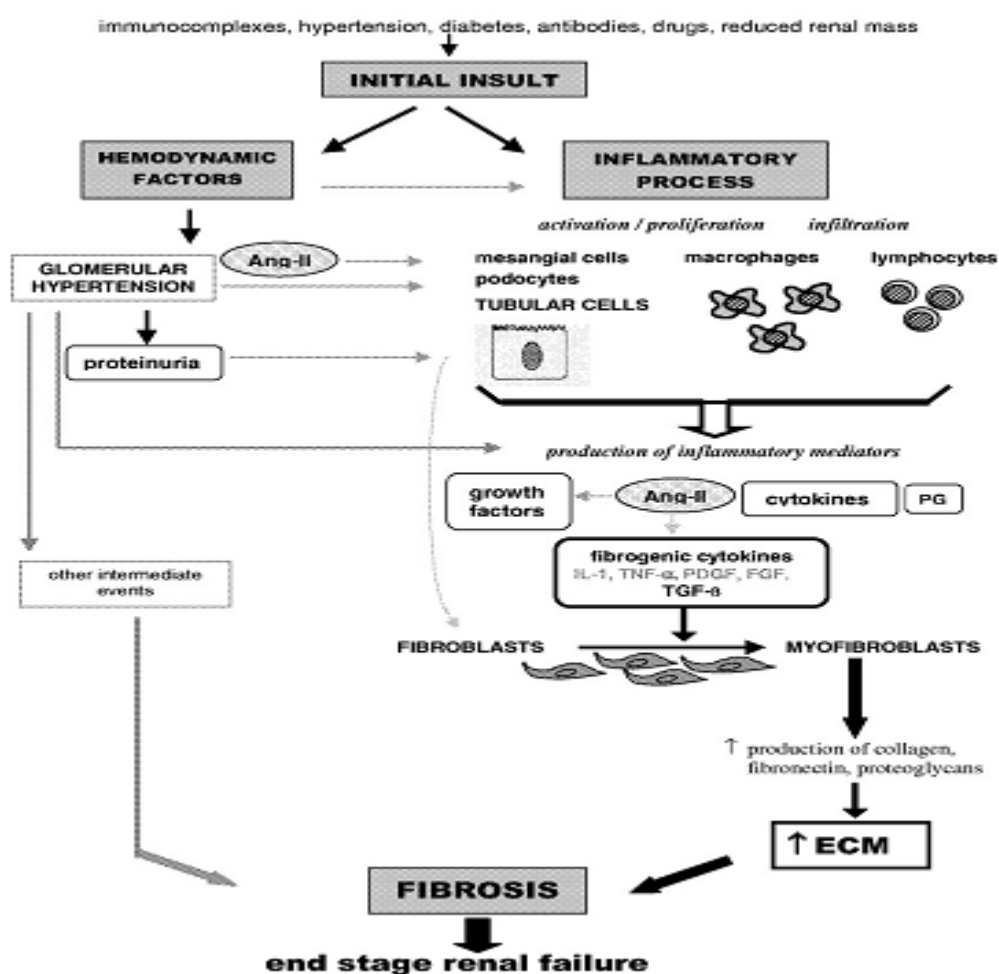


FIGURA 1- EVENTOS INFLAMATÓRIOS ENVOLVIDOS NA INSUFICIÊNCIA RENAL PROGRESSIVA

FONTE: Noronha, I. L. et al. Nephrol. Dial. Transplant. (2002)

Estes autores sugerem que o método da imunofenotipagem confirmou um aumento no número de macrófagos e linfócitos T e B nas áreas renais afetadas. Células inflamatórias migram impulsionadas pela expressão de moléculas como quimiocinas e moléculas de adesão, produzidas por células tubulares ativadas pelo injúrio. Tanto linfócitos CD4 como CD8 (subtipos de células T), têm sido identificados em várias formas de lesão renal. Estas células, uma vez ativadas, são capazes de liberar citocinas que serão de importância crucial para o desenvolvimento do processo imune inflamatório local. Os linfócitos T irão produzir mediadores como o interferon gama que irá ativar a expressão do MHC,

permitindo às células tubulares atuarem como apresentadoras de antígenos prejudiciais à célula. Além disso, o interferon gama é uma molécula capaz de ativar macrófagos (principais leucócitos encontrados no tecido renal lesionado), que por sua vez irão ativar a produção de uma série de fatores de crescimento, considerados importantes mediadores no processo de fibrogênese. Os macrófagos podem mediar a lesão tecidual por diferentes caminhos. Possuem a capacidade de produção de enzimas proteolíticas, espécies reativas ao oxigênio e substâncias vasoativas, além de sintetizar citocinas e os fatores de crescimento fibrogênicos, responsáveis pela formação de um ambiente inflamatório. A manutenção da presença dessas células em fases posteriores da doença renal, sugere que os macrófagos também estão envolvidos no processo inflamatório crônico, que leva ao desenvolvimento de alterações fibróticas.

A maioria das células renais mostra atividade proliferativa. As evidências da atividade celular na doença renal progressiva são refletidas por este estado contínuo de proliferação. A atividade proliferativa ocorre dentro de glomérulos e em áreas de lesão tubulointersticial. A atividade proliferativa é um fenômeno que ocorre não apenas nas células intersticiais, mas também nas tubulares epiteliais, sugerindo uma possível participação de células tubulares na patogênese da fibrose intersticial renal.

A fibrogênese, mediada por fibroblastos, é uma resposta ao dano do tecido renal e ao processo inflamatório. Na doença renal progressiva, a fibrose não pode ser contida. Pelo contrário, o processo se perpetua e é caracterizado por um persistente processo inflamatório crônico, cicatrização tecidual e destruição da arquitetura original do rim. Os fibroblastos sintetizam uma variedade de componentes de matriz extracelular e a superprodução de proteínas durante a fibrogênese leva ao excessivo acúmulo de colágeno e à fibrose.

Um mediador local que participa na doença renal progressiva, a Angiotensina II, deve ser considerado. Além de seus efeitos hemodinâmicos, a Angiotensina II exerce sua ação em células que participam do processo inflamatório e de fibrose tecidual. Este mediador age como um fator de crescimento, aumentando a proliferação de fibroblastos e de células mesangiais e estimulando síntese de matriz extracelular. A Angiotensina II é capaz ainda de estimular a proliferação de células T (NORONHA, 2002).

Danos glomerulares e alterações funcionais têm sido descritos, mas documentados de forma mais discreta (RODRIGUEZ-BARBERO, 1995). Algumas drogas como a ciclosporina, cisplatina e gentamicina têm sido administradas experimentalmente. O objetivo é de se produzir danos renais, elucidando de maneira bastante eficiente quais fenômenos podem estar envolvidos com a progressão da insuficiência renal (MURRAY, 1985). Por outro lado, a partir de estudos utilizando modelos experimentais de nefrotoxicidade, é possível estabelecer mecanismos de proteção do tecido renal.

A gentamicina, que é o foco principal deste trabalho é um antibiótico aminoglicosídico, usado no tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas, sendo sua utilização recomendada em casos mais graves. No início da década de 60, ocorria a explosão comercial do uso terapêutico da gentamicina. Cerca de 50% dos indivíduos que faziam uso deste antibiótico apresentavam insuficiência renal aguda. Já ao final da década de 60 começaram a aparecer relatos baseados em estudos experimentais sobre os efeitos nefrotóxicos dos aminoglicosídeos (FALCO, 1969). Com o avanço dos estudos, os quadros de insuficiência renal aguda por uso de gentamicina estão hoje na faixa dos 10 a 20% e o modelo experimental de IRA induzida por este antibiótico tornou-se clássico.

A gentamicina é normalmente administrada via endovenosa, não é metabolizada, sendo filtrada facilmente pelo glomérulo renal. Grande parte dos relatos indica que a nefrotoxicidade está mais diretamente relacionada à necrose tubular, sem alteração na morfologia glomerular. Entretanto, uma acentuada diminuição do Ritmo de Filtração Glomerular é descrito, além dos relatos que demonstram que a proteinúria observada em ratos tratados com gentamicina pode ser de origem glomerular (COIMBRA, 1988).

De forma geral, o aparecimento do quadro de proteinúria (presença de proteínas na urina) tanto pode ser de origem glomerular, quanto de origem tubular. A membrana capilar glomerular possui três camadas principais: o endotélio capilar, a membrana basal e uma camada de células epiteliais, os podócitos, ao redor da superfície externa da membrana basal capilar. Juntas, essas camadas compõem uma barreira de filtração que, apesar das três camadas, filtra diversas centenas de vezes mais água e solutos do que uma

membrana capilar normal. Mesmo com essa taxa de filtração, a barreira glomerular normalmente não filtra proteínas plasmáticas, já que quase todas as suas camadas fornecem barreiras para a filtração das proteínas do plasma pela presença de cargas negativas, mais eficientemente na membrana basal. Em certas doenças renais, a condição de proteinúria ou albuminúria ocorre quando proteínas de baixo peso molecular, especialmente a albumina são filtradas através da membrana glomerular. As cargas negativas na membrana basal são perdidas até mesmo antes que haja alterações histológicas notáveis. Como resultado dessa perda de cargas negativas nas membranas basais das células afetadas, ocorre a filtração dessas proteínas de baixo peso molecular e desenvolve-se então a condição do aparecimento de proteínas na urina. (GUYTON & HALL, 2006; MELLO-AIRES, 1999).

A proteinúria de origem tubular irá ocorrer quando os túbulos renais se tornam incapazes de reabsorver proteínas. Proteínas e peptídeos filtrados são reabsorvidos preferencialmente pelo túbulo proximal, através de duas maneiras. Um mecanismo consiste na endocitose seguida de hidrólise ácida intracelular, após fusão de endossomas com lisossomas. O outro mecanismo consiste na reabsorção de proteínas e peptídeos na forma de aminoácidos, após hidrólise extracelular por peptidases existentes na borda em escova da membrana luminal dos túbulos. (MELLO-AIRES, 1999).

Animais expostos a um tratamento crônico com gentamicina demonstram uma diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e alteração da dinâmica intraglomerular, com um notável decréscimo no coeficiente de filtração (Kf). Isso reforça uma relação entre TFG e Kf nos mecanismos de ação das toxinas. O Kf é a medida do produto da condutividade hidráulica e da área de superfície dos capilares glomerulares. Não pode ser medido diretamente, mas é estimado experimentalmente pela divisão da taxa de filtração glomerular pela pressão líquida de filtração. (GUYTON & HALL, 2006; MELLO-AIRES, 1999). A regulação do coeficiente de filtração é um fenômeno dinâmico que depende principalmente do grau de contração das células mesangiais intraglomerulares, por modificação da superfície de ultrafiltração.

Alterações no Kf podem estar relacionadas à ação da gentamicina sobre as células mesangiais. As células mesangiais estão localizadas na parede vascular

do centro do tufo glomerular, entre as alças capilares (MENÉ, 1989). São ricas em microfilamentos de actina e miosina e, dentre suas principais funções, são capazes de controlar a filtração glomerular, através de sua capacidade de contração e relaxamento. O tônus mesangial exerce uma tração mecânica na membrana basal glomerular e no revestimento endotelial capilar, o que determina a área de superfície de filtração e o Kf. A contração e o relaxamento das células mesangiais podem ser alterados tanto por substâncias endógenas como exógenas. Tem-se observado que substâncias nefrotóxicas como a gentamicina agem nas células mesangiais induzindo a contração, aumentando a proliferação celular e causando necrose celular. A redução da superfície de ultrafiltração glomerular induzida por contração glomerular poderia ser uma condizente explicação para o decréscimo da taxa de filtração glomerular após tratamento com antibióticos aminoglicosídicos. A proliferação pode ser interpretada como uma resposta de reparo ao dano causado pela gentamicina aos compartimentos mesangiais ou adjacentes a estes. A gentamicina é capaz de estimular contração e proliferação em culturas primárias de células mesangiais a partir do aumento da concentração intracelular do cálcio (causando tanto o influxo de cálcio do meio externo para o citosol das células mesangiais, quanto a liberação de cálcio dos compartimentos celulares internos). A habilidade de bloqueadores de canais de cálcio de inibir a contração e proliferação das células mesangiais induzidas por substâncias como a gentamicina, demonstra que este aumento do cálcio livre no citosol é necessário para ambos os processos ocorrerem nas células mesangiais. (RODRIGUEZ-BARBERO, 1995, 2000).

Células mesangiais são capazes de expressar receptores de cálcio, (CaR). Agindo nos receptores de cálcio CaR, os aminoglicosídeos induzem o mediador inositol 3-fosfato a liberar cálcio dos compartimentos celulares internos, como o retículo endoplasmático, resultando em um acréscimo na concentração de cálcio intracelular. Uma parte dos íons cálcio liberados são reabsorvidos pelo compartimento interno que os liberaram ao passo que uma fração indeterminada de íons escapa para fora da célula, por difusão simples. Como nem todo o cálcio liberado volta ao armazenamento interno, a concentração de cálcio cada vez mais baixa atinge um limiar que desencadeia uma via de sinalização que abre canais de cálcio da superfície celular, o que permite o reabastecimento dos

compartimentos intracelulares com cálcio. (WARD, 2002; MARTINEZ-SALGADO, 2007).

Danos tubulares têm sido mostrados em experimentos que observam os efeitos da gentamicina sobre a adesão, a proliferação e a taxa de apoptose de células tubulares renais em cultura, (SERVAIS, 2005; JUAN, 2007; PESSOA, 2009).

Em células do túbulo proximal, a ação tóxica dos aminoglicosídeos está relacionada ao acúmulo destas substâncias nos lisossomos. O processo de endocitose, nestes casos, pode estar sendo mediado por receptores de superfície, como a glicoproteína 330 e a megalina (MOESTRUP, 1995). Os aminoglicosídeos concentram-se nos espaços intravilares da borda em escova, ligando-se aos fosfolípidios da superfície celular, de modo a desencadear a endocitose e o acúmulo de substâncias tóxicas nas vesículas.

Existem poucos achados a respeito da ação de aminoglicosídeos sobre células distais. MYRDAL (2005), associou a captação de gentamicina em células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*), as quais são semelhantes às células do segmento distal, à estimulação de receptores TRPV. Os receptores TRPV pertencem à família dos receptores TRP, os quais possuem não só atividade de receptor de membrana como também de canal iônico. Os TRPV são responsivos à cálcio. Os autores propõem com este modelo, uma via não endocítica de ação da gentamicina.

As células MDCK fazem parte de uma linhagem de células permanentes, com propriedades semelhantes às do néfron distal. São comumente utilizadas como modelo para estudos envolvendo polarização epitelial, formação e regulação de *tight junctions*, transporte transepitelial, mecanismos de infecção, propriedades e regulação de canais iônicos, etc. Apresentam, na membrana apical, mecanismos de transporte como trocador Na^+/H^+ , H^+ -ATPases, H^+/K^+ -ATPase e trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, bem como canais para Cl^- e K^+ . Na membrana basolateral foi verificada atividade do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, Na^+/K^+ -ATPase, trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, canais para K^+ e Ca^{++} . A diferença de potencial transepitelial é de aproximadamente -50 mV (lúmen negativa) e a resistência está entre 200 e $4000 \Omega/\text{cm}^2$ (LANG, 1995). São células capazes de secretar Cl^- e H^+ . No entanto, as MDCK não representam uma população homogênea de células,

pois já foram descritos vários clones, particularmente os subtipos, C7 e C11. C7 são células baixas, poligonais, com espaços intercelulares pouco nítidos e núcleo visível. Apresentam uma alta resistência ($>4000 \Omega/\text{cm}^2$); são secretoras de K^+ , com sensibilidade ao amiloride e à aldosterona. C11 são células altas, poligonais, com espaços intercelulares nítidos e núcleo invisível. Têm baixa resistência, em torno de $330 \Omega/\text{cm}^2$ (GEKLE, 1994).

É possível relacionar estes dois tipos de células MDCK citados a dois tipos de células predominantes no ducto coletor. O ducto coletor possui células chamadas principais e intercalares. As principais, em maior número, são responsáveis pela reabsorção de íons Na^+ e secreção de íons K^+ . Já as células intercalares, as quais têm sua frequência diminuída à proporção que o túbulo desce a parte medular do rim, pode ser ainda de dois tipos, alfa e beta. As intercalares alfa possuem uma H^+ -ATPase na membrana luminal, tornando-as responsáveis pela secreção ativa eletrogênica de H^+ . Além disso, também são responsáveis pela reabsorção de K através de uma H^+K^+ - ATPase. As do tipo beta caracterizam-se por secreção de íons bicarbonato. (MELLO-AIRES, 2008) Deste modo, é possível relacionar o subtipo C7 com as células principais e o subtipo C11 com as células intercalares do ducto coletor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito da gentamicina sobre cultura de células do ducto coletor renal (células MDCK C11), com a finalidade de se estabelecer um modelo viável de nefrotoxicidade em cultura de tecido, para estudos futuros que envolvam a integridade funcional destas células.

2.2 Objetivos Específicos

- avaliar a capacidade de proliferação das culturas celulares incubadas com gentamicina por 24 horas;
- avaliar a viabilidade celular tanto em culturas expostas à gentamicina por 24 horas, como na exposição aguda de células em suspensão.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura do subtipo C11 de células MDCK

O subtipo (clones) C11 das células MDCK foi cultivado em *Minimum Essential Medium* (MEM), que contém: sais de Earle, glutamina e aminoácidos essenciais, com adição de NaHCO_3 , penicilina e estreptomicina (10000 U/ml). O meio foi suplementado com soro bovino fetal a 10%. As células foram cultivadas em garrafas plásticas a uma densidade de $10^4/\text{cm}^2$, acondicionadas em estufa CO_2 (5%), a 37°C . O meio foi trocado com uma frequência de três vezes na semana, em dias alternados. Após observação da confluência, as células foram tratadas com Tripsina, centrifugadas, ressuspensas em meio acrescido de soro bovino fetal e semeadas em placas de 6 wells, onde aguardava-se a semi-confluência para iniciar o protocolo experimental.

3.2. Protocolo Experimental

Depois de obtida a semi-confluência, as garrafas ou placas foram lavadas com meio livre de soro bovino fetal, por três vezes mantidas nestas condições, de acordo com o protocolo a seguir:

- **Grupo Controle (C24):** garrafas ou placas mantida por 24 h em estufa com CO_2 a 5%, em meio (MEM), suplementado com soro bovino fetal 10%.

- **Grupo Gentamicina (G24):** garrafas ou placas mantida por 24 h em estufa com CO_2 a 5%, em meio (MEM), suplementado com soro bovino fetal e acrescido de 3 mM de GARAMICINA[®] (sulfato de gentamicina), fabricada pela Indústria Química e Farmacêutica Schering-Plough S/A.

- **Grupo Gentamicina, células em suspensão (GS):** células mantidas em meio (MEM), suplementado com soro bovino fetal, com aproximadamente 50% de confluência, foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PBS livre de cálcio, acrescidas de gentamicina 1,5 mM.

3.2.1. Viabilidade Celular

Após 24 horas foi avaliada a viabilidade celular nas células dos grupos C24 e G24, com o uso do corante Tripán Blue 0,1%, na diluição de 1:1. As células foram tratadas com tripsina, centrifugadas, lavadas por 3 vezes com meio livre de SBF, para obtermos células em suspensão. Depois de coradas com Tripán Blue 0,1%, foram transferidas para uma câmara de Neubauer, para contagem de células viáveis e inviáveis. As células coradas em azul (pelo Tripán Blue) são inviáveis.

O cálculo do número de células por ml foi obtido a partir da seguinte relação:

$$\text{NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS} \times 10^4/\text{ml} \times \text{DILUIÇÃO}$$

FONTE: Microbiologia Geral (Curso Técnico em Bioprocessos Industriais e BIOTECNOLOGIA).

Na qual $10^4/\text{ml}$ referem-se à diluição na câmara de Neubauer.

Nas células em suspensão (GS), seguiu-se o mesmo protocolo para a realização da contagem nos tempos de 1, 20 e 30 minutos, após administração da gentamicina 1,5mM.

3.2.2. Proliferação

Após as 24 horas, tanto o Grupo C24, quanto o Grupo G24, foram submetidos à avaliação da capacidade de proliferação. A manutenção das células com meio livre de SBF, determina que a cultura não se prolifere. As células nessas condições estão em na fase G0 do ciclo celular, portanto não realizam mitoses. Para verificar a capacidade de proliferação, foi adicionado ao meio de cultura SBF 10%. As culturas foram mantidas nessas condições por 24 horas.

Após este período foram preparadas para contagem em Câmara de Neubauer, conforme descrito no item 3.2.1.

3.2.3. Fotomicroscopia

Células cultivadas em placas, com aproximadamente 40% de confluência, receberam solução de gentamicina 1,5mM ou 3mM e após 30 minutos foram analisadas e fotografadas em microscópio invertido Leica MPS 300, em um aumento de 20 vezes.

3.3. Análise Estatística

Os dados foram reportados como média \pm EPM. O grupo C e o grupo G foram comparados pelo teste "t" de student's, com nível de significância para $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Células MDCK C11 em cultura formam uma monocamada homogênea de células que morfológica e funcionalmente se assemelham às células intercalares do ducto coletor (GEKLE, 1994).

Culturas semi-confluentes incubadas por 24 horas (G24), em solução 3mM de gentamicina, apresentaram capacidade de proliferação reduzida a 60%, conforme mostra o gráfico 1.

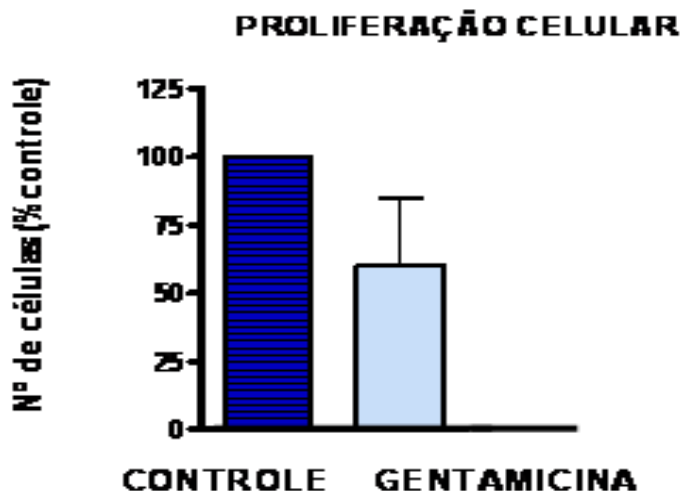


GRÁFICO1- PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS DO CONTROLE E DE CÉLULAS EXPOSTAS À GENTAMICINA 3mM POR 24 HORAS (G24)

Entretanto a viabilidade celular não foi diferente do controle, uma vez que células do grupo G24 apresentaram $91,0 \pm 6,4\%$ de viabilidade, assim como as células controle, as quais apresentarem $92,3 \pm 5,2\%$. (Gráfico 2)

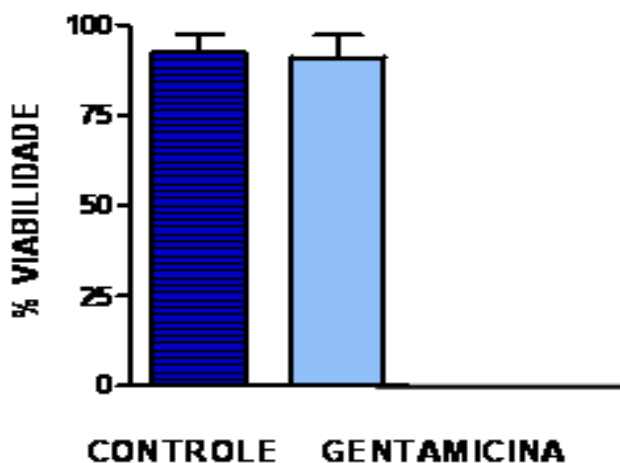


GRÁFICO 2 – PORCENTAGEM DE VIABILIDADE DE CÉLULAS EXPOSTAS À GENTAMICINA 3mM POR 24 HORAS

Foi possível observar durante a manutenção das culturas que as células G24 perderam gradativamente a capacidade de adesão. No processo de tripnização, muitas células acabaram sendo perdidas, já na primeira lavagem. Desta forma, podemos sugerir que as células que se mantêm aderidas são

apenas as viáveis e por isso temos um menor número de células, com alta porcentagem de viabilidade.

Pelo o que foi observado durante a montagem e manutenção de protocolos, células em suspensão são mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da gentamicina. Quando 3mM de gentamicina foram adicionados a um tubo contendo células em suspensão, após uma hora de exposição, nenhuma célula foi encontrada na amostra.

Dados da literatura mostram que a toxicidade da gentamicina sobre as células renais depende da dose e do tempo de exposição. Análises de culturas de células do túbulo proximal expostas por poucos minutos, por horas ou por 24 horas a doses entre 1 a 3 mM, mostram que os graus de apoptose e necrose vão aumentando gradativamente (SERVAIS,2005).

No Gráfico 3 pode-se observar a variação da viabilidade celular de células MDCK em suspensão, incubadas com solução de gentamicina 1,5mM. É possível notar que, da mesma forma que em células do túbulo proximal, as células MDCK também apresentam uma sensibilidade à gentamicina dose e tempo dependente.

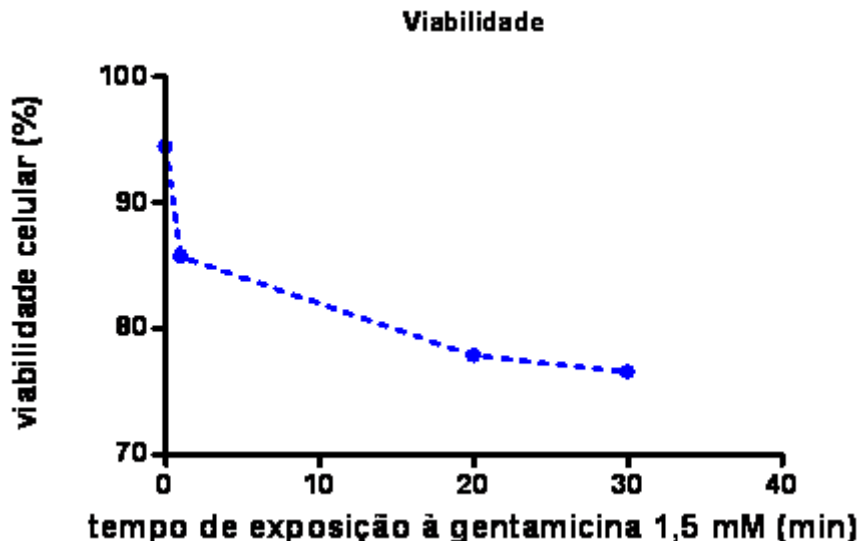
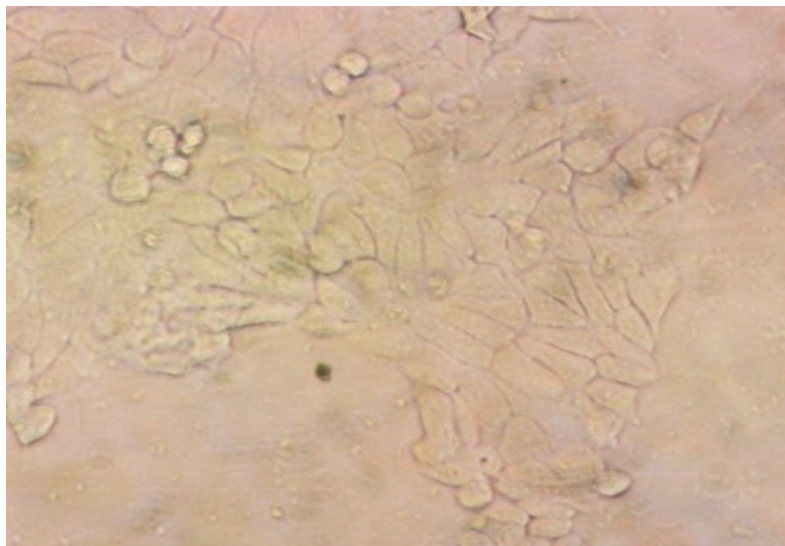


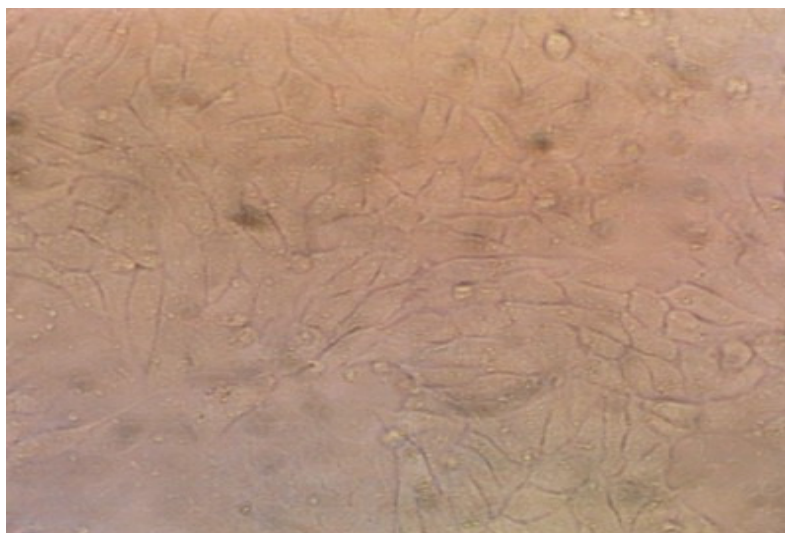
GRÁFICO 3- VARIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS EXPOSTAS À GENTAMICINA 1,5mM, EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO

Observamos ao microscópio óptico culturas celulares semi-confluentes expostas às doses 1,5mM e 3mM, por 30 minutos. É possível notar que quando administrada uma dose de 3mM de gentamicina, as células apresentam menor

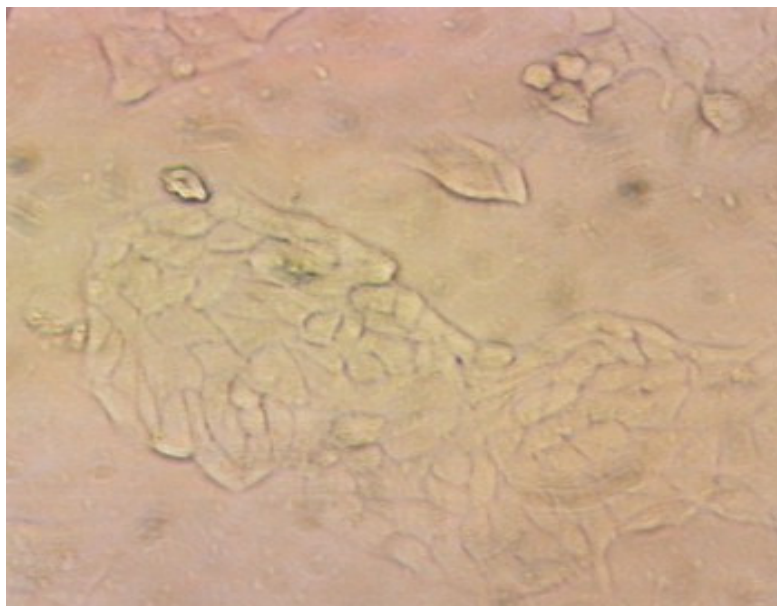
tamanho (Fotografia 3), se comparadas às células controle (Fotografia 1) e às células que receberam gentamicina a 1,5mM (Fotografia 2).



FOTOGRAFIA 1 – CÉLULAS MDCK CONTROLE.
NOTA: 20X



FOTOFRAFIA 2 – CÉLULAS MDCK COM GENTAMICINA
NOTA: 1,5Mm. 20X



FOTOGRAFIA 3 – CÉLULAS MDCK COM GENTAMICINA
NOTA: 3,0 mM. 20X

O aspecto da cultura apresentado na Fotografia 3, leva à interpretação de que essas células estão perdendo a capacidade de adesão, ou seja, estão se soltando da parede da placa (situação bastante observada durante a manipulação das culturas).

A partir dos dados da literatura, é possível atribuir os efeitos tóxicos da gentamicina sobre as células renais a duas principais formas de ação.

A primeira estaria relacionada à estimulação de receptores endocíticos, como a glicoproteína 330 (gp330) e megalina. Ligação de aminoglicosídeos com receptores que medeiam a endocitose, como a megalina, tem sido descrita como a principal via para captação da gentamicina em células proximais renais. Megalina é um dos receptores responsáveis pela endocitose de moléculas de baixo peso molecular, sendo altamente expresso no córtex renal (MOESTRUP, 1995; NAGAI et al 2001).

A segunda forma de ação da gentamicina seria por via não endocítica, envolvendo a estimulação de receptores sensíveis a cálcio (CaR). O aumento da concentração intracelular de cálcio promove proliferação e contração de células do mesângio. A gentamicina é capaz de super-estimular esses efeitos nas células mesangiais, as quais são responsáveis por alterar o coeficiente de filtração (kF),

determinante na taxa de filtração glomerular (WARD, 2002; MARTINEZ-SALGADO, 2007). Outra via não endocítica foi demonstrada por MYRDAL (2005), estudando a ação de aminoglicosídicos em células MDCK. Esses autores descreveram a ação desses antibióticos sob receptores de membrana, sensíveis ao cálcio, mas com baixa especificidade, que estariam envolvidos com transdução de sinais (*TRP family*)

No caso das células MDCK C11, utilizadas em nossos experimentos, a gentamicina parece estar prejudicando a capacidade de proliferação e a viabilidade celular, indicando que qualquer uma dessas vias pode estar envolvida. Como a capacidade de endocitose não é característica funcional destas células, como é para as células do túbulo proximal, é possível supor que vias não endocíticas estejam envolvidas nesta ação tóxica. Assim sendo, o modelo experimental de nefrotoxicidade induzida por gentamicina, em células MDCK é viável, podendo ser utilizado para futuros estudos envolvendo a capacidade de transporte de íons, manutenção de potenciais elétricos e de capacidade regulação do pH intracelular. Qualquer modificação na dinâmica destes mecanismos pode levar a injúrias no tecido renal, responsáveis pela evolução da insuficiência renal e de suas possíveis comorbidades.

5. CONCLUSÃO

Com os experimentos propostos, foi constatado que as células MDCK apresentaram redução na taxa de proliferação celular, diminuição da capacidade de adesão e diminuição da viabilidade celular, quando expostas a diferentes concentrações de gentamicina.

Este estudo mostrou que o modelo de cultura de células MDCK, subtipo C11, pode vir a ser utilizado em estudos futuros de nefrotoxicidade, induzida pelo uso de aminoglicosídeos como a gentamicina, em células tubulares distais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAUDRILLIER, A. *et al.* 2010. Calcium-sensing receptor as a potential modulator of vascular calcification in chronic kidney disease. **JNephrol.** v. 23, p. 17-22

COIMBRA, T. M.; LACHAT. J.J. 1988. Analysis of urinary albumin excretion in gentamicin-treated rats. **Nephron** v.49, p.154-159.

FALCO, F.G.; SMITH, H.M.; ARCIERI, G.M. 1969. Nephrotoxicity of aminoglycosides and gentamicin. **J. Infectious Diseases.** v. 119(4), p. 406-409.

GEKLE, M. *et al.*1994. Characterization of two MDCK cells subtypes as model system to study principal cell and intercalated cell properties. **Pflügers Arch.** v. 428, p. 157-162, 1994.

GUYTON & HALL – **Fisiologia Médica**, 11^a .Ed., Editora Elsevier, 2006.

HUNG, C.C. *et al.* 2006. Gentamicin-induced diffuse renal tubular dysfunction. **Nephrol Dial Transplant** v. 21, p. 547-548.

JUAN, S.H. *et al.* 2007. Tetramethylpyrazine protects rat renal tubular cell apoptosis induced by gentamicin. **Nephrol. Dial Transplant.** v. 22, p. 732–739.

LANG, F. ;PAULMICH, M. 1995. Properties and regulation of ions channels in MDCK cells. **Kidney Int.** v. 48, p. 1200-1205.

LI, J. *et al.* 2009. Differential roles of dihydropyridine calcium antagonist nifedipine, nitrendipine and amlodipine on gentamicin-induced renal tubular toxicity in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 620, p. 97-104.

MARTÍNEZ-SALGADO, C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, J. F.; LÓPEZ-NOVOA, M. J. 2007. Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, V. 223, p. 86–98.

MELLO-AIRES, M. - **Fisiologia**, 2^a. Ed., Editora Guanabara - Koogan, 1999.

MELLO-AIRES, M. - **Fisiologia**, 3^a Ed., Editora Guanabara - Koogan, 2008.

MOESTRUP, S. K. *et al.* 1995. Evidence that Glycoprotein 330/Megalin Uptake of Polybasic Drugs. **The American Society for Clinical Investigation, Inc.** v. 96, p. 1404-1413.

MENÉ, P.; SIMONSON, M.J., DUNN, M.S. 1989. Physiology of the mesangial cell. **Physiol. Rev.** 64, p. 1347-1424.

MURRAY, B.N.; PALLER, M.S.; FERRIS, T.F. 1985. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamic in conscious rats. **Kidney Int.** 28 – 767-774.

MYRDAL, S.E.; STEYGER, P.S. 2005. TRPV1 regulators mediate gentamicin penetration of cultured kidney cells. **Hear Res.** v. 204, p. 170-182.

NAGAI J. *et al.* 2001. Role of megalin in renal handling of aminoglycosides. **Am J Physiol Renal Physiol**; 281, F:337-44.

NORONHA, I.L.; FUJIHARA, C.K.; ZATZ, R. 2002. The inflammatory component in progressive renal disease-are interventions possible? **Nephrol Dial Transplant** v.1, p. 363–368.

PESSOA, E.A. *et al.* 2009. Gentamicin-induced preconditioning of proximal tubular LLC-PK1 cells stimulates nitric oxide production but not synthesis of heat shock protein. **Braz. J. of Med. And Biol. Res.** v.42, p.614-620.

RODRIGUEZ-BARBERO, A. *et al.* 1995. Gentamicin activates rat mesangial cells. A role for platelet activating factor. **Kidney Int.** 47; 1346-1353.

RODRIGUEZ-BARBERO, A. *et al.* 2000. Potential use of isolated glomeruli and cultured mesangial cells as in vitro models to assess nephrotoxicity. **Cell Biol. Toxicol**; 16, 145-153.

SCHOR, N.; BOIM, M.A.; SANTOS, O.F.P. 1997. Insuficiência Renal Aguda, Fisiopatologia Clínica e Tratamento. Cap.1. Editora Sanviers.

SERVAIS, H. *et al.* 2005. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: Involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicol. and Applied Pharmacol.** v. 206, p. 321– 333.

WARD, D. T.; MCLARNON, S.J.; RICCARDI D. 2002. Aminoglycosides increase intracellular calcium levels and ERK activity in proximal tubular OK

cells expressing the extracellular calcium-sensing receptor. **J. Am. Soc. Nephrol**; 13, 1481-1489.

WARD, D. T. *et al.* 2005. Aminoglycosides Induce Acute Cell Signaling and Chronic Cell Death in Renal Cells that Express the Calcium-Sensing Receptor. **J. Am. Soc. Nephrol** v. 16, p.1236-1244.