

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETICIA HELENA ALBINO GARCIA

EFEITO DA GENTAMICINA NA CAPACIDADE DE REGULAÇÃO DO pH
INTRACELULAR DE CÉLULAS INTERCALARES DO DUCTO COLETOR (MDCK
wild type).

CURITIBA

2015

LETÍCIA HELENA ALBINO GARCIA

EFEITO DA GENTAMICINA NA CAPACIDADE DE REGULAÇÃO DO PH
INTRACELULAR (PHI) DE CÉLULAS INTERCALARES DO DUCTO COLETOR
(MDCK wild type).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia, Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná para a obtenção do título de Mestre.

Orientador (a): Prof. Dr^a. Ana Lucia Tararhuch

CURITIBA
2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Garcia, Leticia Helena Albino

Efeito da gentamicina na capacidade de regulação do pH intracelular (PHI) de células intercalares do ducto coletor (MDCK wild type). / Leticia Helena Albino Garcia. – Curitiba, 2015.

47f. : il. ; 30cm.

Orientador: Ana Lucia Tararhuch

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Gentamicina. 2. Toxicidade. I. Título. II. Tararhuch, Ana Lucia. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 612



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



PARECER

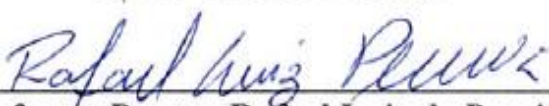
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **LETÍCIA HELENA ALBINO GARCIA** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

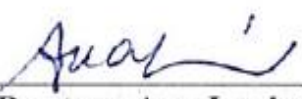
Curitiba, 10 de dezembro de 2015.



Professora Doutora Célia Regina Cavichiolo Franco
UFPR - Membro Titular



Professor Doutor Rafael Luiz de Pereira
UFPR - Membro Titular



Professora Doutora Ana Lucia Tararthuch
UFPR - Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Dedico este trabalho aos meus pais e meus irmãos por sempre apoiarem a minha curiosidade, o que levou a curiosidade científica, ao meu marido, por sempre estar ao meu lado em todas as dificuldades e a todos que de certa forma contribuíram para o desenvolvimento.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos por todo amor, carinho e dedicação.

Ao meu marido por todo amor, apoio, paciência, cumplicidade e por sempre acreditar em mim.

À minha avó Marina e minha tia Mirian porque mesmo longe sempre se fizeram presentes em todos os momentos da minha vida

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Tararhuch a orientação e exemplo de dedicação, humanidade e ética dentro da prática científica.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fernández Perez a colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Milena Pessoa, Keity Franciele, Alexandre Meirelles, Mirelli Garrido, André Kikute, Raquel colaço, Andrielle Capote, Sthefanie Dassi, Dagliane Pagliosa por toda a atenção e compreensão durante estes dois anos.

À amiga Ana Gabrielle Coutinho por toda ajuda e ensinamentos durante a realização deste projeto.

À Prof. Marcia Helena Appel por todo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho

À CAPES pelo auxílio financeiro prestado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

À Deus, por me oferecer mais uma oportunidade de aprendizado e para crescer profissionalmente.

RESUMO

Antibióticos aminoglicosídicos, como a gentamicina, são utilizados por possuir baixo custo e serem altamente eficazes. Entretanto, causam nefrotoxicidade e ototoxicidade. A nefrotoxicidade envolve danos glomerulares ou tubulares. Em células tubulares proximais, receptores de membrana promovem a endocitose da gentamicina, a qual desestabiliza a membrana dos lisossomos. Esta desestabilização está ligada com o fenômeno de apoptose. A gentamicina é também considerada agonista do receptor sensível a cálcio. Existem poucos estudos acerca da nefrotoxicidade em células distais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de regulação e manutenção do pH intracelular de células MDCK *wild type* expostas a solução 0,1 mM de sulfato de gentamicina, por 10, 20 e 30 minutos. Foi observado que a velocidade de acidificação foi maior após 30 minutos de exposição à genta, se comparada a acidificação obtida na ausência de sódio (0Na^+) ($\text{genta}=0,0099\pm 0,0001$ unidades de $\text{pH}/10\text{s}$ e $0\text{Na}^+=0,058\pm 0,002$ unidades de $\text{pH}/10\text{s}$). Do mesmo modo, foi observada diminuição de cerca de 87% da atividade da H^+ -ATPase em homogenado de membranas destas células, em preparações onde se avalia a concentração de fosfato inorgânico oriundo do consumo de ATP, com e sem a presença de 10^{-7} de bafilomicina (inibidor da H^+ -ATPase). Com o uso do marcador fluorescente Lyso Tracker observou-se um aumento na atividade lisossomal após 30 minutos de incubação com genta. Com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que células MDCK *wilde type*, expostas à gentamicina apresentam perda da capacidade de manutenção do pH_i basal, possivelmente por diminuição da atividade da H^+ -ATPase e aumento da atividade lisossomal, que pode estar relacionada ao acúmulo de gentamicina na célula, oriundo de endocitose ou deflagração de processo de apoptose.

ABSTRACT

Aminoglycoside antibiotics such as gentamicin are used because it has low cost and are highly effective. However, they cause nephrotoxicity and ototoxicity. Nephrotoxicity involves glomerular or tubular damage. In proximal tubular cells, membrane receptors promote endocytosis of gentamicin, which destabilizes the membrane of lysosomes. Gentamicin is able to activate a calcium sensing receptor (CaSR) which has been associated with tubular cell death. There are few studies of nephrotoxicity in distal kidney cells. The aim of this study was to evaluate the ability of regulation and maintenance of intracellular pH (pHi) of MDCK wild type cells exposed to 0.1 mM solution of gentamicin sulfate (genta), for 10, 20 and 30 minutes. It was observed that the acidification rate was greater after 30 minutes of exposure to genta, compared acidification obtained in the absence of sodium (0Na^+) (genta = 0.0099 ± 0.0001 pH units / 10s and $0\text{Na}^+ = 0.058 \pm 0.002$ pH units / 10s). Similarly, we observed a decrease of about 80% in H^+ -ATPase activity in cells membrane homogenate, where it evaluates the concentration of inorganic phosphate from ATP derived consumption with and without the presence of 10^{-7}M of bafilomycin (H^+ -ATPase inhibitor). Using the fluorescent label *Lyso Tracker* observed an increase in lysosomal activity after 30 minutes incubation with genta. With the results of this study we conclude that MDCK cells wild type, exposed to gentamicin have lost the ability to maintain the basal pHi, possibly by decreasing the activity of H^+ -ATPase and increased lysosomal activity, which may be related to the accumulation of gentamicin into the cell, come from endocytosis or apoptosis of outbreak.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - esquema progressão do processo inflamatório em células renais levando à falência renal.....	15
Figura 2 - estruturas químicas de antibióticos aminoglicosídico	18
Figura 3 - endocitose de um aminoglicosídeo através de um complexo endocítico de membrana.	21
Figura 4 - curva padrão de nigericina.	28
Figura 5A - gráfico representando velocidade de acidificação por células após 30 minutos de exposição à solução de gentamicina	33
Figura 5B - gráfico representando velocidade de acidificação por tempo após a exposição às soluções (0Na^+), gentamicina), solução livre de sódio com gentamicina (0Na^+ + genta)	34
Figura 6A - representação da atividade atpásica	35
Figura 6B - diferença entre a atividade basal e a atividade sensível a bafilomicina	36
Figura 7 - registros de vesículas ácidas por marcador fluorescente lyso tracker e registros à exposição de solução controle e gentamicina antes do fluoróforo	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - protocolo para atividade ATPasica	30
--	----

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1.EFEITOS DA GENTAMICINA NO NEFRON	16
1.2. EFEITOS DA GENTAMICINA NO GLOMÉRULO E EM CÉLULAS MESANGIAIS.....	18
1.3 EFEITOS TUBULARES DA GENTAMICINA.....	20
1.3.1. Células tubulares proximais	20
1.3.2. Células do néfron distal.....	21
1.4. CÉLULAS MDCK	23
2. OBJETIVO	25
2.1 OBJETIVO GERAL	25
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	25
3. METODOLOGIA	26
3.1 CULTIVO DE CELULAS MDCK.....	26
3.2. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	26
3.2.1 Avaliação do pHi por fluorescência	26
3.2.2. Registro do pH intracelular	27
3.2.3 Curva padrão com nigericina.....	Erro! Indicador não definido. 8
3.3. MEDIDA DA ATIVIDADE ATPÁSICA EM MEMBRANAS TOTAIS DE CÉLULAS MDCK	29
3.3.1. Preparo das células.....	29
3.3.2. Consumo de ATP – Determinação bioquímica da atividade da H ⁺ -ATPases no homogenato de membrana parcialmente purificada).....	30
3.3.3. Quantificação de proteínas nas preparações	31
3.4. ANÁLISE QUALITATIVA DO CONTEÚDO DE VESÍCULAS ÁCIDAS	32
3.5. ANALISE ESTATÍSTICA	32
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	39
6. CONCLUSÃO	43
REFERENCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A regulação tanto do pH dos líquidos corporais, quanto do pH intracelular (pHi) é essencial para a homeostase do meio interno, pois pequenas variações podem afetar, sobremaneira, muitas funções metabólicas. Além do fato de que a acidificação das células neutraliza as cargas negativas das proteínas, Ross *et al.* (1981), descrevem efeitos sobre a permeabilidade e a condutância da membrana, sobre o acoplamento celular, sobre as propriedades mecânicas dos músculos e sobre a fertilização, que podem ter como causa essa neutralização de cargas, que por sua vez afeta as funções metabólicas de um modo mais específico. A atividade das enzimas intracelulares depende de um pH “ótimo”, ao qual elas estão adaptadas. Dentre os mecanismos de regulação do pH estão incluídos os tampões químicos, a atividade pulmonar e o manuseio de ácidos e bases pelo rim, chamados de mecanismos de acidificação urinária.

Os mecanismos de acidificação urinária envolvem basicamente dois processos: a reabsorção de base (HCO_3^-) e a secreção de prótons (H^+). Ao longo do néfron, mecanismos de transporte de íons estão envolvidos nestes processos. Transporte de H^+ ocorre em um grande número de estruturas, como os lisossomos e outras organelas vesiculares, assim como em tecidos, particularmente epitélios, como a mucosa gástrica e os túbulos renais. A consequência deste mecanismo é a acidificação do interior da organela, a acidificação do estômago e a eliminação do excesso de ácidos do organismo (MALNIC, 2000; KURTZ, 2014). Em tecidos que secretam H^+ , HCO_3^- se acumula na célula e pode ser transferido para o interstício. Isto ocorre pela ativação do permutador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ ou pelo co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, presentes na membrana basolateral das células tubulares, por exemplo. Já, os mecanismos de transporte de H^+ descritos em epitélios são o Na^+/H^+ , a H^+/ATPase e a $\text{H}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$.

A distribuição das $\text{H}^+/\text{ATPases}$ ao longo do nefron é considerada de extrema importância para o transporte de prótons, particularmente no túbulo proximal e células intercalares do ducto coletor, e tem sido determinado por métodos imunohistoquímicos e fisiológicos.

Segundo descreve Harvey (1992) as ATPases responsáveis pelo transporte de íons e de H^+ estão divididas em 3 classes: as P-ATPases, que têm formas fosfoaspartil intermediárias, e dentre elas estão a H^+/K^+ -ATPase, a Na^+/K^+ -ATPase e a Ca^{++} -ATPase do retículo sarcoplasmático.; as F-ATPases, que são ATP-sintases translocadoras de prótons das mitocôndrias, cloroplastos e bactérias e as V-ATPases, ou do tipo vacuolar, que são H^+ -ATPases responsáveis por um fluxo de H^+ para dentro de vacúolos subcelulares, da luz tubular renal ou do compartimento mucoso da bexiga de tartaruga (STEINMETZ, 1986; FERNANDEZ *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 2009).

Tendo em vista o mecanismo de acidificação urinária, danos aos segmentos do néfron podem provocar alterações na função renal, caracterizando insuficiência renal, por se tornarem incapazes de eliminar as substâncias tóxicas do sangue de forma adequada. Alterações na expressão ou na capacidade funcional da H^+ -ATPases estão envolvidas nos processos de acidose tubular desencadeados por doenças como a Síndrome de Fanconi (HALL *et al.*, 2013).

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 normalmente utilizado para danos renais ocasionados por isquemia e por agentes nefrotóxicos (drogas como a gentamicina e venenos). A IRA abrange uma série de condições clínicas caracterizadas por retenção de compostos nitrogenados, associados com redução de volume urinário (SCHOR, BOIM e SANTOS, 1997).

Estudo recentes corroboram com a presença de processos inflamatórios em diversos tipos de lesão renal progressiva (NOLASCO *et al.*, 1987). Entretanto, os eventos em que ocorrem ainda não estão esclarecidos, mas observam-se características que são bem reconhecidas na progressão da doença renal como glomeruloescleroses, injúrias tubulointersticiais e acúmulo de matriz extracelular.

Apesar de fatores mecânicos como hipertrofia e hipertensão glomerular contribuírem na progressão da doença renal, lesões tubulares não podem ser simplesmente interpretadas como sequelas isquêmicas da esclerose glomerular. Há evidências crescentes de que células inflamatórias têm papel crítico na progressão da doença renal. A inflamação tubulointersticial promove um influxo e proliferação de células inflamatórias, as quais migram impulsionadas pela expressão quimiocinas e

moléculas de adesão, produzidas por células tubulares que sofreram injúrio (Noronha et al, 2002). Estas células inflamatórias, uma vez ativadas, são capazes de produzir citocinas e uma série de mediadores locais inflamatórios e ativar células tubulares e outras células intrínsecas renais. Mediadores derivados de linfócitos, como o interferon gama, aumentam a expressão de proteína MHC, o que permite às células tubulares atuarem como apresentadoras de antígenos. 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. A fibrogênese, mediada por fibroblastos, é uma resposta ao dano no 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, cicatrização tecidual e destruição da arquitetura original do rim. Os fibroblastos sintetizam uma variedade de componentes de matriz extracelular (RUIZ-ORTEGA e EGIDO, 1997). A superprodução de proteínas leva ao excessivo acúmulo de colágeno e à fibrose.

Noronha *et al.*(2002) demonstra ainda que um mediador local, a Angiotensina II, possui participação na doença renal progressiva. Além de seus efeitos hemodinâmicos, a Angiotensina II exerce sua ação em células que participam do processo inflamatório e da 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. Logo, A Angiotensina II é capaz ainda de estimular a proliferação de células T.

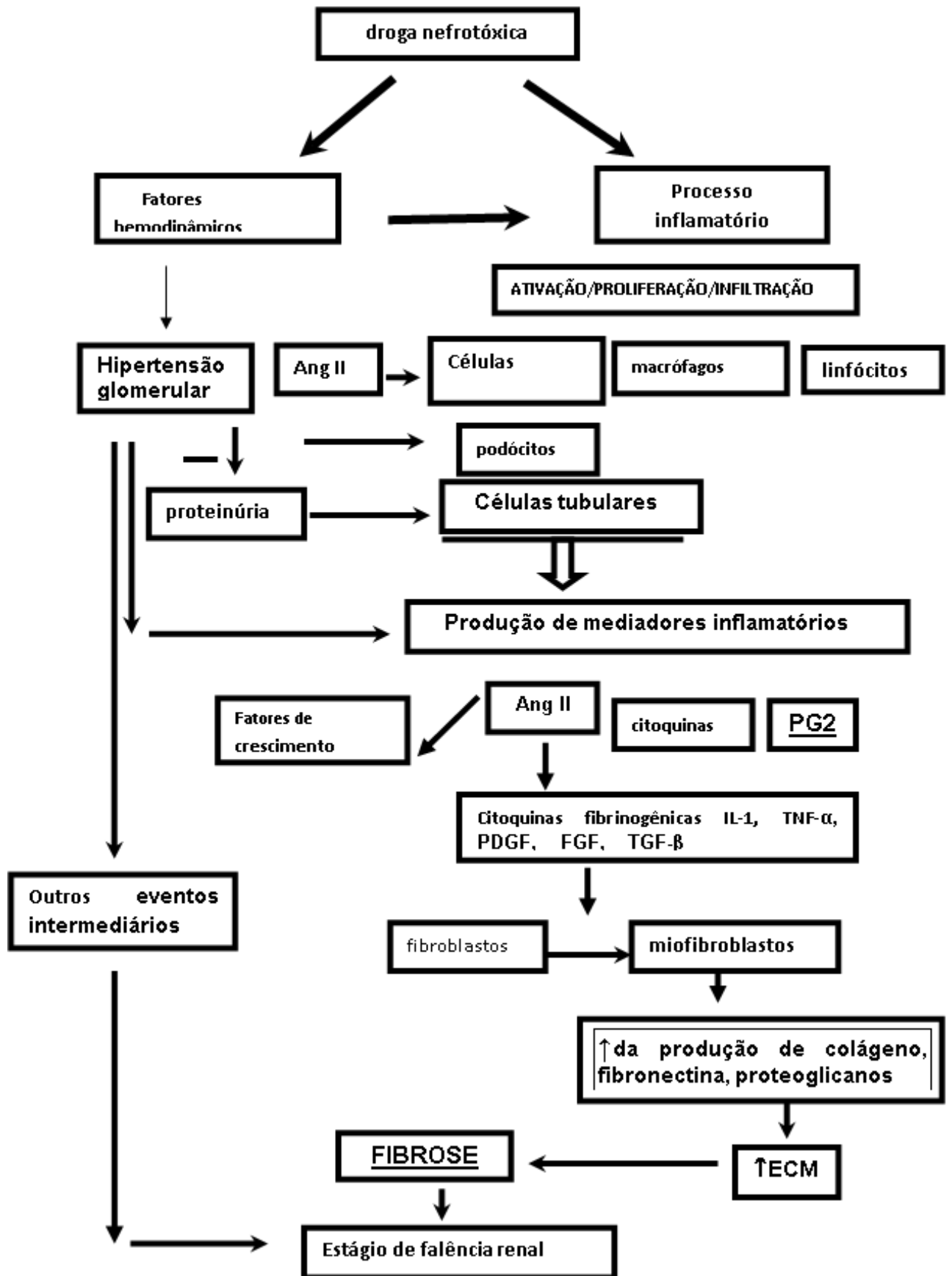


Figura 1. Esquema Progressão do processo inflamatório em células renais levando à falência renal. A partir de um insulto inicial, como o uso do antibiótico gentamicina, as células que sofreram o injúrio,

principalmente tubulares, produzem quimiocinas e moléculas de adesão capazes de atrair células da resposta imune. Estas células (macrófagos e linfócitos), juntamente com as próprias células tubulares afetadas, produzem mediadores inflamatórios locais que acabam levando o tecido renal à fibrose e, conseqüentemente, à falência renal. Modificada a partir de Noronha, 2002. ECM= matriz extracelular.

1.1. Efeitos da Gentamicina no nefron

Apesar das diversas classes novas de antibióticos, desde o desenvolvimento dos aminoglicosídeos, por volta de 1940, estes são preferencialmente utilizados na terapia antimicrobiana. A gentamicina foi descoberta em 1963 e continua sendo bastante utilizada, apesar da disponibilidade de outros aminoglicosídeos como a amicacina, netilmicina, canamicina, tobramicina e outros.

A gentamicina possui um largo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*), sendo sua utilização recomendada em casos mais graves. (BALAKUMAR, ROHILLA e THANGATHIRUPATHI, 2010). Além disso, possui baixo custo para produção e é eficaz, por demonstrar uma baixa resistência antimicrobiana (SANTUCCI e KRIEGER, 2000). Seu mecanismo de ação ocorre pelo aminoglicosídeo se ligar ao RNA ribossomal e induzir erro no processo de tradução e a inibição da síntese de proteínas, resultando na morte das bactérias (DAVIES e DAVIS, 1968; NOLLER, 1991).

Entretanto, existem restrições para sua utilização, uma vez que, apresenta efeitos colaterais como a ototoxicidade e nefrotoxicidade. Assim, sua utilização deve ser feita com controle de dosagem.

A nefrotoxicidade inicia-se após uma semana de tratamento, caracterizada por sinais e sintomas como, oligúria, aumento lento da creatinina sérica e urina hipoosmolar. Diversos estudos corroboram e relacionam que a nefrotoxicidade ocorre com o acúmulo da droga em células do túbulo proximal, após a filtração glomerular. Portanto, os mecanismos subjacentes, não apenas de transporte renal, mas também dos efeitos da toxicidade tubular, tem sido investigada de diversas formas.

Historicamente, ao final da década de 60, começaram a aparecer relatos baseados em estudos experimentais sobre os efeitos nefrotóxicos dos aminoglicosídeos (FALCO, SMITH e ARCIERI, 1969).

Na década de 80 já se procurava saber a localização da gentamicina dentro das células afetadas e, também, as alterações enzimáticas causadas durante o tratamento. Morin *et al.* (1980) demonstraram que a gentamicina, comparativamente aos demais segmentos do néfron, se acumula de forma mais intensa no túbulo proximal de coelhos. Nestas células, promove diminuição da atividade de enzimas da borda em escova e dos lisossomos.

Coimbra e Lachat (1988) também demonstraram a ação do aminoglicosídeo no túbulo proximal, evidenciando que a albuminúria presente em ratos tratados com gentamicina estaria relacionado a uma mudança na carga das proteínas, de modo a interferir no processo de reabsorção tubular.

Servais *et al.* (2005) menciona em seus estudos que nefrotoxicidade da gentamicina pode ser associada tanto a danos glomerulares quanto tubulares, sendo mais frequente o aparecimento de danos tubulares proximais.

Francescato *et al.* (2012) trataram ratos com gentamicina e notaram um grande aumento na excreção de sódio e potássio, um aumento na creatinina plasmática e na concentração de uréia, um grande número de macrófagos e monócitos e também muitas lesões presentes no córtex renal. Todos são indícios de que a função renal fica prejudicada com o uso do aminoglicosídeo.

Nagai e Takamo (2014) afirmam que aminoglicosídeos são excretados pela urina, sem serem metabolizados, entretanto, são acumulados em células dos túbulos proximais, onde produzem danos estruturais e do comprometimento funcional da membrana plasmática, mitocôndria e lisossomos.

Deste modo, observa-se em diversos estudos o grande interesse em estudar tanto conformação molecular dos aminoglicosídeos (figura 2) quanto seus mecanismos de transporte, mesmo porque ambos estão interligados, já que a conformação pode influenciar os mecanismos de transporte. Atualmente, a conformação molecular está bem definida onde sabe-se que são compostos hidrofílicos policatiônicos contendo de 3 à cinco grupos amino. Quanto aos mecanismos de transporte ao longo do nefron, diversos estudos corroboram para entender os efeitos que estas drogas provocam, entretanto como neste trabalho foi utilizado a gentamicina cabe ressaltar sua ação ao longo do néfron.

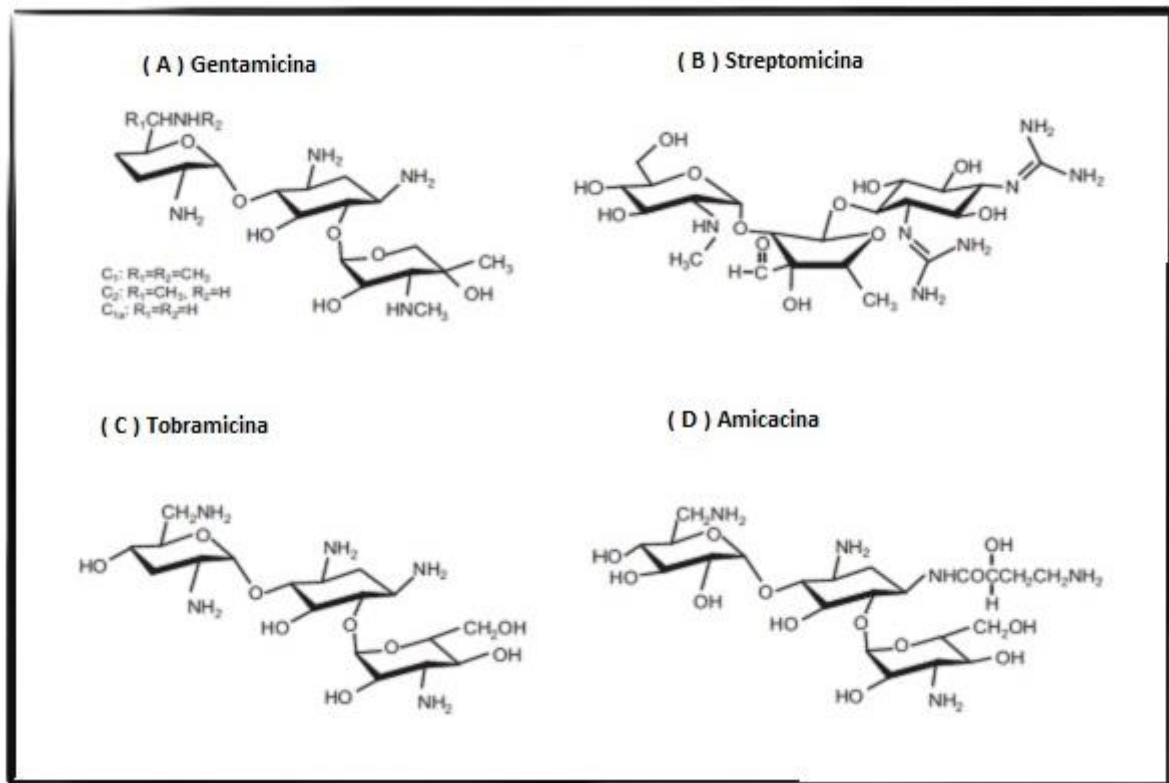


Figura 2: Estruturas químicas de antibióticos aminoglicosídicos. sendo (A) Gentamicina, (B) Streptomicina, (C) Tobramicina, (D) Amicacina. Modificada a partir de Nagai J; Takano, M. ; 2014).

1.2. Efeitos da gentamicina nos glomérulos e em células mesangiais

Substâncias nefrotóxicas causam diversos danos a vários tipos celulares. O rim possui a capacidade de extrair e concentrar substâncias e por receber 20% do débito cardíaco, deste modo, é um alvo comum para tóxicos xenobioticos. Quando drogas como a gentamicina, que não metabolizadas e são filtradas pelo glomérulo, são administradas em animais experimentais, ocorre queda na taxa de filtração glomerular aumento da resistência vascular renal e uma diminuição do coeficiente de ultrafiltração (Kf). Segundo GUYTON e HALL (2006) e MELLO-AIRES (1999) 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.

A regulação do Kf é um fenômeno dinâmico que depende principalmente do grau de contração das células mesangiais intraglomerulares, localizadas na parede vascular do centro do tufo glomerular, cercado as alças capilares. Possuem muitas das propriedades das células musculares lisas. Servem como suporte estrutural aos capilares glomerulares, secretam a matriz extracelular, apresentam atividade fagocítica (removendo macromoléculas do mesângio) e secretam prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias. E ainda, por estarem adjacentes aos capilares glomerulares e terem a capacidade de se contrair, as células mesangiais influenciam a TFG, regulando o fluxo sanguíneo que passa pelos capilares, ou alterando a área de superfície capilar (ou seja, alteram o Kf) (BERNE e LEVY, 2009). Portanto, tanto substâncias endógenas como exógenas podem alterar a contração e o relaxamento das células mesangiais.

Observa-se que, substâncias nefrotóxicas como a gentamicina, são capazes de alterar o Kf induzindo contração, proliferação e aumento da concentração de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ nas células mesangiais, onde, pode-se interpretar que a proliferação é uma resposta de reparo ao dano causado pela gentamicina aos compartimentos mesangiais ou adjacentes a estes. Simultaneamente ao seu efeito proliferativo, a gentamicina também é capaz de causar a apoptose de células mesangiais, sem ocasionar, portanto, grandes mudanças do número de células glomerulares. Portanto, a redução da superfície de ultrafiltração glomerular, induzida por contração glomerular, explicaria o decréscimo da TFG após tratamento com antibióticos aminoglicosídeos.

De acordo com este argumento, diversos estudos corroboram para explicar as vias de sinalização celular e mediadores envolvidos na contração e proliferação celular induzidas por estes nefrotóxicos, por exemplo, as células mesangiais são capazes de expressar receptores sensíveis a cálcio, (CaSR). A gentamicina é capaz de estimular contração e proliferação em culturas primárias de células mesangiais a partir do aumento da $[Ca^{2+}]_i$. A capacidade de bloqueadores de canais de cálcio de inibir a contração e proliferação das células mesangiais, induzidas por aminoglicosídeos como a gentamicina, demonstra que este aumento do cálcio livre no citosol é necessário para ambos os processos ocorrerem nestas células. Agindo nos CaSR, os aminoglicosídeos induzem o mediador inositol 3-fosfato (*inositol*

triphosphate - IP3) a liberar cálcio do retículo endoplasmático, e conseqüentemente há um acréscimo na $[Ca^{2+}]_i$. Além de aumentar a concentração de Ca^{2+} livre no citosol, a gentamicina induz nas células mesangiais um aumento na ativação, síntese e liberação de PAF (*Platelet-activating Factor*) e de tromboxano A2, na produção de ROS (*Reactive Oxygen Species*), na síntese de óxido nítrico (ON), dentre outros mediadores intracelulares. (MARTÍNEZ-SALGADO, LÓPEZ-HERNÁNDEZ e LÓPEZ-NOVOA, 2007).

1.3. EFEITOS TUBULARES DA GENTAMICINA

1.3 .1. Células Tubulares Proximais

Tem sido demonstrado em modelos animais e de cultura de células que o maior acúmulo da gentamicina ocorre no túbulo proximal. Deste modo, é o primeiro a sofrer alterações histológicas e estruturais, como a perda da integridade da borda em escova e evidente apoptose e necrose das células tubulares proximais (XU, BAILLY-MAITRE e REED, 2005; MOESTRUP *et al.*, 1995). O acúmulo da droga ocorre por um mecanismo que forma um complexo endocítico de membrana envolvendo as proteínas megalina e cubilina. Este complexo endocítico transporta moléculas de natureza catiônica presentes no ultrafiltrado tubular para dentro das células tubulares (Figura, modificada a partir de MOESTRUP, 1995). Uma vez dentro das células, os aminoglicosídeos alteram a função de várias organelas e também processos que são cruciais para a viabilidade celular, como por exemplo, o lisossomo, onde a gentamicina mais se acumula. Entretanto, possui acesso a outros compartimentos celulares como o Complexo de Golgi, Retículo Endoplasmático (RE) e Citosol. (SERVAIS *et al.*, 2005).

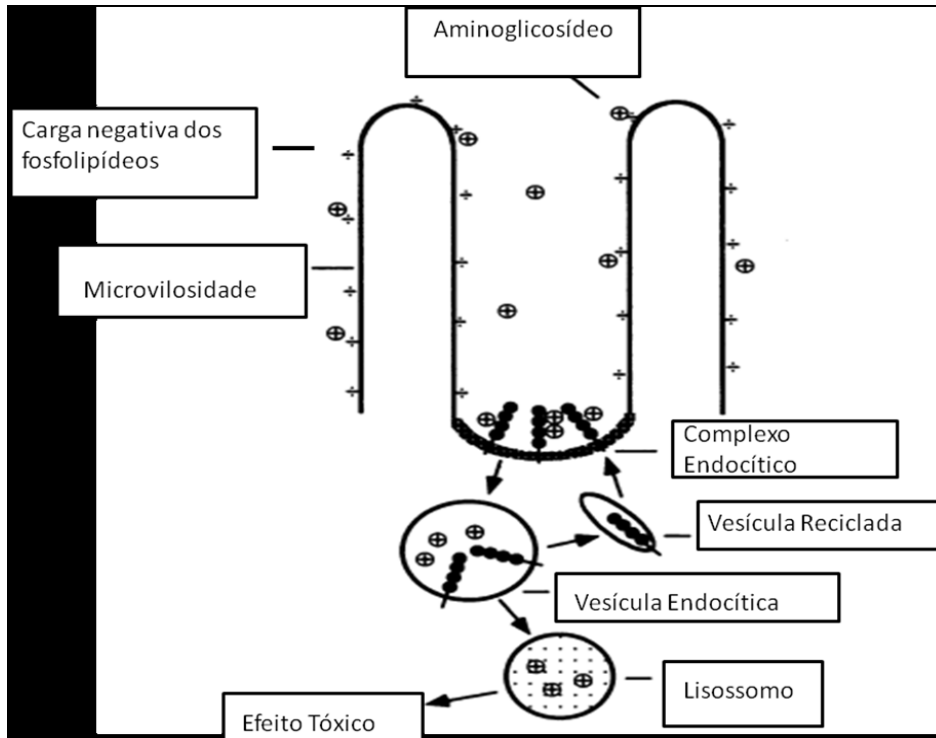


Figura 3: Endocitose de um aminoglicosídeo através de um Complexo Endocítico de Membrana, formado pelas proteínas megalina e cubilina. Modificada a partir de Moestrup, 1995.

Além disso, Atualmente já está bem estabelecido a existência de um receptor sensível a cálcio nos rins e que drogas como a gentamicina, tobramicina, neomicina são capazes de ativar CaSR presente na membrana apical da célula tubular, o qual tem sido associado com morte celular tubular (QUIROS *et al.*, 2011).

O Ca^{2+} por ser uma molécula de sinalização muito versátil que controla inúmeras funções durante a vida e a morte das células, muitos estudos recentes têm enfatizado o seu papel central na regulação da morte celular programada.

1.3.2. Células do Néfron Distal

Existem poucos estudos sobre células distais e gentamicina. Entretanto, observa-se que células dos túbulos proximais são mais sensíveis a citotoxicidade induzida pelo

aminoglicosídeo, pois endocitam e acumulam a droga nas organelas intracelulares. Já as células do néfron distal são mais resistentes ao aminoglicosídeo, possivelmente por não terem uma característica endocítica tão evidente quanto a das células proximais.

Diversos autores corroboram que há cerca de 20 membros descritos na família dos receptores de membrana TRP (*Transient Receptor Potential*), que atuam tanto como receptor quanto como canal iônico. São canais de cátion não-seletivos, permeáveis a Ca^{2+} , sendo a maioria não-dependente de voltagem (BENHAM, DAVIS e RANDALL, 2002). Estão envolvidos na homeostase do Ca^{2+} , sobretudo em células que não são ativadas eletricamente (LAUNAY *et al.*, 2002). Os TRPs parecem atuar como mediadores de estímulos ambientais tais como calor, frio, acidez, odores, osmolaridade, contato, gosto, fluxo de fluidos e sons (KARASAWA *et al.*, 2008).

Myrdal e Steyger (2005) caracterizaram e validaram um mecanismo independente de endocitose, pelo qual a gentamicina parece atravessar a membrana plasmática diretamente para o citoplasma e para o núcleo de células MDCK. Determinaram a participação de um receptor catiônico de membrana, o TRPV 1 - (*Transient Receptor Potential vanilloid 1*), pertencente a família dos receptores TRP, como mediador da entrada da gentamicina. Estes autores utilizaram moduladores da atividade deste receptor e observaram como atuaria na captação da gentamicina. Agonistas do TRPV1, baixas concentrações de cálcio no meio extracelular e pH extracelular ácido, elevaram rapidamente a captação de gentamicina pelas células, demonstrando que o TRPV 1 participa da captação do antibiótico nas células MDCK.

Células do túbulo distal são mais resistentes aos aminoglicosídicos do que células do túbulo proximal, presumidamente porque não há acúmulo da droga no citoplasma. Além disso, há uma grande diferença entre as células do néfron proximal e distal. Estas por último citadas, possuem o receptor TRPV 4 que é um receptor mecanossensível, responsivo à pressão osmótica sistêmica, induzida pelo aumento do volume celular em meio hipotônico. É somente expresso nos segmentos do néfron impermeáveis à água e onde é esperado a geração de um gradiente osmótico. O TRPV 4 pode ainda, mediar a captação dos aminoglicosídeos em diferentes linhagens de células renais sendo sua existência já confirmada nas células MDCK.

Karasawa *et al.* 2008, através de microscopia confocal localizaram receptor TRPV -4 em membrana basolateral de Células nomeadas KDT3. Esta célula e mais outros dois tipos foram imortalizadas, a partir de células primárias de rim de camundongo, sendo um deles semelhante ao néfron distal, a KDT3. Este autores demonstraram que há nestas células uma correlação entre diferentes concentrações de cálcio no meio extracelular ($[Ca^{2+}]_o$), ativação do receptor TRPV 4 e captação da gentamicina. Na ausência de $[Ca^{2+}]_o$, ocorre um aumento significativo da captação da gentamicina e maior corrente passando pelo TRPV 4, comparando com a situação controle (concentrações fisiológicas de cálcio). Já um aumento da $[Ca^{2+}]_o$ acima da fisiológica, diminui bastante a captação da gentamicina e também a corrente no TRPV 4. Logo, mais um mecanismo independente de endocitose pode influenciar na captação da gentamicina em células do néfron distal.

Dados anteriores de nosso laboratório mostraram que células MDCK C11 expostas a solução 0,1 mM de gentamicina apresentam aumento na $[Ca^{2+}]_i$, e diminuição do pH intracelular. (Coutinho, 2012).

1.4. CÉLULAS MDCK

As células MDCK, 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. Derivadas do rim de cachorro normal (cocker spaniel) por madin-darby em 1958, estão entre as mais bem caracterizadas células do epitélio renal. Fazem parte de uma linhagem de células permanentes do néfron distal, mais especificamente do ducto coletor. Apresentam na membrana apical, mecanismos de transporte como trocador Na^+/H^+ , H^+ ATPase, H^+/K^+ ATPase e trocador Cl^-/HCO_3^- , bem como canais para Cl^- e K^+ . Na membrana basolateral foi verificada atividade do co-transportador $Na^+-K^+-2Cl^-$, Na^+/K^+ ATPase, trocador Na^+/Ca^{2+} , canais para k^+ e Ca^{2+} .

A diferença de potencial transepitelial é de aproximadamente -50 mv (lúmen negativo) e a resistência está entre 200 e 4000 ω/cm^2 (lang e paulmich, 1995). são ainda, células capazes de secretar Cl^- e H^+ . O ducto coletor possui células 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, tendo em vista o conhecido envolvimento do Ca^{2+} na ação nefrotóxica da gentamicina em diferentes porções no néfron bem como a importante participação das células intercalares do ducto coletor no processo de acidificação urinária, a proposta deste trabalho foi de verificar o efeito da gentamicina na capacidade de manutenção do pH_i , bem como avaliar a atividade da H^+ -ATPase de células intercalares MDCK *wild type*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da gentamicina sobre a capacidade de pH intracelular de células MDCK *wilde type*

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a capacidade de manutenção do pHi através de sonda fluorescente, em células expostas a gentamicina.
- Avaliar se a gentamicina promove modificação no conteúdo de vesículas ácidas destas células.
- Avaliar a atividade da H⁺-ATPase em homogenado de membranas.

3. METODOLOGIA

3.1 Cultivo de células MDCK

As células MDCK foram cultivadas em *Minimum Essential Medium* (MEM) - Gibco, que contém: sais de Earle, glutamina e aminoácidos essenciais, com adição de NaHCO_3 2g/l, penicilina e estreptomicina (10000 U/ml). O meio foi suplementado com soro bovino fetal (SBF), Gibco, a 10%. As células foram cultivadas em garrafas plásticas- JET BIOFILM a uma densidade de $10^4/\text{cm}^2$, acondicionadas em estufa CO_2 (5%) - Sanyo, a 37° C. Após observação da confluência (cerca de 72h após a realização da cultura), as células foram tratadas com Tripsina - EDTA (GibcoTM, Grand Sland, NY), centrifugadas, ressuspensas em meio acrescido de soro bovino fetal e semeadas em placas- KASVI ou lamínulas de acordo com o protocolo a ser realizado.

3.2 Protocolos Experimentais

3.2.1. Avaliação da manutenção do pHi por fluorescência

Monocamadas confluentes de células cultivadas em lamínulas de vidro (20x20cm), foram expostas à solução contendo 0,1mM de sulfato de gentamicina diluído em Ringer Controle (NaCl 135 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 , 1mM, Hepes 10 mM, CaCl_2 1.8 Mm, Na_2SO_4 1 Mm, NaH_2PO_4 1 Mm, Glucose 10 mM) por 10, 20 e 30 (Grupo Gentamicina), ou diluído em solução livre de sódio (0Na^+) composta por NMDG 137 Mm, KCl 5 mM, MgCl_2 , 1mM, Hepes 10 mM, CaCl_2 1.8 Mm, Glicose 10 mM, nos mesmos intervalos de tempo. Nestas células foi avaliada a capacidade de manutenção e recuperação do pH intracelular(pHi). O Grupo Controle foi submetido

às mesmas condições temporais, sendo que as células foram expostas à Ringer Controle, sem a presença de gentamicina.

3.2.2. Registro do pH intracelular

O pH intracelular foi registrado a partir da utilização do *probe* fluorescente BCECF (2',7'- biscalboxietil-5,6-carboxifluoresceína), na forma acetilometil éster, que não tem propriedades fluorescentes, à qual a membrana é permeável. O contato com as esterases intracelulares promoveu a desesterificação do BCECF o que o tornou fluorescente e impermeável à membrana. O pHi foi determinado a partir da excitação do BCECF, de forma alternada, a 495 nm (comprimento de onda no qual a fluorescência é sensível ao pHi) e 440 nm (ponto isosbético), insensível às variações do pH. A emissão da fluorescência é medida a 530 nm. A luz proveniente de uma lâmpada de xenônio 150 W passa através de dois filtros de banda (440 e 495 nm), alcançando a preparação através da objetiva. Neste caso a objetiva atua como uma lente condensadora e como uma lente objetiva. Antes da objetiva existe um espelho dicróico que reflete a luz do comprimento de onda inferior a 520 nm, e permite a passagem da luz emitida pelo fluoróforo a um comprimento de onda superior a 520 nm a cada 10s. A monocamada de células foi incubada em solução controle contendo 10µM de BCECF-AM (Molecular Probe) por 20 minutos, em condições controladas de temperatura, umidade e CO². As áreas de interesse da monocamada foram delimitadas (aumento de 20 vezes) e as leituras foram realizadas no microscópio invertido de fluorescência Zeiss, modelo Axio Observer, acoplado ao software para fisiologia AxioVision 4.8.1. Em cada preparação, lamínula de 20x20 mm contendo monocamada confluenta de células, foi colocada numa câmara termostatizada a 37°C que ficou montada na platina do microscópio invertido. Deste modo, foi incubado com diferentes soluções a 37° C e o pH previamente ajustado para 7,4.

3.2.3 Curva padrão com nigericina

A curva padrão foi obtida a partir de soluções de nigericina com alto K^+ a pH 6,0 – 6,5 – 7,0 – 7,5. A nigericina permite a permuta livre de H^+ e K^+ na membrana celular e equilibra o pH extracelular com o pH intracelular. Após incubação com BCECF e registro do pH basal, a monocamada foi exposta às soluções de nigericina, sempre iniciando pelo pH mais alto. Os valores obtidos para a razão de fluorescência I_{495} / I_{440} foram representados em função do pH_o e utilizados para calcular o pH_i nos experimentos a partir da equação:

$pH_i = [(I_{495} / I_{440})_E - (I_{495} / I_{440})_C] * \text{Slope da curva de calibração} + pH_c$, onde $(I_{495} / I_{440})_E$ e $(I_{495} / I_{440})_C$ são as razões de fluorescência no experimento e em um padrão respectivamente, e pH_c é o pH extracelular padrão que deu origem à razão $(I_{495} / I_{440})_C$.

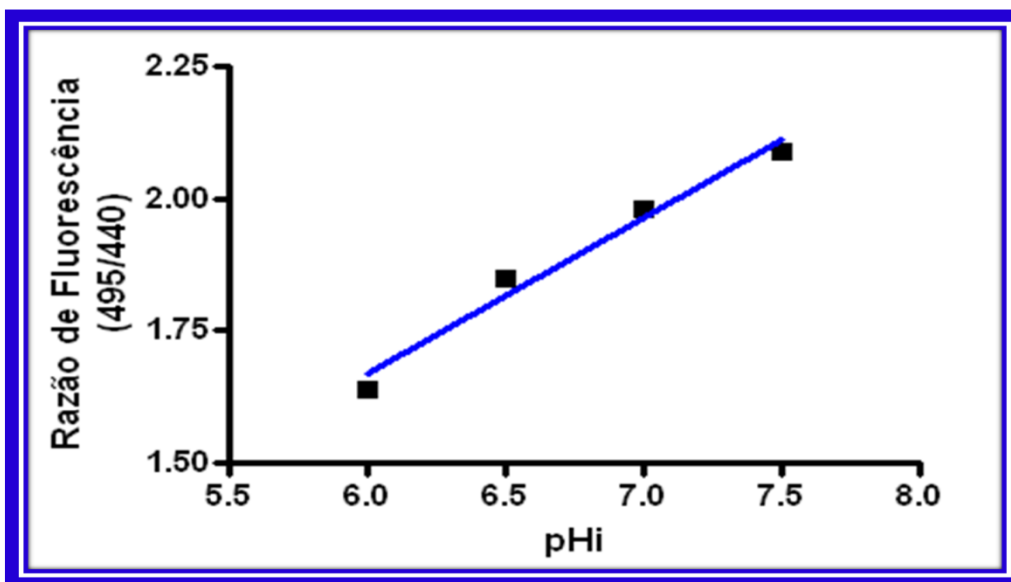


Figura 4. Curva padrão de Nigericina. Apresenta razões de fluorescência (495/440) obtidos utilizando BCECF como sonda intracelular em monocamadas de células MDCK, exposta as soluções de valores de diferentes Ph

3.3 Medida da atividade ATPásica em membranas totais de células MDCK

O protocolo para medida da atividade ATPásica em cultura de células MDCK envolveu os seguintes procedimentos:

3.3.1 Preparo das amostras de células:

As células foram cultivadas em placas contendo 6 poços e após atingido confluência o meio foi removido. Em seguida a monocultura foi lavada com PBS (*phosphate-buffered saline*) livre de Mg^{2+} e Ca^{2+} de composição: NaCl 4.36g; KH_2PO_4 608.60mg e K_2HPO_4 203.60g; qsp 500mL) e removidas mecanicamente com auxílio de um “scranner”.

Após este procedimento, a amostra foi centrifugada na excelsa baby I (1000 rpm/5min) e o sobrenadante desprezado. O “pelet” de células foi ressuspensão com 400 μ l de solução de solubilização (COMPOSIÇÃO: Triton X-100 1% (um detergente não iônico utilizado para separar proteínas de lipídios); ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 50mM; Hepes-Tris 0.5M (pH 7.0) e Sacarose 0.5M, onde, a preparação permaneceu por 30 minutos à 4 °C, até que se completou a solubilização das membranas celulares.

Uma vez que o interesse foi o de verificar a atividade da H^+ -ATPase, inibidores específicos para outras ATPases foram adicionados à preparação. A solução utilizada foi a MRC (Meio de Reação Comum) contendo a seguinte composição: $MgCl_2$ 4mM; KCl 30mM; Azida de Na^+ 10mM; HEPESTris50mM (pH7.0); ATP Na^+ 4mM; Ouabaina 1mM; Oligomicina 10mM; $CaCl_2$ 1mM, ao qual foi utilizada em todos os experimentos bioquímicos por conter inibidores das principais ATPases presentes nas células em estudo: ouabaína, para inibir a Na^+ - K^+ ATPase; oligomicina e azida de Na^+ para inibir a ATPase mitocondrial.

Para inibição da atividade da H⁺-ATPase, foi utilizado a bafilomicina 10⁻⁷, conforme descrito na tabela 1.

TABELA 1: PROTOCOLO PARA ATIVIDADE ATPÁSICA.

tubos	MRC	BAFILOMICINA 10 ⁻⁷
BRANCO	0,1	-
1	0,1	-
2	0,1	0,2

Observação: os valores estão em mL.

3.3.2 Consumo de ATP - Determinação bioquímica da atividade da H⁺-ATPases no homogenato de membrana parcialmente purificada

Para a reação que envolveu a avaliação do consumo de ATP pelas proteínas da preparação de membranas foi utilizado o método de FISKE-SUBBAROW (1925) modificada por Santos (2012). A hidrólise de ATP foi avaliada pela mensuração da quantidade de fosfato existente nas amostras por método colorimétrico, através de reagente de cor.

Como consequência, a quantidade de P_i encontrado no tubo 1 correspondia à atividade das H⁺-ATPasesv e denominamos esta atividade como basal - após ter descontado o P_i resultante da hidrólise espontânea - tubo Branco.

Este método possibilitou mensurar Pi liberado do ATP pela ação das ATPases celulares. O P_i formou um complexo colorido ao reagir com Molibdato de Amônio e Metovanadato de Amônio. A reação foi iniciada com a adição do homogenato celular ou das amostras de membrana parcialmente purificadas com uma concentração final mínima de proteína de 20µl à solução de reação com intervalos de 30 segundos entre um tubo de ensaio e outro. Após o disparo da reação, os tubos foram mantidos a 37°C em banho-maria por 30 minutos quando, então, a reação foi interrompida pela adição de 1000µL de TCA (ácido tricloro acético) 12% e temperatura de 4°C.

Nos tubos brancos a reação foi disparada com a adição do homogenato celular à solução de reação após 28 minutos de incubação e interrupção da mesma logo em seguida de modo que a reação não ocorresse neste tubo e, assim, fosse possível a obtenção da atividade ATPásica basal. Após esta etapa as amostras foram imediatamente centrifugadas a 2.000rpm em centrífuga refrigerada (*Mikro 220R, Hettich, Alemanha*) a 4°C por 5 minutos com a finalidade de precipitar o ATP não hidrolisado e as proteínas. Após a centrifugação, 500µL do sobrenadante - contendo o Pi resultante da hidrólise do nucleotídeo – foi aliquoteado e transferido para novos tubos de ensaio, aos quais foi adicionado 500µL do reativo de cor. Os tubos foram submetidos à agitação e deixados à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente foi realizada a leitura no espectrofotômetro a 380nm (*Thermo Scientific, USA*). Com a adição da proteína após 30 minutos de reação foi possível a determinação da hidrólise espontânea do fosfato. A diferença entre o valor da quantidade de Pi encontrado nos tubos e o valor observado no tubo branco foi realizada a fim de se obter o valor real de Pi liberado pela atividade das ATPases.

As soluções utilizadas no preparo do reativo de cor foram: 1) solução A, Molibdato de amônio 10% diluído em NH₄OH 1%; 2) solução B, Metovanadato de amônio 0,47% diluído em HNO₃. Para o preparo do reativo de cor procedeu-se como segue: para um volume de 100mL, misturar 5mL da solução A à 5mL da solução B, adicionando 3,7mL de HNO₃ e completando o volume com água deionizada. Foram realizadas curvas de calibração de Pi utilizando uma solução mãe de Pi (1mM) que continha Fosfato Monobásico (1mM) e Fosfato Dibásico (1mM) a pH 7.0. Com estas curvas foi possível então, obter a partir da absorbância, a quantidade de Pi (mM) resultante da reação colorimétrica.

A atividade da H⁺-ATPase foi calculada pela diferença entre o Pi liberado na ausência e na presença de Bafilomicina 10⁻⁷M. A atividade ATPásica foi expressa em nmol de Pi liberados por mg de proteína por unidade de tempo (Pi.mg⁻¹.min⁻¹).

3.3.3 Quantificação das proteínas nas preparações:

A dosagem de proteínas presentes em uma amostra desconhecida nas preparações foi realizada pelo método colorimétrico de Bradford (1976), para ter base na construção de uma curva padrão de uma proteína conhecida (albumina bovina, SIGMA).

3.4 Análise qualitativa do conteúdo de vesículas ácidas

As células também Análise do conteúdo de vesículas ácidas nos Grupos Controle e Gentamicina foi a partir da incubação das células com fluoróforo LysoTracker Red DND-99 na concentração de 500 nM, por três minutos, que marca especificamente o interior dos lisossomos, com posterior análise de imagens no microscópio de fluorescência Zeiss, na mesma configuração utilizado para BCECF,

3.4 Análise estatística

Os dados serão analisados pelo teste de Student's Newman Keuls, com nível de significância para $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

Células MDCK apresentam pH intracelular(pHi) basal em torno de 7,18. Quando expostas à solução livre de sódio, em um intervalo curto de tempo, o pHi diminui consideravelmente. Neste trabalho foi avaliada a velocidade de acidificação (unidades de pH/10s), em células MDCK expostas a solução 0,1 mM de sulfato de gentamicina por 10, 20 e 30 minutos. As células expostas à solução controle apresentaram uma pequena diminuição do pHi ao longo dos 30 minutos ($0,002 \pm 0,0008$ unidades de pH/10s). Já as células expostas à solução livre de sódio sofreram crescente acidificação ao longo do tempo, sendo que após 30 minutos a velocidade de acidificação era de $0,058 \pm 0,002$ unidades de pH/10s. Em contrapartida, a velocidade de acidificação nas células exposta à solução 0,1mM de sulfato de gentamicina foi maior ($0,0099 \pm 0,0001$ unidades de pH/10s), do que aquela observada nas que foram expostas a solução livre de sódio. Importante salientar que o veículo desta solução era a Ringer Controle (Figura 5B). A figura 5A representa o registro do pHi ao longo do tempo, em intervalo de 10 em 10 segundos de excitação do fluoróforo BCECF.

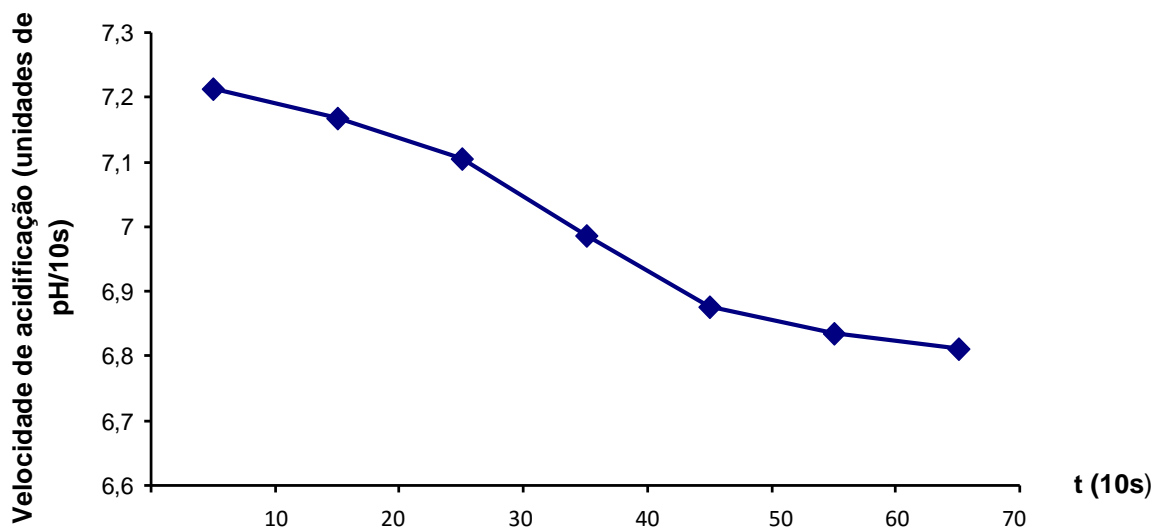


Figura 5A. Gráfico representando velocidade de acidificação por tempo em um grupo de células após 30 minutos de exposição à solução de Gentamicina 0,1 mM (Genta). (*Slope da curva*= -0,0083)

Estes resultados foram obtidos após 30 minutos de incubação com sulfato de gentamicina 0,1 mM e representam experimento individual, onde a razão fluorescente foi transformada em pH a partir da curva de calibração com nigericina, conforme descrito no item 3.2.3 (*Material e Métodos*)

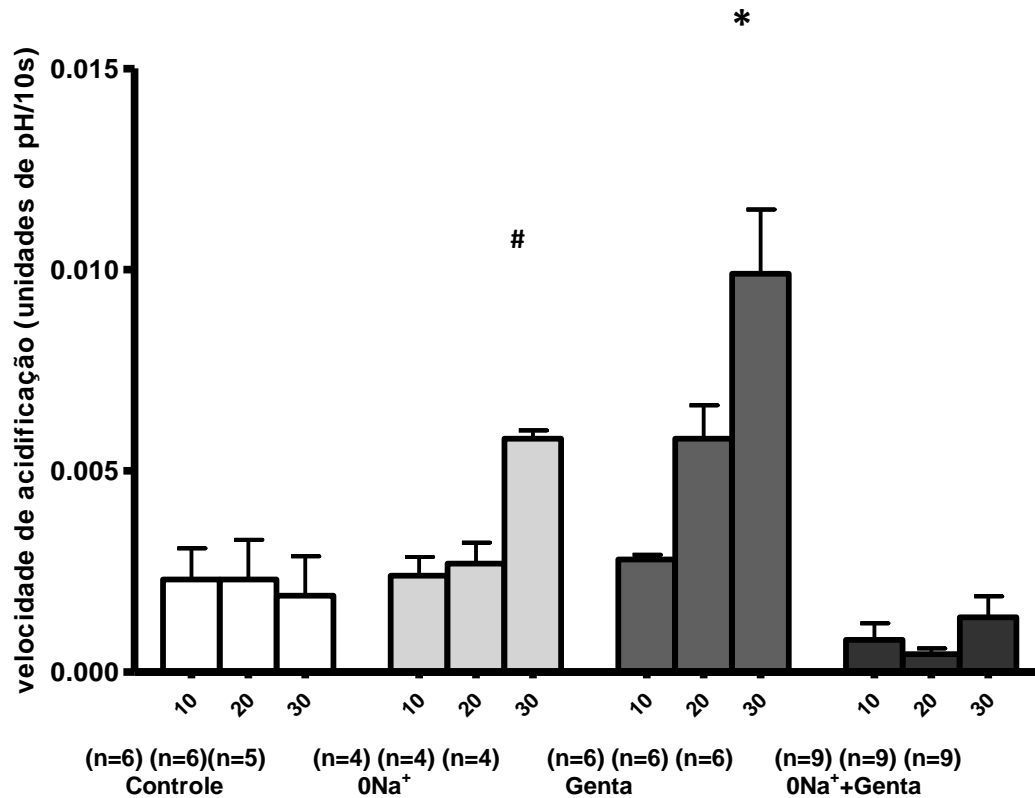


Figura 5B. Gráfico representando velocidade de acidificação por tempo aos 10, 20 e 30 minutos após a exposição às soluções controle, zero sódio (0Na⁺), Gentamicina (Genta), solução livre de sódio com gentamicina (0Na⁺ + Genta). Valores representam média \pm EPM. *= $p < 0.05$ para Genta x Controle; #= $p < 0.05$ para 0Na⁺ x Genta

Quando as células são expostas à solução 0,1 mM de sulfato de gentamicina diluído em solução livre de sódio, não se observa acidificação, ou seja, as células conseguem manter o pHi intracelular (Fig 6B).

Maior velocidade de acidificação induzida pela gentamicina, conforme já destacado pode estar relacionada a três fatores: inibição do trocador Na⁺/H⁺, inibição da atividade da H⁺-ATPase, ou ainda, pelo aumento do conteúdo de vesículas ácidas na célula, sendo que um fator não exclui o outro.

Para avaliar a atividade da H⁺-ATPase foi realizado experimento onde homogenado de membranas totais de células MDCK incubados com gentamicina

por 30 minutos, foram expostas a solução contendo 10^{-7} mol/l de bafilomicina. A atividade sensível à bafilomicina demonstra a atividade da H^+ -ATPase, uma vez que esta substância inibe a bomba de prótons. Quando a atividade ATPásica é avaliada em homogenado de células controle (mantidas apenas em meio de cultivo antes do experimento), observa-se que a atividade sensível à bafilomicina é menor do que a atividade basal(C= 79, 48 \pm 36,6 nmoles de P_i / min/mg de proteína, n = 5 x C=191,19 \pm 57,1 nmoles de P_i / min/mg de proteína, n = 5, $p < 0.05$ para), evidenciando que a preparação apresenta fosfato inorgânico (P_i), oriundo do consumo de ATP pela H^+ -ATase.

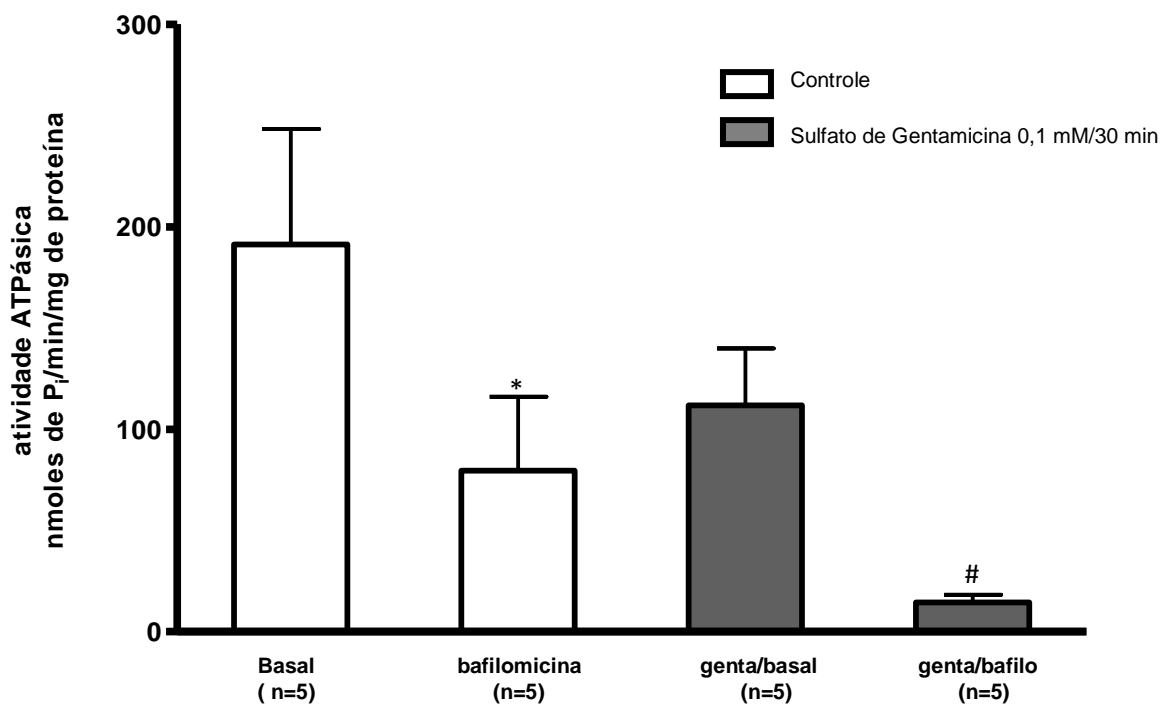


Figura 6A. Representação da atividade ATPásica (consumo de ATP em razão do tempo) Basal refere-se a atividade basal registrada no homogenado de membranas; bafilomicina representa a atividade dependente de bafilomicina; genta/basal indica atividade basal das células incubadas com solução 0,1mM de sulfato de gentamicina por 30 minutos; genta/bafilo é a atividade obtida após a incubação com gentamicina. Dados representam média \pm EPM.*= $p < 0.05$ para bafilomicina x basal; # = $p < 0.005$ para atividade sensível à bafilomicina x atividade basal em células expostas à gentamicina

Nas células incubadas com gentamicina, a atividade basal (sem bafilomicina) também se apresenta menor do que a atividade basal controle (GB = 42,2 \pm 4,87 nmoles de P_i / min/mg de proteína, n = 5) e, quando bafilomicina é adicionada à

preparação, a atividade diminui consideravelmente ($GB = 27,532 \pm 8,35$ nmoles de P_i / min/mg de proteína, $n = 5$). Os resultados obtidos nestes experimentos estão demonstrados na Figura 6A.

Na figura 6B são apresentados os dados relativos à diferença entre a atividade basal controle e a atividade sensível a bafilomicina ($Ab = 11,8 \pm 28,21$ nmoles de P_i / min/mg de proteína, $n = 5$), bem como a diferença entre a atividade ATPásica basal e sensível a bafilomicina de células que foram tratadas com gentamicina antes do experimento ($Ag = 14,51 \pm 3,7$ nmoles de P_i / min/mg de proteína, $n = 5$). Este dados (Figuras 6 A e 6B demonstram que a gentamicina é capaz de inibir a atividade da H^+ -ATPase e ainda, pode estar promovendo inibição do consumo de ATP de outras fontes na célula (Ca^{2+} -ATPase, por exemplo).

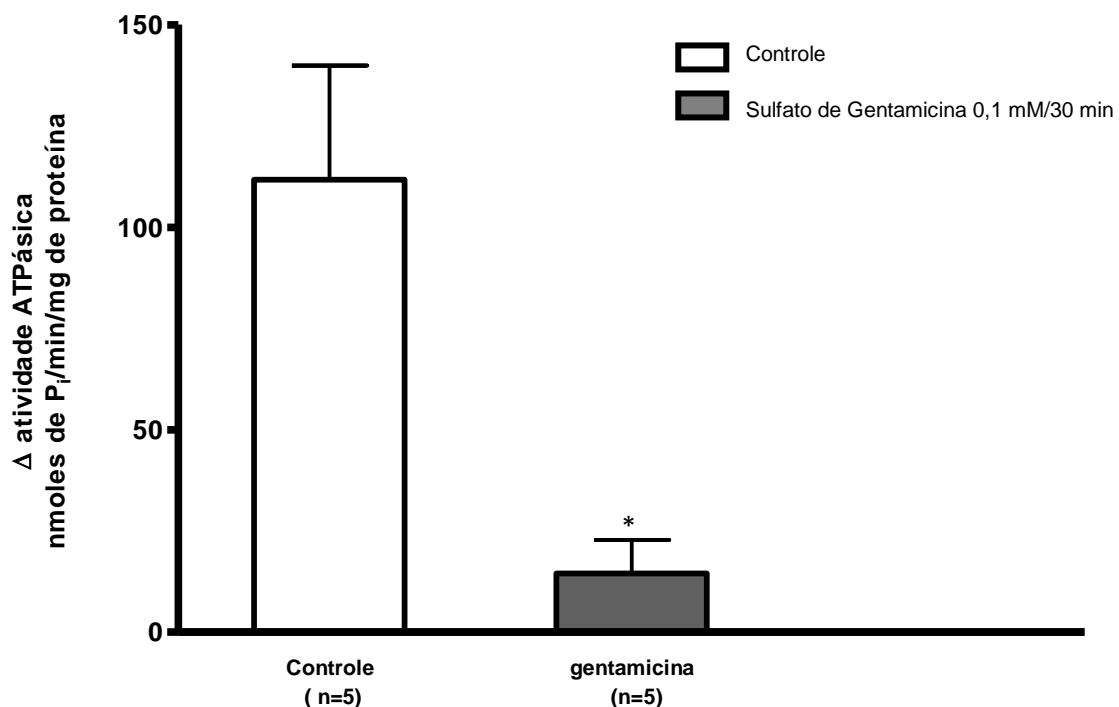


Figura 6B. Diferença entre a atividade basal e a atividade sensível a bafilomicina para células controle e tratadas com 0,1 mM de sulfato de gentamicina. Dados representam média \pm EPM. * = $p < 0.001$.

Nas figura 7A e 7B é possível observar a marcação fluorescente obtida pela utilização o marcador Lyso Tracker , que tem a propriedade de marcar especificamente

vesículas lisossomais. Após 30 minutos de incubação com solução 0,1 mM de gentamicina, o conteúdo de vesículas ácidas aumenta (figura 7A) quando comparamos a figura B. Esta marcação é bastante evidente na região perinuclear (\blacktriangleleft), mostrando que há um maior acúmulo de vesículas nesta região. A figura 7D mostra as células controle, antes da excitação fluorescente, enquanto que na Figura 7C, observa-se células expostas à gentamicina 0,1mM por 30 minutos, antes da excitação do fluoróforo (luz transmitida). Nota-se que as células incubadas cm gentamicina apresentam-se mais arredondadas e observa-se um grande número de estruturas vacuolares (\blacktriangleright).

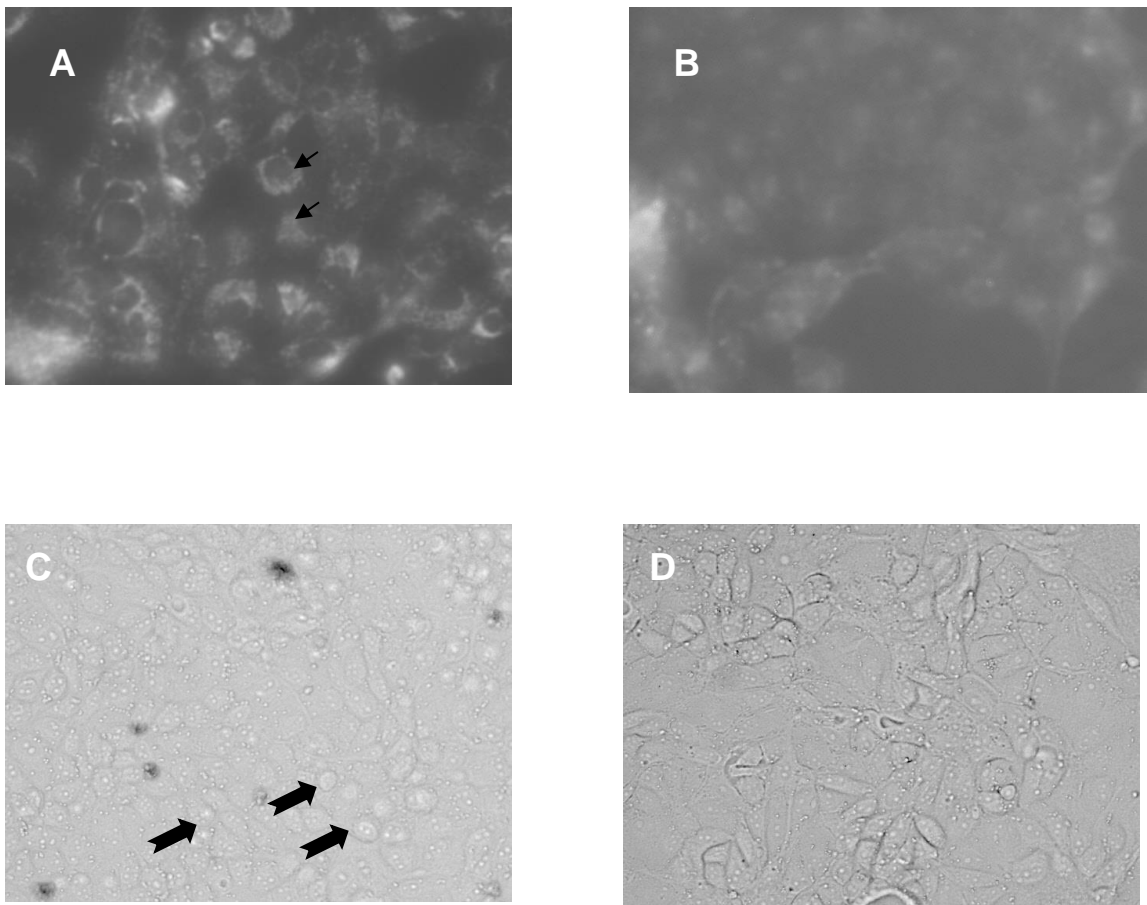


Figura 7: Registros de vesículas ácidas por marcador fluorescente Lyso Tracker e registros à exposição de solução controle e gentamicina antes do fluoróforo. Em A e B, uso de marcador fluorescente *Lyso Tracker*. Em B para células incubadas em solução controle e em A para células incubadas após 30 minutos com gentamicina. Em C e D, registros antes da exposição ao fluoróforo, sendo D após exposição à solução controle e C após exposição à gentamicina.

As células incubadas com gentamicina apresentam-se mais arredondadas, enquanto as células controle encontram-se mais achatadas, indicando maior grau de adesão na superfície da lamínula. Com esses resultados é possível sugerir que a gentamicina promove aumento da atividade lisossomal de células em cultura.

5. DISCUSSÃO

Gentamicina é um antibiótico largamente utilizado contra infecções por bactérias Gram-negativas por possuir alta eficácia e baixo custo. Entretanto, sua eficácia terapêutica tem que ser restrita devido a sua nefrotoxicidade e ototoxicidade. Classicamente, a gentamicina vem sendo utilizada como modelo para estudo de insuficiência renal aguda em animais. Atualmente, muitos trabalhos vêm demonstrando seu efeito tóxico em células mesangiais, glomerulares e células do túbulo proximal, mas poucos relatos sobre túbulo distal.

O aspecto central da nefrotoxicidade por gentamicina em túbulo proximal pode variar de perda da borda em escova de células epiteliais a necrose tubular por consequência de vários fatores que são desencadeados por acúmulo da droga. Em células proximais, a via endocítica é a via descrita para entrada de gentamicina na célula (MOESTRUP *et al*, 1995; SERVAIS *et al.*, 2005; ANTOINE *et al*, 2008; QUIROS *et al*, 2010). Já em células distais, a via endocítica não é predominante no que se refere a mecanismos de reabsorção. Deste modo, vias não endocíticas como a via representadas pelos canais da família TRPV são descritas como vias de ação da gentamicina em células como as MDCK e KDT3 (MYRDAL e STEYGER, 2005; KARASAWA *et al.*, 2008). Por outro lado, aminoglicosídeos como a gentamicina, tobramicina e neomicina são utilizados comumente com agonistas do receptor sensível a cálcio (CaR) (WARD *et al*, 2002; GIBBONS *et. al*, 2008).

Neste trabalho, em experimentos realizados com células MDCK, a gentamicina promoveu uma diminuição no pHi maior do que aquela apresentada por células exposta à solução livre de sódio (Figura 7). De algum modo, estas células perdem a capacidade de manutenção de seu pHi. Como já salientado, esta acidificação induzida pela gentamicina pode estar relacionada a três fatores: inibição do trocador Na^+/H^+ , inibição da atividade da H^+ -ATPase, ou ainda, pelo aumento do conteúdo de vesículas ácidas na célula, num possível processo de morte celular programada. A inibição do trocador Na^+/H^+ nos experimentos realizados só foi observada com a utilização de soluções de trabalho onde o NaCl foi substituída por NMDG (solução 0Na^+), portanto nada se pode concluir em relação a ação da gentamicina sobre este transportador de prótons. Além disso, quando o registro do pHi é feito quando as células são expostas à solução de gentamicina diluída em

solução livre de sódio, não ocorre acidificação, ou seja, as células mantêm seu pH_i próximo ao basal. Este dado carece de maior investigação, uma vez que alguma condição pode estar alterada, uma vez que aparentemente não está ocorrendo nenhuma mudança no pH_i . Ao contrário, é bastante sugestiva a participação da gentamicina na perda da capacidade de manutenção do pH_i intracelular, quando o antibiótico é diluído em solução controle, ou seja, na presença de sódio.

O pH intracelular de muitos tipos celulares é regulados por vesículas contendo H^+ -ATPase que se incorporam por exocitose, nas membranas plasmáticas (SCHWARTZ, BARASCH, AL-AWGATI, 1985). Fernandes Oliveira-Souza e Malnic (2000) determinaram diferentes mecanismos de recuperação do pH_i para o subtipo C11 de células MDCK, incluindo um trocador Na^+/H^+ e uma H^+ -ATPase sensível à concanamina nas membranas apical e basolateral e uma H^+/K^+ -ATPase sensível a Schering 28080 na membrana apical. O bombeamento de prótons pela H^+ -ATPase e H^+/K^+ -ATPase, são independentes de sódio e dependentes de cloreto (TARARTHUCH *et al*, 2007). Portanto, na ausência de sódio ocorre inibição do trocador Na^+/H^+ e a extrusão de H^+ do meio intracelular é feita pelas bombas de prótons.

Brown e cols. (1987), utilizando imunomarcação em rins de ratos, demonstraram a presença das H^+ -ATPase tanto em membrana plasmática quanto armazenadas em vesículas próximas às membranas de células intercalares (ICs); e de células epiteliais do túbulo proximal. Este armazenamento em vesículas desempenharia um papel importante nas ICs, já que as mesmas poderiam se inserir na face apical ou basolateral de acordo com as necessidades do organismo, conferindo ao sistema uma certa plasticidade fisiológica (SCHWARTZ E AL-AWQATI, 2005).

A gentamicina é considerada, assim como outros aminoglicosídeos, agonista do CaR. Gibbons *et al* (2008) mostraram aumento significativos de $[Ca^{2+}]_i$ em preparações expostas a diferentes concentrações destes antibióticos, sendo esta atividade semelhante àquela induzida por gadolínio(Gd^{3+}). Resultados anteriores de nosso laboratório mostraram que células MDCK C11, expostas à gentamicina apresenta aumento significativo da $[Ca^{2+}]_i$ e que este aumento pode estar relacionado à estimulação do CaR, sendo responsável pela deflagração de possível evento apoptótico nestas células(COUTINHO, 2012) .

Estudos de Casare, *et al* (2011) demonstraram que a atividade da H⁺-ATPase é estimulada por cálcio, via receptor sensível à cálcio, ou na presença de agonistas do CaR, como o Gd³⁺. A Figuras 6A e 6B mostram que a gentamicina inibiu cerca de 87% a atividade desta bomba, mas ainda é possível detectar presença de algum outro mecanismo que consomem ATP, como por exemplo, a Ca²⁺-ATPase.

Picos na concentração de cálcio intracelular está relacionado a sinalização de vários eventos nas células. Quando estes picos representam concentrações intracelulares de cálcio muito altas ou se são sustentados e não transientes estão relacionados a apoptose (RIZZUTO, *et al*, 2003). A gentamicina, por sua vez, tem seus efeitos relacionados a apoptose em muitos tipos celulares (MOUDDEN, *et al*. 2000).

A figura 7 registra a fluorescência emitida após incubação com o fluoróforo Lyso Tracker, específico para vesículas lisossomais. As células incubadas com gentamicina por 30 minutos apresentaram uma maior atividade lisossomal. Já é bem entendido que uma vez dentro das células, os aminoglicosídeos alteram a função de várias organelas, como por exemplo, lisossomo, complexo de golgi, retículo endoplasmático e citosol, mas é no lisossomo onde a gentamicina mais se acumula (SERVAIS *et al.*, 2005).

Lisossomos e mitocôndrias, dentre as várias organelas subcelulares potencialmente envolvidas na apoptose, estão entre as principais capazes de enviar sinais de morte celular, através da ativação de sensores de estresse celular específicos (FERRI e KROEMER, 2001). Segundo Servais *et al.* (2005) células tubulares proximais LLC-PK1, expostas à gentamicina, possuem o início da apoptose precedido por desestabilização da membrana lisossomal. A ativação do “caminho lisossomal para a apoptose” – terminologia bem aceita para descrever o mecanismo que foi primeiramente identificado em situações patológicas (GUICCIARDI, LEIST e GORES, 2004) - consiste na ruptura da membrana lisossomal e liberação de hidrolases ácidas. Desta forma, o acúmulo da gentamicina nos lisossomos pode ativar morte celular programada. O marcador Lyso Tracker é descrito por Fogel *et al* (2012) como marcador de morte celular programada.

Como as células MDCK representam o ducto coletor do néfron, onde a atividade endocítica não é tão efetivamente observada como em TP, sugere-se que uma via não endocítica pode estar sendo estimulada pela gentamicina de modo a garantir aumento do cálcio intracelular, numa maior magnitude do que aquela

responsável pela ativação da H-ATPase e que o processo a ser ativado pelo cálcio alto seja o de morte celular programada, o que justificaria presença de maior atividade lisossomal. Entretanto, não se pode descartar que esta atividade esteja relacionada à endocitose da gentamicina por estas células de ducto coletor, evidenciada pela alta atividade lisossomal, e que não necessariamente pode estar indicando apoptose. Estes dados requerem estudos futuros para que possam ser melhor elucidados.

6. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que células MDCK *wilde type*, expostas à gentamicina apresentam

- Perda da capacidade de manutenção do pHi basal, possivelmente por diminuição da atividade da H⁺-ATPase.

- Aumento da atividade lisossomal, que pode estar relacionada ao acúmulo de gentamicina na célula, oriundo de endocitose ou deflagração de processo de apoptose.

REFERÊNCIAS

- ANTOINE, D.J.; SRIVASTAVA A.; PIRMOHAMED M.; PARK B. Statins inhibit aminoglycoside accumulation and cytotoxicity to renal proximal tubule cells. **Biochemical Pharmacology**.p. 647–654, 2009.
- BALAKUMAR, P.; ROHILLA, A.; THANGATHIRUPATHI, A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? **Pharmacological Research**, v. 62, p. 179-186, 2010.
- BENHAM, C.D.; DAVIS, J.B.; RANDALL, A.D. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. **Neuropharmacology**, v. 42, p. 873-878, 2002.
- BERNE e LEVY. **Fisiologia**, 6 a. Ed., Editora Elsevier, 2009.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **72**: 248-254, 1976.
- BROWN, D.; GLUCK, S.; HARTWIG, J.; Structure of the novel membrane-coating material in proton-secreting epithelial cells and identification as an H⁺ ATPase. **J. Cell Biol.**, **105**: 1637-1648, 1987.
- BROWN, D; PAUNESCU T.P; BRETON, S; MARSHANSKY, V. Regulation of the V-ATPase in kidney epithelial cells: dual role in acid–base homeostasis and vesicle trafficking. **The Journal of Experimental Biology** 212, 1762-1772, 2009.
- CASARE, F.; Milan D, Fernandez R: Stimulation of calcium-sensing receptor increases bio-chemical H⁺ -ATPase activity in mouse cortex and outer medullary regions. **Can J Physiol Pharmacol** ;92; p.181–188, 2014.
- COIMBRA, T. M.; LACHAT. J.J. 1988. Analysis of urinary albumin excretion in gentamicin-treated rats. **Nephron**, v. 49, p. 154-159, 1988.
- COUTINHO, A.G.G. **Efeitos do antibiótico aminoglicosídeo gentamicina em células tubulares renais (mdck – c11)**. 2012. 58 F. Dissertação (mestrado em fisiologia) . Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.2012
- DAVIES, J; DAVIS B.D. Misreading of Ribonucleic Acid Code Words Induced by Aminoglycoside Antibiotic. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, p. 3312-3316, 1968.
- FALCO, F.G.; SMITH, H.M.; ARCIERI, G.M. Nephrotoxicity of aminoglycosides and gentamicin. **J. Infectious Diseases**, v. 119(4), p. 406-409, 1969.

FERNANDEZ, R. BOSQUEIRO, J.R.; CASSOLA, A.C.; MALNIC, G. Role of Cl⁻ in electrogenic H⁺ secretion by cortical distal tubule. **J. Memb. Biol.** v. 157, p. 193-201, 1997.

FERNANDEZ, R.; OLIVEIRA-SOUZA, M.; MALNIC, G. Na⁺ -independent próton secretion in MDCK-C11 cells. **Pflugers Arch**, v. 441, p. 287-293, 2000.

FOGEL, J.L.; THEIN, T.Z.; MARIANI, F.V. Use of LysoTracker to detect programmed cell death in embryos and differentiating embryonic stem cells. **J Vis Exp**. 2012.

FRANCESCATO, H.D.; CHIERICE, E.C.S.; MARIN, F.Q; CUNHA, R.S.; COSTA, C.G.A.; COIMBRA, T.M. Effect of endogenous hydrogen sulfide inhibition on structural and functional renal disturbances induced by gentamicin. **Braz J Med Biol Res**, v. 45(3), p. 244-249, 2012.

FERRI, K.F.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. **Nat. Cell Biol**, v. 3, p. 255-263, 2001.

GIBBONS, C.E.; MALDONADO-PÉREZ, D.; SHAH, A.N.; RICCARDI, D.; WARD, D.T. Calcium-sensing receptor antagonism or lithium treatment ameliorates aminoglycoside-induced cell death in renal epithelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta** . 2008

GUICCIARDI, M.E.; LEIST, M.; GORES, G.J. Lysosomes in cell death. **Oncogene**, v. 23, p. 2881-2890, 2004.

HALL, A.M. P; BASS, R.J. Drug-induced renal Fanconi syndrome. **Unwin Oxford journals**, 2013.

HARVEY, W.R. Physiology of V-ATPases. **J. Exp. Biol.** v. 172, p. 1-17, 1992.

KARASAWA, T.; WANG, Q; FU, Y.; COHEN, D.M.; STEYGER, P.S. TRPV4 enhances cellular uptake of aminoglycoside antibiotics. **J. Cell Sci**, v. 121(17), p. 2871-2879, 2008.

KURTZ, I. Molecular Mechanisms and Regulation of Urinary Acidification. **Comprehensive Physiology. Cap.** 4(4), p. 1737–1774, 2014.

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

MALNIC, G. Cell biology of H⁺ transport in epithelia. **Ann. Rev. Biomed. Sci.** v. 2, p. 5-37, 2000.

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, 2007.

- MELLO-AIRES, M. **Fisiologia**, 2a. Ed., Editora Guanabara - Koogan, 1999.
- MELLO-AIRES, M. **Fisiologia**, 3a. Ed., Editora Guanabara - Koogan, 2008.
- MOESTRUP, S. K.; CUI, S.; VORUM, H., BREGENGARD, C.; BJORN, S.E.; NORRIS, K.; GLIEMANN, J.; CHRISTENSEN, E.I. Evidence that Glycoprotein 330/Megalin Uptake of Polybasic Drugs. **The American Society for Clinical Investigation, Inc**, v. 96, p. 1404-1413, 1995.
- MYRDAL, S.E.; STEYGER, P.S. TRPV1 regulators mediate gentamicin penetration of cultured kidney cells. **Hear Res**, v. 204, p. 170-182, 2005.
- MOUEDDEN, E. M.; LAURENT, G.; MINGEOT-LECLERC, M.; TULKENS, P.M. Gentamicin – induced apoptosis in renal cells line and embryonic rats fibroblastos. **Toxicological sciences**, 2000.
- NAGAI, J.; TAKANO, M. Entry of aminoglycosides into renal tubular epithelial cells via endocytosis-dependent and endocytosis-independent pathways. **Biochemical Pharmacology**, 2014.
- NOLASCO, F.E.; CAMERON, J.S.; HARTHLEY, B.; COELHO, A.; HILDRETH, G.; REUBEN R. Intraglomerular T cell and monocytes in nephritis, study with monoclonal antibodies. **Kidney Int**, v. 32, p. 1160-1167, 1987.
- NOLLER, H.F. Ribosomal RNA and Translation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 60, p. 191-227, 1991.
- NORONHA, I.L.; FUJIHARA, C.K.; ZATZ, R. The inflammatory component in progressive renal disease-are interventions possible? **Nephrol Dial Transplant**, v. 1, p. 363–368, 2002.
- OLIVEIRA-SOUZA, M.; MELLO-AIRES, M. Effect of arginine vasopressin and ANP on intracellular pH and cytosolic free [Ca²⁺] regulation in MDCK cells. **Kidney International**, v. 60, p. 1800-1808, 2001.
- QUIROS, Y.; VICENTE-VICENTE, L.; MORALES, A.I.; LÓPEZ-NOVOA, J.M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F.J. An Integrative Overview on the Mechanisms Underlying the Renal Tubular Cytotoxicity of Gentamicin. **Toxicological Sciences**, v. 119(2), p. 245-256, 2011.
- RUIZ-ORTEGA, M.; EGIDO, J. Angiotensin II modulates cell growthrelated events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. **Kidney Int**, v. 52, p. 1497–1510, 1997.
- SANTOS, P. M.C. **Influência do receptor sensível a cálcio extracelular (CaSR) sobre a atividade da h⁺-atpase vacuolar em células do túbulo proximal**. 2012. 72 f. Dissertação (mestrado em fisiologia). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2012

SANTUCCI, R. A.; KRIEGER, J. N. Gentamicin for the practicing urologist: review of efficacy single daily dosing and "switch therapy". **The Journal of Urology**, v. 163, p. 1076-1084, 2000.

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

SERVAIS, H.; SMISSEN, P. V. DER.; THIRION, G.; ESSEN, G.V. DER; BAMBEKE, F.V.; TULKENS, P.M.; MINGEOT-LECLERC, M.P. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: Involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 206, p. 321-333, 2005.

SCHWARTZ, G.J.; AL-AWQATI, Q. Role of hensen in mediating the adaptation of cortical collecting duct to metabolic acidosis. **Curr Opin Nephrol Hypertens**. **14**: 383-388, 2005.

STEINMETZ, P.R. Cellular organization of urinary acidification. **Am. J. Physiol. Renal Physiol** v. 251, p. F173-F187, 1986.

WARD, D. T.; MCLARNON, S.J.; RICCARDI D. Aminoglycosides increase intracellular calcium levels and ERK activity in proximal tubular OK cells expressing the extracellular calcium-sensing receptor. **J. Am. Soc. Nephrol**, v. 13, p. 1481-1489, 2002.

ZATZ, R; MALNIC, G. Distúrbios do Equilíbrio Acido-Base: papel dos rins na excreção dos ácidos fixos. In: **Zatz R. Fisiopatologia Renal**. Editora Atheneu: São Paulo, 2000, p 218-219.