

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS

MARINA FELIPE GROSSI

AVALIAÇÃO DA NEFROTOXICIDADE CAUSADA PELA ANFOTERICINA B
UTILIZANDO LINHAGENS CELULARES LLC-PK1 E MDCK.2

Belo Horizonte

2016

MARINA FELIPE GROSSI

**AVALIAÇÃO DA NEFROTOXICIDADE CAUSADA PELA ANFOTERICINA B
UTILIZANDO LINHAGENS CELULARES LLC-PK1 E MDCK.2**

Dissertação, como requisito parcial, para obter grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Orientador: Prof. Carlos Alberto Tagliati

Belo Horizonte

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Toxicologia *in vitro*, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Carlos Alberto Tagliati.

Apoio Financeiro:

- CNPq (Processos 473125/2012-9 e 310624/2012-6);
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INO FAR)
- FAPEMIG (CDS - APQ-01712-1)

(FOLHA DE APROVAÇÃO)

Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre apoiaram minhas escolhas, meus irmãos e a minha família.

AGRADECIMENTO

Agradeço a minha mãe por todo apoio e paciência, por ser meu maior exemplo de força e determinação e por me incentivar sempre que desejei desistir.

A minha família, avós, tios e primos por tornarem os momentos difíceis mais leves.

Agradeço ao orientador Prof. Carlos Alberto Tagliati pela oportunidade de fazer parte desse projeto, pela confiança depositada em mim e pelas discussões enriquecedoras que contribuíram muito para a construção dessa dissertação.

Ao Prof. Leonardo Augusto de Almeida pela imensa colaboração e auxílio no projeto.

Aos colegas do laboratório de Toxicologia *in vitro* pela ajuda sempre que necessária.

Ao CNPq e INCT-INOVAR pelo apoio financeiro concedido.

A Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pela oportunidade de realizar esse mestrado.

“Eu não tenho nenhum talento especial.
“Sou apenas apaixonadamente curioso.”
- Albert Einstein

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estágios da toxicidade após exposição ao composto químico.	16
Figura 2 -	O papel dos estudos <i>in vitro</i> em toxicologia.	21
Figura 3 -	Segmentos tubulares básicos do néfron.	22
Figura 4 -	Estrutura química da anfotericina B.	25
Figura 5 -	Esquema para compreensão da toxicologia de sistemas.	29

RESUMO

Anfotericina B (AmB), um antibiótico da classe dos macrocíclicos polienos, é um dos antifúngicos mais efetivos no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Entretanto, seu uso é frequentemente limitado pela ocorrência de efeitos adversos, especialmente nefrotoxicidade. A nefrotoxicidade induzida por fármacos é um dos efeitos mais frequentemente observados em farmacoterapias de longo prazo. Essas situações têm sido descobertas tardiamente devido aos métodos atuais para determinação da toxicidade. O presente estudo teve por objetivo propor métodos alternativos *in vitro* para identificação precoce da toxicidade celular causada pela Anfotericina B. Para tanto, duas linhagens celulares renais, LLC-PK1 (túbulo proximal) e MDCK.2 (túbulo distal), foram expostas a nove diferentes concentrações (2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 e 30 µg/mL) de AmB durante 24 horas. Os testes de expressão gênica foram realizados de acordo com os resultados do ensaio de MTT. Um grupo de genes nefrotóxicos sensíveis e específicos foi escolhido com base em estudos anteriores *in vitro* e *in vivo*. A busca de sequências de mRNAs que codificam proteínas, previamente associados com danos renais, foi realizada nas bases de dados do *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (EUA). O RNA total foi extraído a partir das células expostas e foi realizado RT-PCR para avaliar o perfil de expressão diferencial dos genes selecionados. Os genes com a maior expressão incluem: *HAVCR1* (*Kim-1*), *CASP3*, *ANXA5* e *VDAC*.

Palavras-chave: Métodos Alternativos; Biomarcadores; Nefrotoxicidade; Expressão gênica; LLC-PK1; MDCK.2

ABSTRACT

Amphotericin B (AmB), a polyene macrolide antibiotic, is one of the most effective antifungal drug for the treatment of systemical fungal infection. However, its use is often limited by the occurrence of adverse events, especially nephrotoxicity. Drug-induced nephrotoxicity is one of the mainly frequently observed effects in long-term pharmacotherapy. Such situations have been tardily discovered because of existing methods to determine its toxicity. The present study was designed to propose *in vitro* alternative methods for early identification of AmB cell toxicity. Therefore, we exposed two different renal cell lines, LLC-PK1 (proximal tubule) and MDCK.2 (distal tubule), to nine different concentrations (2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 and 30 µg/mL) of AmB during 24 hours. Gene tests were carried out according to results from MTT assay. A panel of sensitive and specific nephrotoxic genes was selected based on earlier *in vitro* and *in vivo* studies. The search for sequences of mRNAs encoding proteins that had been previously associated with kidney damage was conducted in the databases of the *National Center for Biotechnology Information - NCBI* (USA). RNA was extracted from the cells, and RT-PCR was performed to evaluate differential gene expression profiles of the selected genes. The genes with the highest fold change include *HAVCR1* (*KIM1*), *CASP3*, *ANXA5*, and *VDAC1*.

Key words: Alternative methods; Biomarkers; Nephrotoxicity; Gene expression; LLC-PK1; MDCK.2.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3Rs	<i>Replace, reduce, refine</i>
ADH	Hormônio antidiurético
AmB	Anfotericina B
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ATSDR	<i>Agency for toxic substances and disease registry</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de ética no uso de Animais
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECVAM	<i>European centre for the validation of alternative methods</i>
EMA	<i>European medicines agency</i>
EPA	<i>Enviromental protection agency</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
ICCVAM	<i>Interagency coordinating committee on the validation of alternative methods</i>
IRA	Insuficiência renal aguda
jaCVAM	<i>Japanese centre for the validation of alternative methods</i>
LabTox	Laboratório de toxicologia
LLC-PK1	<i>Porcine kidney cell line</i>
MDCK.2	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MEM	Meio essencial mínimo
mRNA	RNA mensageiro
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
OECD	<i>Organization for economic cooperation and development</i>
QSAR	<i>Quantitative structure-activity relationships</i>
REACH	<i>Registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
ZEBET	<i>Centre for documentation and evaluation of alternatives to animal experiments</i>

SUMÁRIO

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
2. INTRODUÇÃO.....	14
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1. Contextualização	15
2.2. Desenvolvimento de fármacos e órgãos regulamentadores	17
2.3. Função Renal	22
2.4. Anfotericina B e nefrotoxicidade	25
2.5. Biomarcadores e toxicogenômica	27
2.6. Outras tecnologias.....	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo geral.....	31
3.2. Objetivos específicos	31
4. ARTIGO	32
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
6. PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Nos últimos anos a insuficiência renal aguda (IRA), tem aumentado muito em decorrência da maior utilização de substâncias nefrotóxicas. A indução da nefrotoxicidade pelos xenobióticos é uma das maiores causas de IRA quando se considera os efeitos colaterais de determinadas drogas e representam um significativo desafio para as indústrias farmacêuticas. No entanto, a falta de preditividade dos modelos *in vivo* tem aumentado a taxa de falha dos candidatos a fármacos, elevando o tempo e os custos para o desenvolvimento de um novo produto. Métodos alternativos *in vitro*, podem levar ao desenvolvimento de medicamentos mais seguros e baratos podendo ser utilizados nos ensaios pré-clínicos de novas moléculas. Considerando que danos moleculares e celulares precedem alterações histopatológicas, uma vez que a expressão de um conjunto de genes é consistentemente alterada após a exposição a um xenobiótico, a expressão diferencial destes genes pode ser utilizada como biomarcadores de toxicidade precoces. O uso de medicamentos reconhecidamente nefrotóxicos em estudos de biomarcadores é uma maneira de identificar a expressão de tais genes. A Anfotericina B, nosso fármaco de escolha, é um antibiótico natural amplamente utilizado no tratamento de micoses sistêmicas, mas tem seu uso limitado pela indução severa da nefrotoxicidade. No presente estudo, foram utilizadas as linhagens LLC-PK1(túbulo proximal) e MDCK.2 (túbulo distal) para análise da nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B de acordo com o teste MTT, para avaliação do metabolismo celular e posterior expressão gênica po RT-PCR. Uma pesquisa bibliográfica foi realizada para identificar genes associados ao desenvolvimento de nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B (entre outros fármacos reconhecidamente nefrotóxicos) e um grupo de 11 genes foram selecionados. A expressão dos genes foi analisada através da técnica de PCR em tempo real nas células expostas às concentrações citadas. Portanto, nossos resultados sugerem que esses genes podem ser utilizados como biomarcadores precoces de nefrotoxicidade *in vitro*. Contudo, mais estudos são necessários para validação dos mesmos e compreensão das vias envolvidas.

2. INTRODUÇÃO

A anfotericina B (AmB) é um agente antifúngico da classe dos macrocíclicos polienos que tem sido utilizado como padrão de ouro para o tratamento de muitas infecções fúngicas sistêmicas graves durante mais de 40 anos. No entanto, mecanismo de ação deste fármaco pode conduzir a efeitos tóxicos, especialmente nefrotoxicidade, que é o principal efeito observado na prática clínica (FRANCA et al., 2014; HARMSSEN et al., 2011).

A nefrotoxicidade é um dos efeitos mais frequentemente observados após a utilização em longo prazo do medicamento porque os métodos de cálculo da toxicidade, usando modelos animais, falham nos seus objetivos fundamentais. Há uma necessidade de melhorar constantemente estratégias de teste de segurança. Assim, a validação de métodos alternativos sensíveis para a identificação precoce de efeitos tóxicos é tão importante como as restrições sobre o uso de animais (TAGLIATI et al., 2012).

Várias linhagens de células epiteliais renais têm sido empregadas como métodos alternativos para o estudo da nefrotoxicidade causada por produtos terapêuticos. (PRICE; SAFIRSTEIN; MEGYESI, 2004; TIONG et al., 2014; VARLAM et al., 2001) A linhagem *Madin-Darby canine kidney* (MDCK.2), é derivada de túbulo distal de rim de *Cocker spaniel*, é uma das linhas de células epiteliais melhor caracterizadas e mais amplamente utilizadas (BALKOVETZ et al., 2004). Já as *Porcine kidney cell line* (LLC-PK1) são células tubulares proximais derivadas de rim de suínos e têm sido mais frequentemente usadas nos estudos de toxicidade causados por compostos em túbulo proximal (SERVAIS et al., 2006). Ambas as linhagens celulares são considerados modelos aceitáveis para o estudo da nefrotoxicidade causada por drogas e para validação métodos alternativos. (DENAMUR et al., 2008; SERVAIS et al., 2008; YANO et al., 2009).

Recentemente, vários candidatos a biomarcadores urinários para avaliação da toxicidade renal aguda foram aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (SOHN et al., 2013).

A identificação e avaliação de novas e biomarcadores precoces de toxicidade para órgãos-alvo estão entre as principais aplicações de tecnologias genômicas. Assim, os biomarcadores genômicas se tornaram marcadores úteis para análise de danos histopatológicos e podem contribuir para a avaliação da toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KUMAR; LIU; MCMAHON, 2014)

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Contextualização

A Toxicologia é focada no estudo das substâncias e exposições que causam efeitos adversos em organismos vivos. Uma parte vital desses estudos é a caracterização desses efeitos nos organismos (órgãos, tecidos, células e sistemas moleculares intracelulares). Dessa forma, os estudos de toxicologia medem os efeitos de um agente tóxico sobre a saúde de um organismo, seu corpo e peso de órgãos, a histopatologia microscópica, a viabilidade celular, a necrose e a apoptose (WATERS; FOSTEL, 2004).

Em geral, o tóxico é liberado para o alvo, reage com o mesmo, e a disfunção celular resultante manifesta-se em toxicidade. Algumas vezes, o xenobiótico não reage com a molécula-alvo específica, mas influencia de maneira adversa no ambiente biológico, causando disfunção nas moléculas, nos órgãos, nas organelas e células produzindo efeitos deletérios. A mais complexa via para a toxicidade envolve algumas fases (Figura 1). Primeiramente, o tóxico é liberado para o órgão-alvo ou alvos (etapa 1), interagindo com moléculas-alvo endógenas (etapa 2a) ou alterando o ambiente (etapa 2b), desencadeando perturbações na função e/ou na estrutura celular (etapa 3) as quais iniciam-se os mecanismos de reparo em nível molecular, celular e tecidual (etapa 4). Quando as perturbações induzidas pelo tóxico excedem a capacidade reparadora ou quando o reparo não funciona, a toxicidade ocorre (WATKINS, 2009).

Portanto, os primeiros sinais de toxicidade que se seguem à exposição a um xenobiótico podem ser identificados através de estudos em nível molecular. Esses estudos auxiliam na compreensão das vias de toxicidade e permitem um melhor entendimento dos mecanismos de ação dos compostos químicos.

Figura 1 – Estágios da toxicidade após exposição ao composto químico.



Fonte: WATKINS, C. D. K. J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange).** McGraw Hill Brasil, 2009. ISBN 9788580551327.

O desenvolvimento de novas drogas pode ser melhorado significativamente com a aplicação de biomarcadores de toxicidade, tanto na descoberta quanto nas etapas de avaliação de segurança pré-clínicos e clínicos. O processo de descoberta de um novo fármaco é beneficiado tanto com o uso de biomarcadores em modelos animais quanto durante a triagem de toxicidade em células.

Prever a toxicidade é uma das principais barreiras para trazer uma droga para o mercado. Aproximadamente 92% de todos os compostos desenvolvidos falham por causa de efeitos adversos durante o desenvolvimento clínico. Na última década, muitos projetos internacionais foram estabelecidos para examinar a capacidade das tecnologias 'Ômicas' para melhorar a avaliação da segurança desses compostos químicos e para descobrir novos biomarcadores mais precoces aos efeitos adversos para o estudo de hepato-, neuro-, cardio- e nefrotoxicidade (FUCHS; HEWITT, 2011).

2.2. Desenvolvimento de fármacos e órgãos regulamentadores

Normalmente, roedores são utilizados para identificar substâncias tóxicas como carcinógenos, toxinas reprodutivas e neurotoxinas. Porém, os estudos toxicológicos exigem grande número de animais para permitir conclusões significativas. Ensaio de carcinogenicidade, por exemplo, dependendo da duração prevista da exposição do fármaco na população, podem durar até dois anos para determinar o potencial carcinogênico em animais e riscos relevantes nos seres humanos. Consequentemente, os testes toxicológicos atuais possuem custos elevados em termos de tempo, trabalho, síntese dos compostos e animais utilizados (CHEN et al., 2012; SUTER; BABISS; WHEELDON, 2004)

A exigência da realização de testes pré-clínicos deve-se ao fato de que um produto potencialmente terapêutico deve ser intensamente avaliado, antes de ser submetido às pesquisas clínicas, conforme Declaração de Helsinque - 1964 (SPINDLER; SJOBERG; KNUDSEN, 2000). Para regulamentação de um novo produto, são normalmente requeridos testes de toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (LIEBSCH; SPIELMANN, 2002)

Para fins de regulamentação, esses testes com animais seguem protocolos preestabelecidos por órgãos oficiais (ex.: a *Organization for Economic Cooperation*

and Development – OECD). Essas organizações internacionais determinam um acordo sobre as diretrizes para análise de produtos químicos e regulação dos métodos alternativos nos blocos econômicos. No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação dessas normas é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mas como um país observador da OECD, adota-se os métodos preconizados, também conhecidos como *guidelines* (ANVISA, 2015).

No fim da década de 50, o livro “Princípios da Técnica Experimental Humana” de Russel e Burch lançou pela primeira vez a idéia dos 3Rs: *Reduction*, *Replacement* e *Refinement* (Redução, Substituição e Refinamento) para guiar uma utilização mais parcimoniosa de animais na experimentação. A Redução apresenta a idéia de usar sempre o menor número de animais possível para o objeto de investigação. A Substituição se remete ao uso de modelos alternativos de investigação. Por fim, o Refinamento traz o aperfeiçoamento de todos os processos envolvidos na experimentação visando, no fim, a redução do uso de animais ou redução do seu sofrimento (RUSSELL AND BURCH, 1959 *apud* KANDAROVA; LETASIOVA, 2011).

A filosofia dos 3Rs não só impulsionou o início de um processo regulatório em todo o mundo como levou muitos setores da sociedade, academia e governo a desenvolver métodos potenciais para a redução do uso de animais em pesquisa em todo o mundo.

Em 1989, foi criado, na Alemanha, o *National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments* (ZEBET). Em 1991, é criado o *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM), com objetivo de desenvolver e coordenar a validação de métodos alternativos ao uso de animais na Comunidade Européia. Em 1997, as agências governamentais dos Estados Unidos formaram o *Interagency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM). Ele é composto por 15 agências regulatórias e de pesquisa, dentre as quais estão a *Environmental Protection Agency* (EPA), a *Food and Drug Administration* (FDA) e a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (ATSDR), sendo que essas fornecem ou utilizam informações dos testes

toxicológicos para o processo de avaliação do risco. Da mesma forma, outros países estabeleceram centros de validação. Em 2005, o governo japonês criou o *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods* (JaCVAM). De forma similar, a regulamentação de químicos (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals - REACH) da Comunidade Europeia, em vigor desde 2007, evita os testes em animais e prefere os testes alternativos *in vitro* (OGA; DE ALMEIDA CAMARGO; DE OLIVEIRA BATISTUZZO, 2008).

No Brasil, em 2008, foi aprovada a lei “Arouca” (lei 11794/2008) proposta em 1995 pelo deputado e médico sanitaria Sérgio Arouca. Entre outros pontos, a lei estabelece a criação do Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA), composto por pessoas vinculadas a entidades que defendem os diversos aspectos relevantes à experimentação animal sendo o órgão máximo de definição e fiscalização das diretrizes éticas em experimentação animal no país. Além disso, o CONCEA lança mão de entidades locais, as Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA). Os CEUAs julgam e aprovam projetos de pesquisa das universidades e outras instituições, de acordo com as diretrizes postuladas pelo CONCEA. Os CEUAs também têm uma composição diversificada (pesquisadores, leigos, religiosos, etc.) no intuito de, mais uma vez, dar ao julgamento dos projetos uma perspectiva externa à acadêmica, muitas vezes enviesadas pela grande pressão científica (MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009).

Mesmo com essa regulamentação, os movimentos de proteção animal sustentam que não se pode justificar eticamente o uso de animais vivos em experimentos dolorosos e letais. Favoráveis à abolição do uso do modelo animal para a pesquisa, em 2013 representantes desses movimentos invadiram a sede do Instituto Royal, em São Roque/SP, acusando a empresa de maus-tratos a cães utilizados no laboratório (ALVES, 2013).

Contudo, além da questão ética, os animais falham em predizer a toxicidade em humanos. Deve-se analisar os dados negativos com cuidado, pois a ausência de um efeito não é evidência de que esse efeito realmente não exista. Algumas vezes, um risco pode se disfarçar pelas próprias reações *in vivo*, por exemplo, um metabolismo

de proteção que ocorra no animal, mas não ocorra nos seres humanos. Usa-se um pequeno grupo de animais levando a uma análise estatística fraca. E a sensibilidade e a especificidade dos testes, para deduzir a capacidade que eles têm de predizer um efeito não são conhecidas (HARTUNG, 2011; WANDALL; HANSSON; RUDEN, 2007).

Diante desse cenário, as empresas farmacêuticas estão investindo fortemente na triagem de métodos que lhes permitam identificar eventuais problemas numa fase precoce, a fim de minimizar ou eliminar os problemas de toxicidade e evitar custos, tanto em termos de dólares, quanto na reputação da retirada de uma droga das prateleiras.

Estima-se que 20% das novas drogas têm reações adversas que não se tornam aparentes antes que a droga seja colocada no mercado (LASSER et al., 2002; THEODOSIOU; AMIR-ASLANI; MEGARBANE, 2014), o que indica que existe uma necessidade de um melhor rastreio de toxicidade durante o processo de descoberta e desenvolvimento de drogas.

Os testes *in vitro* oferecem vantagens, incluindo condições de teste controladas; nível elevado de padronização; redução na variabilidade entre experimentos; baixo custo nos testes; pequena quantidade de material necessário; quantidade limitada de resíduos tóxicos, células e tecidos humanos utilizados; e menos testes em animais. Outra grande vantagem é a disponibilidade atual de uma variedade de linhagens em bancos de células, o que possibilita maior acesso e utilização de modelos *in vitro*, sendo uma alternativa para avaliações de toxicidade de muitas substâncias químicas (ARAUJO, 2014).

Porém, as limitações do modelo *in vitro* levantaram algumas questões discutidas por Kandárová e Letasiová em 2011. As questões incluem como as interações entre órgãos e tecidos poderiam ser testadas, como efeitos sistêmicos e farmacocinéticos poderiam ser avaliados, como os efeitos crônicos poderiam ser demonstrados. Além disso, as mesmas também levam em consideração limitações da técnica, como, solubilidade e reação aos plásticos.

O cultivo celular é o método *in vitro* mais largamente empregado em Farmacologia e Toxicologia. São utilizados em primeiro lugar para fins de rastreio e em estudos de mecanismos como mostra a Figura 2 (SPIELMANN et al., 2008). Mas isso não quer dizer que sejam modelos isentos de falhas e que o modelo animal, tão largamente empregado, poderia ser totalmente substituído pelo modelo *in vitro*.

Figura 2- O papel dos estudos *in vitro* em Toxicologia.



Modificado de **Fonte:** SPIELMANN, H. et al. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Exp Toxicol Pathol**, v. 60, n. 2-3, p. 225-33, Jun 2008.

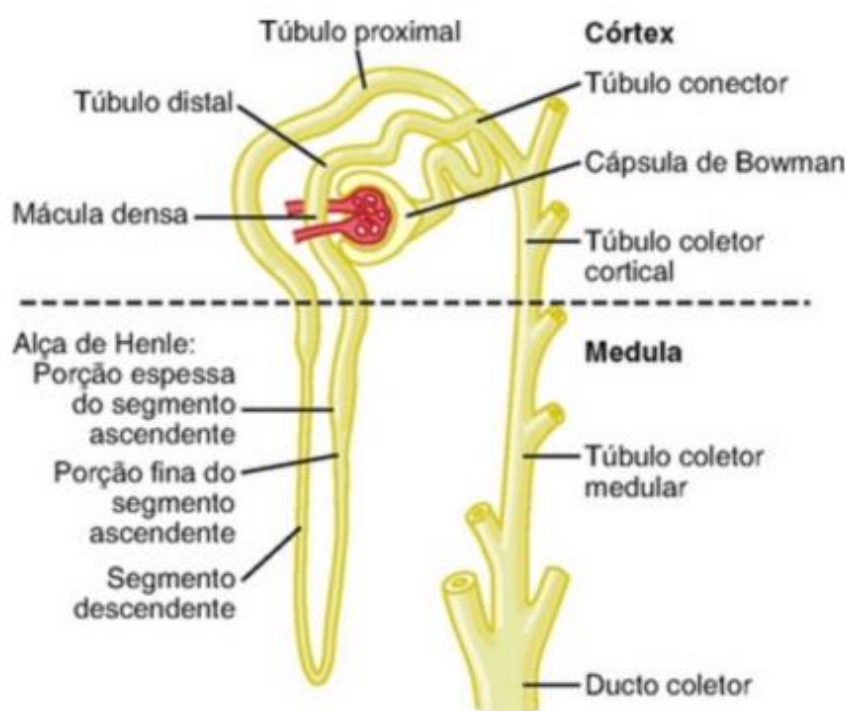
Na indústria, os compostos são inicialmente testados *in vitro* a fim de impedir os fracos candidatos a fármacos de progredir para ensaios *in vivo*, que são mais caros e demorados. Os ensaios *in vitro* são baseados em linhas celulares primárias, linhagens de células imortalizadas, linhagens de células cancerígenas e linhagens de células-tronco. Seja qual for a linhagem escolhida, o importante é ter um sistema que seja representativo e que imite adequadamente os mecanismos desencadeados nos testes *in vivo* após a exposição a um composto tóxico (THEODOSIOU et al., 2014).

2.3. Função Renal

Os rins podem ser considerados um dos principais alvos para agentes xenobióticos tóxicos devido ao seu papel na filtragem dos fluidos corporais e homeostase de eletrólitos (WILMES et al., 2011)

Cada rim contém cerca de um milhão de néfrons, unidade funcional do rim, capaz de formar a urina. Cada néfron é constituído pelo glomérulo envolvido pela cápsula de Bowman e por uma porção tubular (proximal, distal e coletora). O rim não possui a capacidade de regenerar novos néfrons, portanto, na ocorrência de lesão renal, doença, ou o envelhecimento normal, há uma redução gradual no número de néfrons (HALL; GUYTON, 2011). O filtrado glomerular que alcança os túbulos do néfron flui através do túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e canal coletor, até atingir a pelve renal (Figura 3).

Figura 3: Segmentos tubulares básicos do néfron.



Fonte: HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton E Hall Tratado De Fisiologia Médica.** Elsevier Health Sciences Brazil, 2011. ISBN 9788535254785.

A alta taxa de perfusão sanguínea e a capacidade de metabolizar, concentrar, extrair e secretar compostos tóxicos tornam os néfrons extremamente vulneráveis a uma larga variedade de toxinas. A indução da nefrotoxicidade pelos xenobióticos é a maior causa de falência renal aguda e crônica e representam um significativo desafio para as indústrias farmacêuticas (WILMES et al., 2011)

Embora cada uma de suas porções tenha sido citada anteriormente, existem diferenças morfofisiológicas, dependendo de quão profundamente cada componente do nefrón encontra-se dentro da massa renal. O túbulo proximal é responsável pela reabsorção de 65% da quantidade de água filtrada nos capilares glomerulares, sendo o restante reabsorvido na alça de Henle e no túbulo distal. A glicose e os aminoácidos são quase inteiramente reabsorvidos com a água nessa região (SOUZA; ELIAS, 2006).

Após passar pelo túbulo proximal, o líquido tubular segue pela alça de Henle. A mesma é dividida em três porções, sendo elas o segmento descendente fino, segmento ascendente fino e segmento ascendente espesso. O segmento descendente fino é altamente permeável a água, que é então reabsorvida. Já os segmentos ascendentes são praticamente impermeáveis a água. No segmento ascendente espesso ocorre a reabsorção ativa de diversos íons, como Na^+ , K^+ e Cl^- (BARRETT et al., 2014). No túbulo distal a maioria dos íons é avidamente reabsorvida, mas suas células são praticamente impermeáveis a água e a ureia. Também é no néfron distal que ocorre o processo de regulação fina na formação da urina final, ajustando as necessidades orgânicas de volemia e osmolaridade por ação conjunta de dois hormônios: hormônio antidiurético (ADH) e Aldosterona. O túbulo distal final e túbulo coletor cortical possuem funções similares, sendo reabsorção de íons Na^+ , secreção de íons K^+ e H^+ e impermeabilidade a ureia. O ducto coletor medular realiza baixa reabsorção de água e sódio, sendo o local final para o processamento da urina (HALL; GUYTON, 2011).

Segundo Fuchs e Hewitt, entre 30% e 50% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva apresentam quadro de IRA após ensaios clínicos devido à nefrotoxicidade, enquanto apenas 7% dos novos candidatos a fármacos falham durante os ensaios pré-clínicos.

Dessa forma, considerando-se que os danos renais podem ser uma ameaça para todo o organismo, é evidente que os testes de nefrotoxicidade são um passo essencial para o desenvolvimento de novas drogas. Nesse contexto, métodos alternativos como os testes de toxicidade *in vitro*, têm sido amplamente utilizados para melhor elucidar os mecanismos de ação e efeitos tóxicos de drogas para avaliação de eficácia e segurança no homem a partir da exposição aos xenobióticos, podendo, ainda, classificá-los de acordo com sua capacidade tóxica.

Diversas linhagens celulares, correspondentes a diferentes trechos do nefron, já foram validadas internacionalmente e vêm sendo utilizadas para esse fim, sendo as linhagens celulares LLC-PK1 e MDCK.2 as selecionadas para esse estudo.

A linhagem LLC-PK1 é uma linhagem de células de rim de porco que possui características do túbulo proximal (como sistemas de transporte dependente de Na⁺, enzimas localizadas na membrana apical incluindo fosfatase alcalina e glutamyltranspeptidase) sendo, portanto, uma ferramenta de relevância para examinar funções do túbulo proximal (KAKIASHVILI et al., 2011; RAMSEYER; GARVIN, 2013). Além disso, é um modelo de células do túbulo proximal já descrito anteriormente em estudo de toxicidade causada pela Gentamicina (SERVAIS et al., 2006), e apoptose e necrose ocasionadas pela Ciclosporina (NASCIMENTO et al., 2005) e Anfotericina B (YANO et al., 2009).

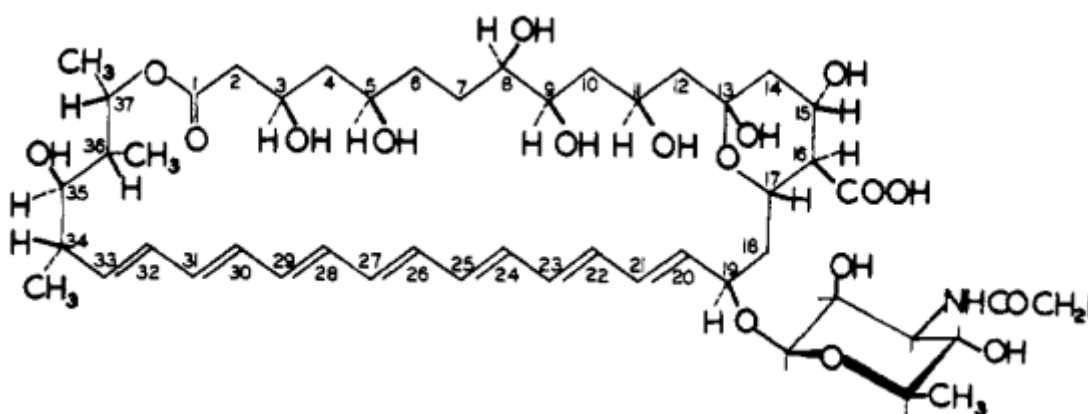
Já as células MDCK.2 também são empregadas em estudos de nefrotoxicidade (KAKIASHVILI et al., 2011; SHIN et al., 2010; SZASZI et al., 2005; VAN DER HARST et al., 2005). É um sistema bem definido de cultura celular que mantém a polaridade morfológica característica das células epiteliais dos túbulos distais e, quando em monocamadas, apresenta uma superfície apical que fica em contato com o meio de cultura e uma superfície basolateral que fica em contato com a superfície em que as células se aderem. Portanto, possuem a capacidade para o transporte de íons transepitelial. Como células renais tubulares distais típicas, as células MDCK.2 retêm respostas apropriadas a hormônios, assim como a sistemas de transporte, como a bomba Na⁺ K⁺ ATPase (MATLHAGELA; TAUB, 2006).

2.4. Anfotericina B e nefrotoxicidade

Dentre os fármacos amplamente empregados na prática clínica, destaca-se a Anfotericina B (AmB). É um antibiótico natural da classe dos macrocíclicos polienos, que foi isolado pela primeira vez em meados da década de 1950, produzido a partir de uma cultura de fermentação de *Streptomyces nodosus*. Foi introduzido no mercado na década de 60 como um medicamento antifúngico com amplo espectro de atividade contra micoses sistêmicas e relativamente poucos exemplos de resistência micológica contra a droga. (LANIADO-LABORIN; CABRALES-VARGAS, 2009)

Composto por 37 átomos de carbono formando um anel macrocíclico fechado por lactonização possui uma cadeia de duplas ligações conjugadas não substituídas (heptaeno) e, na porção oposta, uma cadeia poli-hidroxilada com sete grupos hidroxila livres, o que lhe confere característica anfipática. Em uma das extremidades da molécula, encontra-se um resíduo micosamina (lactona) com um aminogruppo livre, formando uma cadeia lateral. A Figura 4 ilustra a estrutura molecular e configuração da AmB tal como relatada por Ganis e colaboradores em 1971 (GANIS et al., 1971).

Figura 4: Estrutura Química da Anfotericina B.



Fonte: GANIS, P. et al. Polyene macrolide antibiotic Amphoterin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. *J Am Chem Soc*, v. 93, n. 18, p. 4560-4, Sep 8 1971.

Seu mecanismo de ação contra agentes patogênicos relaciona-se à sua estrutura química. A molécula de AmB tem a capacidade de se ligar às moléculas de ergosterol, componente fundamental da membrana plasmática de fungos, e gerar poros na membrana do parasito por meio dessa ligação, levando ao desequilíbrio hídrico e eletrolítico da célula (MOHAMED-AHMED; BROCCCHINI; CROFT, 2012).

Apesar de sua monitorização cuidadosa, o tratamento dessas infecções oferecem riscos e frequentemente não podem ser concluídos por causa dos efeitos secundários renais graves induzidos pela administração da AmB.

O mecanismo de toxicidade renal da AmB é resultado da vasoconstrição das arteríolas aferentes e a ativação do sistema de *feedback* tubuloglomerular, que induzem a redução do fluxo sanguíneo renal, diminuição da taxa de filtração glomerular e aumento dos níveis séricos de uréia e creatinina. A hipoxia e isquemia em células endoteliais e células epiteliais dos túbulos leva a um aumento dos mediadores inflamatórios e geração de espécies reativas de oxigênio (SCHLOTTFELDT et al., 2015).

A etiologia da nefrotoxicidade da AmB ainda precisa ser esclarecida. No entanto, a vasoconstrição e a ação tóxica direta da AmB em células epiteliais tubulares renais têm sido postuladas como sendo uma das principais causas de sua nefrotoxicidade.

Além disso, agentes nefrotóxicos podem causar apoptose e/ou necrose. Em contraste com a necrose, a qual está associada com danos irreversíveis, a apoptose é uma forma de morte celular fisiológica com características bioquímicas distintas. As células apoptóticas são removidas por macrófagos, e não há perda permanente da função do tecido afetado, ao passo que a necrose gera uma resposta inflamatória que resulta na perda da função do tecido (VARLAM et al., 2001).

Varlam e colaboradores em 2001, relataram que AmB provoca a apoptose dependente da dose em linhagens de LLC-PK1 e células intersticiais medulares *in vitro*, ao mesmo tempo que induz apoptose em células epiteliais tubulares renais *in vivo* também de maneira dose-dependente. Em outro estudo, conduzido por Yano e

colaboradores em 2009, foi demonstrado que AmB é capaz de causar necrose em LLC-PK1 através do influxo de íons que se dá através dos poros formados pela associação da AmB com o colesterol de membrana e pela despolarização das membranas mitocondriais também após a exposição a AmB .

Dessa forma, o uso de linhagens celulares em estudos de nefrototoxicidade e das vias envolvidas nesses processos têm se tornado interessante porque permite a análise de fenômenos de maneira uniforme. Portanto, para criar novas maneiras de mitigar os efeitos lesivos de fármacos é necessária, primeiramente, a elucidação dos mecanismos pelos quais essas moléculas atuam. Apesar de extensa pesquisa, ainda não foram desvendados todos os mecanismos pelos quais se dá a nefrotoxicidade da Anfotericina B.

2.5. Biomarcadores e toxicogenômica

Na busca pela validação de novos testes que possam contribuir na melhoria do valor preditivo da toxicologia, surgem os biomarcadores, não só apenas apontando indicadores de dano celular utilizados na avaliação de compostos nas fases iniciais de desenvolvimento, mas também melhorando a seleção de candidatos à fase clínica (BERNAUER et al., 2005; EISENBRAND et al., 2002). Porém, os biomarcadores tradicionais como ureia no sangue e creatinina urinária possuem limitações para avaliações toxicológicas. Em primeiro lugar, não são órgão-específico e, em segundo, são considerados biomarcadores tardios, ou seja, mudanças significativas possivelmente não irão ocorrer em seus valores até que haja um dano tecidual de 30-50% (THUKRAL et al., 2005).

Portanto, existe a necessidade de se desenvolver biomarcadores que forneçam medições, tanto qualitativas como quantitativas, dando uma indicação do local inicial do dano renal antes da ocorrência da deterioração grave da função do órgão. Nesse contexto, surge, então, a toxicogenômica, uma tecnologia emergente, que utiliza métodos genômicos na avaliação da toxicidade baseando-se no fato de que os efeitos toxicológicos mais relevantes de um composto afetam diretamente ou

indiretamente a expressão gênica de um organismo prevendo compostos como tóxicos em um estágio precoce (FABIAN et al., 2011).

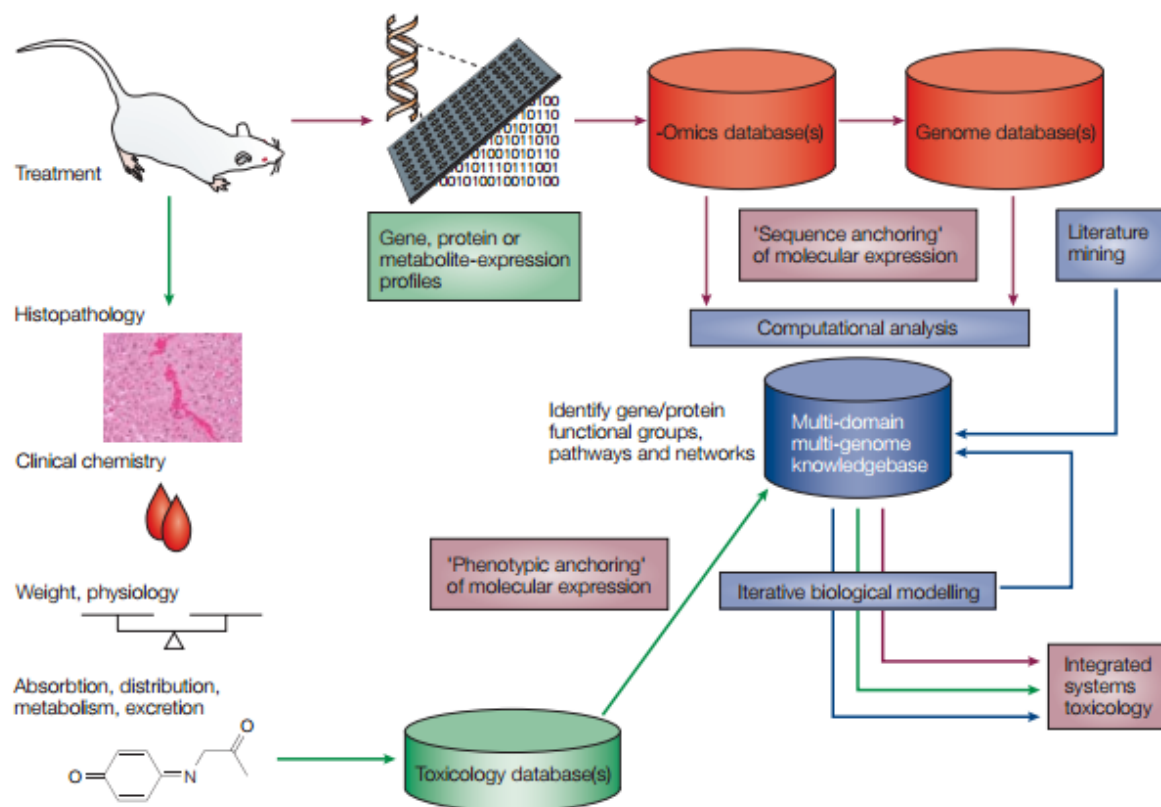
A Toxicogenômica possui três principais objetivos: compreender a relação entre estresse ambiental e susceptibilidade à doença humana; identificar biomarcadores úteis de doenças e exposição a substâncias tóxicas; e elucidar os mecanismos moleculares de toxicidade. A compilação desses dados experimentais, juntamente com ferramentas da bioinformática e modelagem computacional, serão importantes para uma nova compreensão de doenças relacionadas com as substâncias tóxicas (WATERS; FOSTEL, 2004).

Alguns autores definem a toxicogenômica como a integração da genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, com ferramentas clássicas da toxicologia (histopatologia, exames bioquímicos, peso e fisiologia do animal). Sendo assim, essa ciência combinaria não só estudos de expressão de genes com a toxicologia clássica, mas também estudos da formação protéica e metabólica nos organismos expostos a agentes toxicantes (GOMASE; TAGORE, 2008; SYCHEVA; ZHURKOV; RAKHMANIN IU, 2013). A figura 5 indica os caminhos a partir da observação inicial do animal tratado (rato) para uma base de conhecimento integrado na toxicogenômica (cilindro azul), e, assim, da toxicologia de sistemas (canto inferior direito). O fluxo de dados '-ômicos' é mostrado pelo caminho no sentido horário a partir do rato para a base de conhecimento (knowledgebase); e a abordagem "tradicional" da toxicologia é mostrada no caminho anti-horário. A base de conhecimento irá integrar ambos os fluxos de dados, juntamente com o conhecimento baseado na literatura; e em virtude de modelagem iterativa, levará a uma compreensão melhor da Toxicologia de Sistemas.

O termo toxicogenômica foi utilizado pela primeira vez em 1999 por Nuwaysir *et al.* em um de seus estudos para descrever o uso de *microarrays* na avaliação da expressão gênica em condições de toxicidade (WATERS; FOSTEL, 2004). Utilizando-se de microarranjos é possível analisar centenas ou milhares de genes ao mesmo tempo, permitindo a avaliação de alterações no perfil de expressão gênica induzidas por diversos compostos. No entanto, a grande quantidade de informação

obtida torna a interpretação e integração dos dados um grande desafio (CHEN et al., 2012). Portanto, torna-se interessante a avaliação de um menor número de genes com potencial para utilização como biomarcadores.

Figura 5: Esquema para compreensão da Toxicologia de Sistemas



Fonte: WATERS, M. D.; FOSTEL, J. M. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. *Nat Rev Genet*, v. 5, n. 12, p. 936-48, Dec 2004.

Depois de uma lista de genes compilados e anotados, é usual selecionar um subconjunto destes genes para validar alterações na sua expressão independentemente. O RT-PCR (*quantitative Real Time-Polimerase Chain Reaction*) é especialmente útil nesta função (GUERREIRO et al., 2003). O RT-PCR determina com alta sensibilidade mudanças na expressão gênica e tem sido utilizado como “padrão ouro”. A classificação de xenobióticos com ação nefrotóxica, com base em seus perfis de expressão gênica, até hoje tem se apresentado comumente na literatura, fazendo uso de DNA-complementar (cDNA) e RT-PCR, especialmente em animais (KONDO et al., 2012; VAIDYA et al., 2010; WANG et al., 2008).

Embora a técnica de RT-PCR seja descrita como padrão-ouro, não poder ser considerada um ensaio padrão. Os problemas significativos causados pela variabilidade nos modelos, delineamentos e protocolos, bem como normalização inadequada e análises inconsistentes são bem conhecidos, mas normalmente ignorados (NOLAN; HANDS; BUSTIN, 2006)

2.6. Outras tecnologias

Nossa compreensão dos mecanismos toxicológicos ainda é incompleta e uma grande variedade de abordagens deve ser utilizada a fim de obter uma visão geral em se tratando de problemas de toxicidade. Como consequência, matrizes de métodos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* são frequentemente utilizadas a fim prever os mecanismos de toxicidade auxiliando no desenvolvimento de medicamentos (THEODOSIOU et al., 2014).

Os métodos *in silico* são utilizados para determinar a compatibilidade de substâncias com base na sua estrutura química. Substâncias com estruturas químicas semelhantes muitas vezes possuem propriedades similares. Nesses casos, portanto, o conhecimento das propriedades de algumas substâncias representativas é suficiente para ser capaz de deduzir as propriedades de uma série de substâncias similares. Por analogia, certas propriedades dessas substâncias representativas podem ser assumidas como sendo propriedades das outras substâncias subsequentes. O impacto dessa abordagem é claramente visto na possibilidade de reduzir significativamente o número de animais de experimentação pela redução do número de substâncias-teste. Com o uso de ferramentas como o *Quantitative Structure-Activity Relationship* (QSAR), por exemplo, é possível descobrir quais são as propriedades de determinados compostos químicos e seus respectivos efeitos (OGA DE ALMEIDA CAMARGO; DE OLIVEIRA BATISTUZZO, 2014).

Portanto, os dados de toxicogenômica derivados de estudos *in vivo* também devem ser considerados, pois ajudam a identificar os “*endpoints*” mais relevantes (ou seja, os percursos e processos perturbados por uma substância química) para identificação de riscos; e fornecem dados mecanísticos para apoiar o

desenvolvimento de um modo de ação mais detalhado (MOFFAT et al., 2015). Embora a experimentação animal seja um passo fundamental para prever a toxicidade, não há como negar que modelos animais nem sempre são os melhores preditores para a toxicidade humana.

Dessa forma, até que a base de conhecimento em toxicologia seja bem estabelecida, deve ser aceito que os dados toxicogenômicos irão fornecer um ponto de partida para futuras investigações, mas não necessariamente dar respostas definitivas. O desenvolvimento e aplicação da toxicogenômica serão facilitados pela colaboração sobre questões técnicas, como as comparações de plataformas, análise de dados de bioinformática e de ampla cobertura de modelos experimentais. Modelos variados podem ser combinados com os dados de estudos em animais e seres humanos não só para descobrir os determinantes genéticos de suscetibilidade à xenobióticos, mas também entender as bases moleculares de toxicidade.

3. OBJETIVOS

3.1.Objetivo geral

Validar métodos alternativos *in vitro* nas linhagens LLC-PK1 e MDCK.2 para avaliação da nefrotoxicidade medicamentosa causada pela Anfotericina B.

3.2.Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito citotóxico da Anfotericina B nas linhagens celulares LLC-PK-1 e MDCK.2 através da técnica de MTT;
- ✓ Analisar a expressão de genes responsivos à condição de nefrotoxicidade através da técnica de RT-PCR;
- ✓ Identificar potenciais biomarcadores precoces *in vitro*.

4. ARTIGO

NOTA EXPLICATIVA

Seguindo as orientações do programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, a dissertação de mestrado deve conter um artigo técnico-científico a ser submetido em revista indexada no formato e com as normas a serem submetidas.

Artigo a ser submetido para publicação na revista *Toxicology in vitro* (fator de impacto: 2014 2.903) intitulado:

“IN VITRO STUDY OF POTENTIAL NEPHROTOXICITY BIOMARKERS THROUGH GENE EXPRESSION USING AMPHOTERICIN B.”

NORMAS

(<https://www.elsevier.com/journals/toxicology-in-vitro/0887-2333/guide-for-authors#20100>)

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

IN VITRO STUDY OF POTENTIAL NEPHROTOXICITY BIOMARKERS THROUGH GENE EXPRESSION USING AMPHOTERICIN B.

Grossi, M.F.^a; Campos, M. A. A. ^a; Soares, S.^a; Silva, S.C.T.^a; Nunes, M.S.^a; Almeida, L. A.^b; Tagliati, C.A.^a

^aToxicology *in vitro* Laboratory, Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy - Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

^bImmunology Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biomedical Sciences- Federal University of Alfenas, Alfenas, Brazil.

ABSTRACT

Amphotericin B (AmB), a polyene macrolide antibiotic, is one of the most effective antifungal drug for the treatment of systemical fungal infection. However its use is often limited by the occurrence of adverse events, especially nephrotoxicity. Drug-induced nephrotoxicity is one of the many frequently observed effects in long-term pharmacotherapy. Such situations have been tardily discovered because of existing methods to determine its toxicity. The present study was designed to propose *in vitro* alternative methods for early identification of AmB cell toxicity. Therefore, we exposed two different renal cell lines, LLC-PK1 (proximal tubule) and MDCK.2 (distal tubule), to nine different concentrations (2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 and 30 µg/mL) of AmB during 24 hours. Gene tests were carried out according to results from MTT assay. A panel of sensitive and specific nephrotoxic genes was selected based on earlier *in vitro* and *in vivo* studies. The search for sequences of mRNAs encoding proteins that had been previously associated with kidney damage was conducted in the databases of the *National Center for Biotechnology Information - NCBI* (USA). RNA was extracted from the cells, and RT-PCR was performed to evaluate differential gene expression profiles of the selected genes. The genes with the highest fold change include *HAVCR1 (KIM1)*, *CASP3*, *ANXA5*, and *VDAC1*.

KEY WORDS: Alternative methods; Biomarkers; Nephrotoxicity; Gene expression; LLC-PK1; MDCK.2.

INTRODUCTION

Amphotericin B (AmB) is a polyene antifungal agent that has been used as gold standard for treating many serious systemic fungal infections for more than 40 years. However, this drug's mechanism of action can lead to toxic effects, particularly nephrotoxicity, which is the main effect observed in clinical practice.(FRANCA et al., 2014; HARMSSEN et al., 2011)

Nephrotoxicity is one of the most frequent observed after the long-term use of medicine because of the fact of the methods for determining toxicity, using animal models, have failed in their core aims. There is a need to constantly improve safety testing strategies. So, the validation of sensitive, alternative methods for the early identification of toxic effects is as important as restrictions on the use of animals.(TAGLIATI et al., 2012)

Several renal epithelial cell lines have been employed as alternative methods for the study of nephrotoxicity caused by therapeutic products.(PRICE; SAFIRSTEIN; MEGYESI, 2004; TIONG et al., 2014; VARLAM et al., 2001)

The Madin-Darby canine kidney (MDCK.2), cell line is derived from the kidney distal tubule of a normal cocker spaniel in 1958, is one of the best-characterized and most widely used epithelial cell lines.(BALKOVETZ et al., 2004) The porcine kidney proximal tubular cells (LLC-PK1), have most frequently been used in studies of toxicity caused by compounds in proximal tubule.(SERVAIS et al., 2006) Both cell lines are considered acceptable models to study nephrotoxicity of drugs and validate alternative methods.(DENAMUR et al., 2008; SERVAIS et al., 2008; YANO et al., 2009)

Recently, several urinary biomarker candidates for assessment of acute kidney toxicity were approved by the Food and Drug Administration (FDA) and the European Medicines Agency (EMA).(SOHN et al., 2013)

The identification and evaluation of new and early biomarkers of target organ toxicity are among the main applications of genomic technologies. Thus, the genomic biomarkers become useful markers for histopathological damage and may contribute to the assessment of toxicity both *in vitro* and *in vivo*.(KUMAR; LIU; MCMAHON, 2014)

MATERIAL AND METHODOS

Drug

Amphotericin B was a courtesy of Cristália (Produtos Químicos Ltda-Itapira, SP, Brazil). A stock solution of 300 µg/mL of Amphotericin B in sterile buffer solution (PBS) was prepared and different volumes were added to the MEM (GIBCO®) to generate nine different concentrations: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 and 30 µg/mL. The choice of concentrations of Amphotericin B were based on previous studies.(FRANCA et al., 2014; VARLAM et al., 2001; WASAN et al., 1994)

Cells culture

The LLC-PK1 and MDCK.2. cell lines were obtained from the Cell Bank at Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). These were cultured in MEM (GIBCO®) supplemented with 4% (v/v) bovine fetal serum (GIBCO®) and 1% (v/v) of antibiotic antimycotic solution stabilized 100x (Sigma–Aldrich, CA, USA). Cells were grown in 75-cm² (Sarstedt, Germany) and incubated at 37 °C in a humidifier with 5% CO₂ (Forma Scientific CO₂ Jacketed Incubator). When the growth of the culture cells reached a confluency level of approximately 80%, these cells were then exposed to different concentrations of Amphotericin B for 24 hours. The time of exposure of Amphotericin B was also based on previous study.¹³

MTT cytotoxicity assay

Cell viability can be assessed using the well-known MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, as first described by Mosmann (1983).(MOSMANN, 1983) The test has been modified several times since then(HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989) and was subjected to laboratory validation at the beginning of this study.

First, cell lines were placed on 96-well plates in a concentration of 5.0×10^3 per well for 4 hours at 37°C. PBS was then added to the control, and Amphotericin B (20 µL/well) was added in the concentrations stipulated for the cell lines (2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20 and 30 µg/mL) and left for 24 hours of exposure. The medium containing the control and the drug was removed and substituted with 200 µL/well of a solution

containing 0.5 mg/mL of MTT in MEM (GIBCO®) and incubated for 1 hour at 37°C. The MTT solution was then removed, 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well, and the absorbance was read at 570nm by a multiwell plate reader (Molecular Devices SPECTRA Max PLUS 384). The results were expressed as a percentage of the viability in treated cells compared with negative control.

RNA isolation and conversion to cDNA

For gene expression analysis, the total RNA was extracted from the cells, using a Trizol reagent (Invitrogen™ - Thermo FisherScientific) according to manufacturer recommendations. The quantity of the purified RNA was evaluated using the Nanovue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Reverse transcription of 1µg from total RNA was performed using illustra™ Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Quantitative Real-time PCR

A panel of 10 genes was selected based on alterations of gene expression found in *in vivo* and *in vitro* studies of nephrotoxicity.(BALKOVETZ et al., 2004; ICHIMURA et al., 2008; KONDO et al., 2012; OZAKI et al., 2010; SERVAIS et al., 2008) *GAPDH* was used as an endogenous reference gene to normalize the expression level of target genes. The LLC-PK1 cells were exposed to drug in concentrations 4, 8 and 12 µg/mL and MDCK.2 were exposed to 2, 4 and 8 µg/mL for 24 hours at 37 °C in humidified 5% CO₂. These concentrations were selected based on the percentage of viability found in MTT assay.

Quantitative Real-Time Polymesase Chain Reaction (RT-PCR) was performed with StepOne™ Systems Real-Time PCR (Applied Biosystems™ - ThermoFisher Scientific), using the template cDNA, SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems™) and the primers as recommended in the manufacturer's protocol. The primers were obtained using *Primer BLAST* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), based on the sequences of selected transcripts. The sizes of the amplified primers were restricted to the range of 100 to 200 nucleotides. The sequences of forward and reverse primers are listed in Table 1. Primer specificities were confirmed by the melting curves that appeared after

applying PCR. The resulting cycle threshold (Ct) value was processed based on the comparative Ct method.

Table 1: Sequences of forward and reverse primers for quantitative real-time PCR

Gene	Descrição do Gene	Acesso	Sequência <i>forward</i>	Sequência <i>reverse</i>
<i>ANXA5</i>	Annexin A5	XM_003129218	GTCGCTATGGCACAGGTTCT	AGGATGCTCTCCTCGTCAGT
<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein	XM_003127290	CCGAACTGATCAGGACCATC	AAGATGGTCACCGTCCAACC
<i>BCL-2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	XM_003121700	CCTTGGATCCAGGAGAACGG	AACCACCCCAGCTAGAGTCA
<i>BCL2L1</i> (<i>BCL-XL</i>)	BCL2-like 1	NM_214285	AGGGCATTCACTGACCTGAC	CCATCCCGGAAGAGTTCGTT
<i>CASP3</i>	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_214131	GACGGACAGTGGGACTGAAG	TGGATGAACCAGGATCCGTC
<i>CASP9</i>	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	XM_003127618	CTGCCAAGCAAATGGTCCAG	CTGTGCCATAAACAGCCCCT
<i>EXOC6</i>	Exocyst complex component 6	XM_003361565	TCGAAAAGCAACCCTTCCCA	AGCTCCGGTGTAGTGACTCT
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	NM_001206359	GAAGGTCGGAGTGAACGGA	GCCAGAGTTAAAAGCAGCCC
<i>HAVCR1</i> (<i>KIM1</i>)	Hepatitis A viruscellular receptor 1	NM_001164736	TTGCTCCAACAACCTGGTGTCT	GCAGCACCTGTATGGACAGT
<i>ICAM-1</i>	Intercellular adhesion molecule-1	NM_213816	ACTTATGTCCTGCCAGCCAC	GTTACAGAAACGGGTGTGC
<i>VDAC1</i>	Voltage-dependent anion channel 1	NM_213960	GCCTGCTTCTCGGCTAAAGT	CACCGGCGTTGACATTCTTG

Statistical Analysis

The comparative threshold cycle method was used to analyze the data according to the equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System and UserBulletin#2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). All data are shown as relative expression units after normalization to *GAPDH*. The differences in the relative expression of the genes and MTT assay were performed using GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, Inc), applying the one-way ANOVA with Tukey post-test. The analysis is considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Cell viability using MTT Assay

In the concentration-response curve tests, according to the method used in this study, the LLC-PK1 and MDCK.2 lines appears to be sensitive to the toxicity of AmB on a concentration-dependent manner (Figure 1). After 24 hours exposure, there was a significant difference ($p < 0.05$) among all concentrations tested compared to control and between all concentrations, except 15, 20 and 30 $\mu\text{g/mL}$ for LLC-PK1 and 12, 15 and 20 $\mu\text{g/mL}$ for MDCK.2.

No significant difference ($p < 0.05$) could be observed among the responses of these cell lines when exposed to AmB at concentrations below 2 $\mu\text{g/mL}$. From these results, we could see that AmB is cytotoxic to both cell lines. We chosed tree concentrations for the study of gene expression: 4, 10 and 30 $\mu\text{g/mL}$ for LLC-PK1 and 2, 4 and 8 $\mu\text{g/mL}$ for MDCK.2 (low, medium and high concentrations)

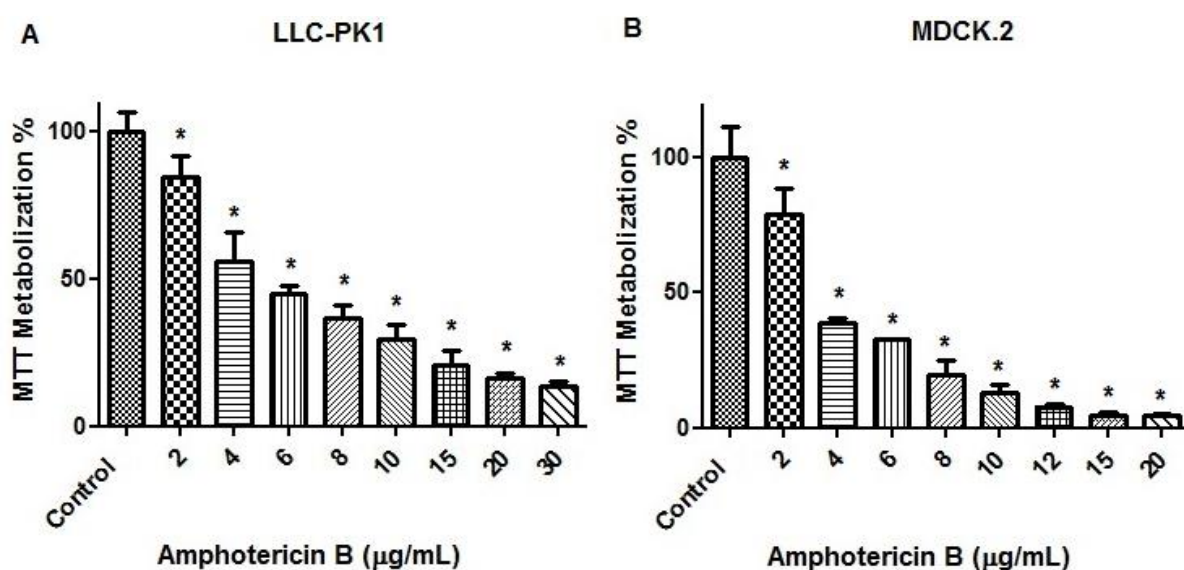


Fig.1 Evaluation of MTT metabolism. A) Concentration-response curve of renal LLC-PK1 cell lines. Cells were exposed to increasing concentrations of AmB for 24 hours. Concentrations are presented in $\mu\text{g/mL}$. B) Concentration-response curve of renal MDCK.2 cell lines. Cells were exposed to increasing concentrations of AmB for 24 hours. Concentrations are presented in $\mu\text{g/mL}$. Trials were performed in sextuplicate from three independent experiments; non treated cells were used as controls, considering 100% cell viability. (* $p < 0.05$ significantly different from the control group).

Gene Expression

The real-time PCR was used to measure the relative level of gene expression in LLC-PK1 and MDCK.2 cells and the changes were represented compared to unexposed cells to AmB (control). Among the genes examined, we observed changes in expression of four of them. Gene expression analysis demonstrated that there were relative increases of *HAVCR1*, *CASP3*, *VDAC1* and *ANXA5* targets, when compared to the expression level of the transcripts of those genes in cells not exposed to the drug. These four cited genes showed statistically significant increase ($p < 0.05$) at 30 $\mu\text{g/mL}$ concentration in LLC-PK1 and 8 $\mu\text{g/mL}$ in MDCK.2 compared with the control. However, despite the decrease in cell viability observed by the MTT reduction method, there was no statistically significant difference in gene expression in concentrations of 4 $\mu\text{g/mL}$ and 10 $\mu\text{g/mL}$ in LLC-PK1 and 2 $\mu\text{g/mL}$ and 4 $\mu\text{g/mL}$ in MDCK.2 compared to the control (Figure 2).

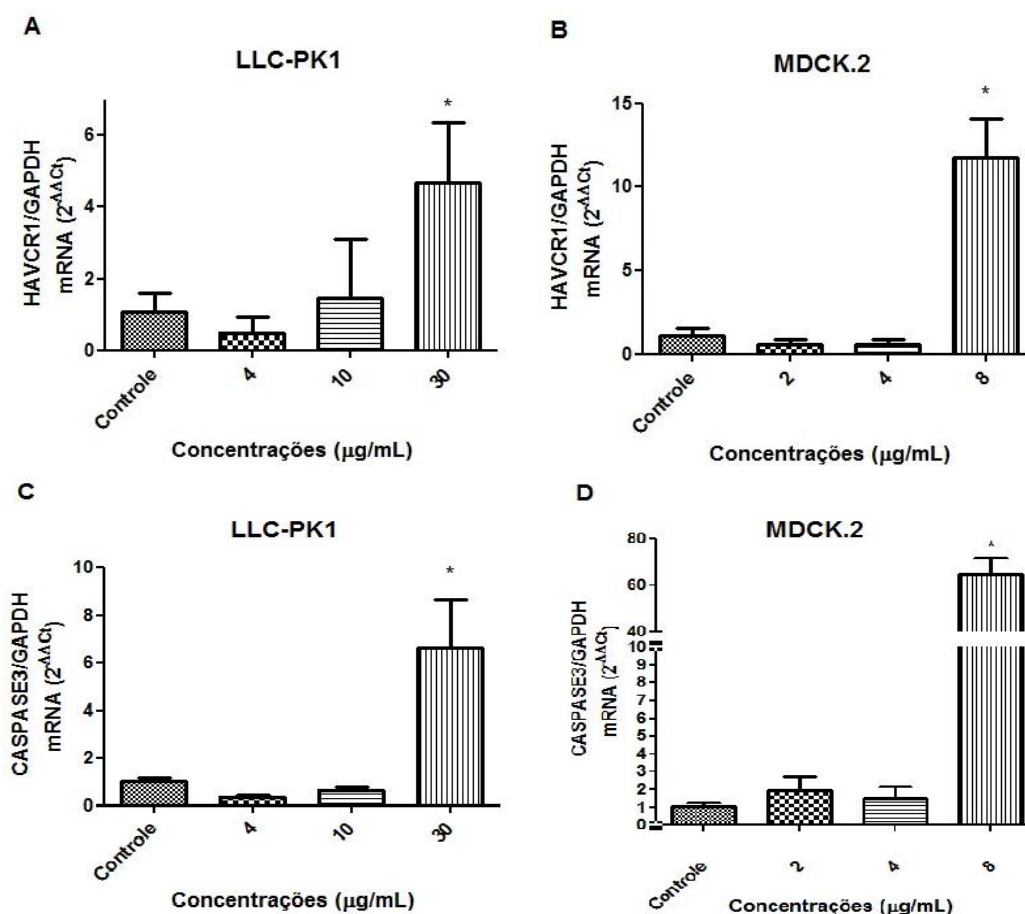


Fig.2a Evaluation of gene expression. AmB induced gene expression in LLC-PK1 and MDCK.2 cells. Expression of genes: *HAVCR1* (A,B), *CASPASE3* (C,D). Assays carried out in triplicate, and (0 $\mu\text{g/mL}$) cells not exposed to drug were used as controls. (* $p < 0.05$ significantly different from the control group).

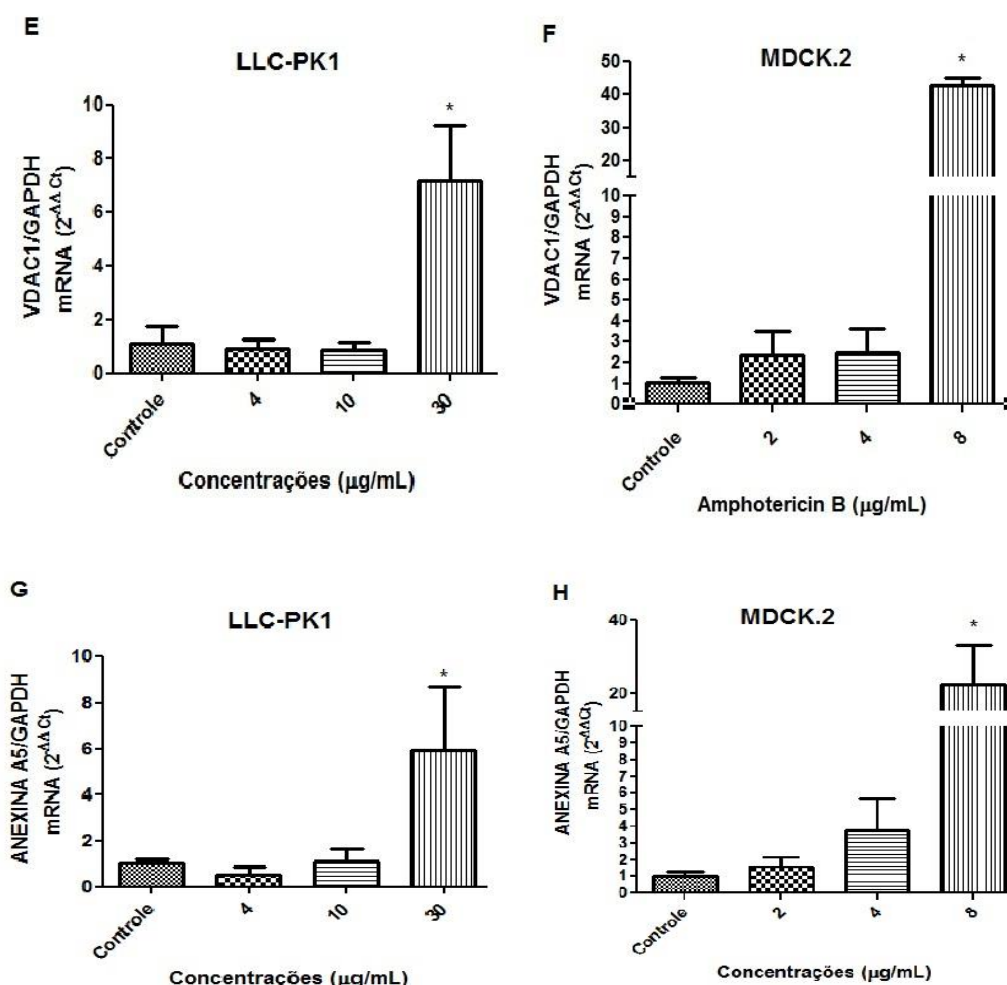


Fig.2b Evaluation of gene expression. AmB induced gene expression in LLC-PK1 and MDCK.2 cells. Expression of genes: *VDAC1*(E,F), and *ANNEXIN V*(G,H). Assays carried out in triplicate, and (0 µg/mL) cells not exposed to drug were used as controls. (*p<0.05 significantly different from the control group).

DISCUSSION

AmB produces renal injury probably by a variety of mechanisms. Most studies suggest that toxicity occurs primarily in the distal tubule of the nephron (CHOUDHURY; AHMED, 2006; LANIADO-LABORIN; CABRALES-VARGAS, 2009; WALEV; BHAKDI, 1996). However, some studies have shown that these effects can also occur in the proximal tubule (FRANCA et al., 2014; KREJCIROVA et al., 2004; VARLAM et al., 2001). In this study, tubular cell lines MDCK.2 (distal tubule) and LLC-PK1 (proximal tubule), two physiologically relevant units of the nephron, were

used to investigate the cytotoxic effects of AmB on kidney. Initially, we used the MTT reduction assay, a quick metabolic test for this evaluation. Our results are in agreement with previous literature since toxic effect was observed in both strains, which was higher in MDCK.2 strain compared to the LLC-PK1 cells, as shown in Figure 1.

Recent studies have shown that the MTT assay can be used in the initial screening phase to establish the drug concentration (FRANCA et al., 2014; TAGLIATI et al., 2012) despite being a test subject to be influenced by a number of external factors, thus, MTT assay should be supplemented with non-metabolic methods (STEPANENKO; DMITRENKO, 2015). Furthermore, there is large discrepancy in the literature among *in vitro* studies as regards the concentration and exposure time to the drug (VARLAM et al., 2001; WASAN et al., 1994). According to results obtained we choose three concentrations (low, medium and high) to study gene expression using MDCK.2 (2, 4 and 8 µg/mL) and LLC-PK1 (4, 10 and 30 µg/mL). These concentrations are consistent with other studies using, in addition to the MTT assay, other tests as trypan blue exclusion, flow cytometry, Western blot, tunnel, to measure AmB toxic effects on renal cells. (FRANCA et al., 2014; VARLAM et al., 2001; YANO et al., 2009).

These results suggest that MDCK.2 and LLC-PK1 cells were not able to maintain its normal growth after exposure to AmB, maintaining a less active state, in medium and low concentrations. Although the MTT metabolization be directly proportional to the number of viable cells, the cells produce more active formazan than resting cells and its formation occurs even in the absence of proliferation (MOSMANN, 1983).

After the selection of concentrations, we performed the gene expression test in both strains. The ten genes studied were *ANXA5* , *BAX* , *BCL -2* , *BCL -XL* , *CASP3* , *CASP9* , *EXOC6* , *HAVCR1* , *ICAM -1* and *VDAC1* based on previous studies using gene expression after exposure to AmB *in vivo* and *in vitro* (BALKOVETZ et al., 2004; ICHIMURA et al., 2008; KONDO et al., 2012; OZAKI et al., 2010; SERVAIS et al., 2006). The forward and reverse primers were chosen according to their positions in the gene that encoded the transcript, given that the pairs that were not on the same exon were chosen. The genes with the highest fold change in this study

were *HAVCR1*, *CASP3*, *ANXA5*, and *VDAC1*. This result suggests that these genes might be used as biomarkers of *in vitro* nephrotoxicity. Genomic predictors of toxicity were defined in this study as genes that showed a significant change in expression levels after 24h exposure to the nephrotoxicant and before the detection of the cell death. All candidate biomarkers are correlated with known functional changes in response to drug-induced kidney injury.

We identified Hepatitis A Virus Cellular Receptor 1 - *HAVCR1* (also named *KIM1* or *TIM1*) as a good biomarker because *HAVCR1* is a PS receptor that recognizes apoptotic cells and directs them to lysosomes. *HAVCR1* is the first discovered molecule that transforms kidney proximal epithelial cells into semi-professional phagocytes (ICHIMURA et al., 2008; PROZIALECK et al., 2009; YANG et al., 2015) and has been found to be an early indicator of acute kidney failure compared with other traditional biomarkers. Human and animals studies have also showed promising results for potential utility of urinary KIM1 as a diagnostic biomarker for Acute Kidney Injury (AKI) (FUFAA et al., 2015; HAN et al., 2002; VAIDYA et al., 2010). Thus, it is observed that our results *in vitro* are in agreement to these studies. The increase in the relative expression of *HAVCR1* (*KIM1*) presented by LLC-PK1 (approximately 4 fold change) and MDCK.2 (approximately 11 fold change) after exposure to AmB provides evidence that the model suggested may be an alternative for screening chemical entities with nephrotoxic potential such as AmB. Although some changes were observed at low and medium concentrations using MTT assay, there was no significant gene expression for the genes tested, compared to control cells, hence we believe the apoptotic process caused by AmB does not occur at this lower concentrations. Further experiments are needed for understanding of AmB toxicity mechanisms and to understand this difference in responses between the tests.

Increased KIM-1, protein encoded by *Kim-1* gene, (analogous to *HAVCR1*) after renal injury leads to increased intracellular calcium and induces Annexin. Annexins are a family of proteins known to bind phospholipids in a Ca^{2+} -dependent manner in many body tissue, including distal tubule cells and glomerular epithelial cells. These annexins proteins participates in various membrane-related events such as

exocytosis, endocytosis, apoptosis (KUMAR et al., 2014; MARKOFF; GERKE, 2005). Thus, we measured the Annexin A5 (*ANXA5*) level to help us to understand the toxic renal processes caused by AmB once the biological role of protein Annexin A5 was discovered to be connected with apoptosis and is considered as an early biomarker of that process (JAKUBOWSKA; KILIS-PSTRUSINSKA, 2015). It was found a 5 fold change increased in LLC-PK1 cells and 21 fold change in MDCK.2 cells *ANXA5* gene expression after higher concentrations of AmB exposure. The present study is in agreement with the previous gene (*HAVCR1*) once there was no overexpression in medium and lower concentrations indicating a cell's quiescence state, but also suggests the occurrence of apoptotic cell changes (5 fold change in LLC-PK1 cells and 20 fold change in MDCK.2 cells) at a molecular level, demonstrating the role of *ANXA5* as an early biomarker.

Indeed, apoptosis reduction by different approaches displays protection against various forms of renal injury. A specific target in the apoptotic pathway is the family of cysteine-aspartic proteases known as caspases. Caspases are a family of intracellular cysteine proteases that play a key role in the execution-phase of apoptosis. Caspases can act as initiators or executioners. Initiator caspases include caspases 8 and 9, and activation of these caspases results in activation of executioner caspases such as caspases 3 and 7. Thus, caspases seems to be involved in apoptosis associated with toxic acute renal failure. The increase in the expression of *CASP3* presented in the present study by LLC-PK1(fold change) and MDCK.2 (fold change) cells after higher exposure to AmB are in accordance with the above studies suggesting that the AmB nephrotoxicity is induced by the mitochondrial pathway playing a key role in apoptosis. There is limited information on the role of caspases in ischemic renal tubular cell injury. Previous studies have demonstrated chemical hypoxia and increased caspase activity that precedes DNA damage and cell death. Moreover the inhibition of caspases prevented hypoxia-induced DNA damage and cell death in LLC-PK1 cells (KAUSHAL; UEDA; SHAH, 1997). In this study we also observed an increase in the expression of *CASP9*, an activating caspase protein, in LLC-PK1 cells line (data not shown) suggesting the activation of the apoptotic pathway after higher exposure of AmB.

Therefore, notice the key role of mitochondrial pathway of apoptosis and the importance of membrane ion channels in cell toxicity caused by AmB we tested other genes involved in apoptosis/mitochondrial pathway like *BAX*, *BCL-2*, *BCL-XL*, and *VDAC1*. The voltage-dependent anion channels (VDACs) are the most abundant proteins of the mitochondrial membrane in multicellular organisms (DE STEFANI et al., 2012) and both cell lines used in this study overexpressed this gene. The *VDAC1* gene encodes an anion channel protein in mitochondrial membrane exchanging metabolites and ions across the mitochondrial and may regulate its functions (SHOSHAN-BARMATZ et al., 2010) and has also an important role in apoptosis through Ca^{2+} regulation and binding anti-apoptotic proteins of the *BCL-2* family, proteins that regulate and contribute to programmed cell death or apoptosis. A recent study have provided experimental evidence supporting this conclusion: the cleavage of VDAC1 reflects a survival response of hypoxic cells (BRAHIMI-HORN et al., 2015). Once the cellular expression level of VDAC1 is a crucial factor for the process of mitochondria-mediated apoptosis, our findings are in agreement into previous literature and we could say suggest that the mechanism of action of AmB toxicity involves induction of VDAC1 over-expression as shown in figure 2.

Although most of the results presented in this study indicate an important role of the apoptotic pathway in the toxicity induced by Amphotericin B, many studies indicate that this drug acts through multiple pathways. In the present study, we strongly suggest a central role of mitochondrial pathway dysfunction in the mechanism underlying AmB-induced nephrotoxicity as we could check see on the MTT results and the over-expressed genes *HAVCR1*, *CASP3*, *ANXA5* and *VDAC1*. However, further studies are necessary to better elucidate the AmB's toxicity mechanisms.

CONCLUSION

The present study's results have shown that the nephrotoxicity of AmB can vary among nephron segments and the cell lines appears to be sensitive to the toxicity of the drug on a concentration dependent manner which could be identified by performing MTT assays and by changing the expression level of the genes tested. These results provide evidence that the genes selected may provide an innovative approach to detecting early renal injury biomarkers *in vitro*. Thus, the need for an improved classification of kidney diseases, ideally based on molecular signatures linked to the mode of action and success of therapeutic approaches as well as the need for early biomarkers that adequately allow to time the therapeutic intervention is necessary. In this study, we could show the importance of the screening drugs at a toxicological and molecular level in more than one cell strain. Although further studies are required to confirm the robustness of predictability concerning these biomarkers, these results indicate that these genes may be promising in the *in vitro* evaluation of nephrotoxicity and will be useful in the development of safer drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq (Process 473125/2012-9 and 310624/2012-6) and FAPEMIG (CDS - APQ-01712-1) for the financial support.

REFERENCES

- BALKOVETZ, D. F. et al. Gene expression alterations during HGF-induced dedifferentiation of a renal tubular epithelial cell line (MDCK) using a novel canine DNA microarray. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, n. 4, p. F702-10, Apr 2004.
- BRAHIMI-HORN, M. C. et al. Knockout of Vdac1 activates hypoxia-inducible factor through reactive oxygen species generation and induces tumor growth by promoting metabolic reprogramming and inflammation. **Cancer Metab**, v. 3, p. 8, 2015.
- CHOUDHURY, D.; AHMED, Z. Drug-associated renal dysfunction and injury. **Nat Clin Pract Nephrol**, v. 2, n. 2, p. 80-91, Feb 2006.
- DE STEFANI, D. et al. VDAC1 selectively transfers apoptotic Ca²⁺ signals to mitochondria. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 2, p. 267-73, Feb 2012.
- DENAMUR, S. et al. Apoptosis induced by aminoglycosides in LLC-PK1 Cells: comparative study of neomycin, gentamicin, amikacin, and isepamicin using electroporation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 6, p. 2236-8, Jun 2008.
- FRANCA, F. D. et al. Alteration in cellular viability, pro-inflammatory cytokines and nitric oxide production in nephrotoxicity generation by Amphotericin B: involvement of PKA pathway signaling. **J Appl Toxicol**, v. 34, n. 12, p. 1285-92, Dec 2014.
- FUFAA, G. D. et al. Association of urinary KIM-1, L-FABP, NAG and NGAL with incident end-stage renal disease and mortality in American Indians with type 2 diabetes mellitus. **Diabetologia**, v. 58, n. 1, p. 188-98, Jan 2015.
- HAN, W. K. et al. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney Int**, v. 62, n. 1, p. 237-44, Jul 2002.
- HANSEN, M. B.; NIELSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J Immunol Methods**, v. 119, n. 2, p. 203-10, May 12 1989.
- HARMSSEN, S. et al. Amphotericin B is cytotoxic at locally delivered concentrations. **Clin Orthop Relat Res**, v. 469, n. 11, p. 3016-21, Nov 2011.
- ICHIMURA, T. et al. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. **J Clin Invest**, v. 118, n. 5, p. 1657-68, May 2008.
- JAKUBOWSKA, A.; KILIS-PISTRUSINSKA, K. [Importance of annexin V in kidney diseases]. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**, v. 69, p. 153-7, 2015.
- KAUSHAL, G. P.; UEDA, N.; SHAH, S. V. Role of caspases (ICE/CED 3 proteases) in DNA damage and cell death in response to a mitochondrial inhibitor, antimycin A. **Kidney Int**, v. 52, n. 2, p. 438-45, Aug 1997.

KONDO, C. et al. Predictive genomic biomarkers for drug-induced nephrotoxicity in mice. **J Toxicol Sci**, v. 37, n. 4, p. 723-37, 2012.

KREJCIROVA, L. et al. Influence of amphotericin B deoxycholate or amphotericin B colloidal dispersion on renal tubule epithelium in rat. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 148, n. 2, p. 221-3, Dec 2004.

KUMAR, S.; LIU, J.; MCMAHON, A. P. Defining the acute kidney injury and repair transcriptome. **Semin Nephrol**, v. 34, n. 4, p. 404-17, Jul 2014.

LANIADO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev Iberoam Micol**, v. 26, n. 4, p. 223-7, Dec 31 2009.

MARKOFF, A.; GERKE, V. Expression and functions of annexins in the kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 289, n. 5, p. F949-56, Nov 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

OZAKI, N. et al. Identification of genes involved in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats--a toxicogenomic investigation. **Exp Toxicol Pathol**, v. 62, n. 5, p. 555-66, Sep 2010.

PRICE, P. M.; SAFIRSTEIN, R. L.; MEGYESI, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, n. 2, p. F378-84, Feb 2004.

PROZIALECK, W. C. et al. Expression of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in relation to necrosis and apoptosis during the early stages of Cd-induced proximal tubule injury. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 238, n. 3, p. 306-14, Aug 1 2009.

SERVAIS, H. et al. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 4, p. 1213-21, Apr 2006.

SERVAIS, H. et al. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. **Apoptosis**, v. 13, n. 1, p. 11-32, Jan 2008.

SHOSHAN-BARMATZ, V. et al. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. **Mol Aspects Med**, v. 31, n. 3, p. 227-85, Jun 2010.

SOHN, S. J. et al. In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. **Toxicol Lett**, v. 217, n. 3, p. 235-42, Mar 13 2013.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193-203, Dec 15 2015.

TAGLIATI, C. A. et al. A comparison of BGM and LLC-PK1 cells for the evaluation of nephrotoxicity. **Drug Chem Toxicol**, v. 35, n. 3, p. 258-63, Jul 2012.

TIONG, H. Y. et al. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. **Mol Pharm**, v. 11, n. 7, p. 1933-48, Jul 7 2014.

VAIDYA, V. S. et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 478-85, May 2010.

VARLAM, D. E. et al. Apoptosis contributes to amphotericin B-induced nephrotoxicity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 3, p. 679-85, Mar 2001.

WALEV, I.; BHAKDI, S. Possible reason for preferential damage to renal tubular epithelial cells evoked by amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40, n. 5, p. 1116-20, May 1996.

WASAN, K. M. et al. Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 38, n. 2, p. 223-7, Feb 1994.

YANG, L. et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney. **J Clin Invest**, v. 125, n. 4, p. 1620-36, Apr 2015.

YANO, T. et al. Amphotericin B-induced renal tubular cell injury is mediated by Na⁺ Influx through ion-permeable pores and subsequent activation of mitogen-activated protein kinases and elevation of intracellular Ca²⁺ concentration. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p. 1420-6, Apr 2009.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo teve como objetivo principal a validação de métodos mais sensíveis para identificação precoce de efeitos nefrotóxicos, importantes no desenvolvimento de novos fármacos, visto que, a maioria dos métodos existentes tem nos modelos animais seu maior foco. Apesar dos modelos *in vivo* ainda serem oficialmente reconhecidos pelos órgãos regulamentadores nacionais e internacionais, por vezes falha na detecção da toxicidade, pois, a manifestação dos efeitos tóxicos pode demorar demasiadamente quando avaliados pelos métodos tradicionais, portanto, não são bons modelos preditivos para toxicidade.

No presente estudo, o ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT mostrou que as células das linhagens LLC-PK1 e MDCK.2 são sensíveis aos efeitos da Anfotericina B, apresentando diminuição da viabilidade celular mesmo em baixas concentrações. No entanto, a falta de alteração da expressão dos genes analisados quando as células foram expostas às concentrações de 4 e 10 µg/mL na LLC-PK1 e 2 e 4 µg/mL na MDCK.2, torna necessário que mais estudos sejam realizados para compreender como baixas concentrações de AmB afetaram, de alguma maneira, o crescimento e a viabilidade celular sem indução de aumento da expressão dos genes analisados.

A análise de expressão gênica mostrou aumento relativo de expressão para os genes *HAVCR1* (*KIM1*), *CASP3*, *ANXA5*, e *VDAC1*, quando as células foram expostas às maiores concentrações (30 µg/mL para LLC-PK1 e 8 µg/mL para MDCK.2). Esses resultados fornecem evidências de que esses genes são potenciais biomarcadores para detecção de lesão renal a nível celular. O aumento de expressão dos genes relacionados à apoptose, mais especificamente *ANXA5* e *CASP9*, confirmam que um dos mecanismos de nefrotoxicidade induzida pela AmB é a apoptose via mitocondrial. Mais estudos são necessários para confirmar a robustez de previsibilidade dos mesmos, no entanto, nossos resultados indicam que os genes estudados são adequados para avaliação de nefrotoxicidade *in vitro*, podendo ser utilizados, no futuro, no desenvolvimento de drogas mais seguras.

6. PERSPECTIVAS

Realizaremos ensaios de citometria de fluxo a fim de inserir os resultados obtidos no presente estudo.

Como meta em nosso próximo estudo, realizaremos testes em células humanas. Os resultados obtidos serão analisados a fim de se obter resultados mais confiáveis.

Nesse sentido, cremos que o presente estudo representa importante degrau para o avanço da Toxicologia Preditiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M. Ativistas resgatam cães de laboratório de testes em São Roque (SP). **Folha de S. Paulo**, São Paulo, 18 out. 2013. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2013/10/1358477-ativistas-invadem-laboratorio-em-sao-roque.shtml>>. Acesso em: maio, 2015.

ANVISA. Aceitação regulatória dos métodos alternativos ao nível internacional. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d413f08049f82ce5bccbfcc5e0813b1c/Aceitacao+regulatoria+dos+metodos+alternativos+internacional+160915.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso: fev, 2016.

ARAÚJO, G. L.; CAMPOS, M. A. A.; VALENTE, M. A. S.; SILVA, S. C. T.; FRANÇA, F. D.; CHAVES, M. M.; TAGLIATI, C. A. Alternative methods in toxicity testing: the current approach. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 1, p. 55-62, jan./mar. 2014.

BALKOVETZ, D. F. et al. Gene expression alterations during HGF-induced dedifferentiation of a renal tubular epithelial cell line (MDCK) using a novel canine DNA microarray. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, n. 4, p. F702-10, Apr 2004.

BARRETT, K. E. et al. **Fisiologia Médica de Ganong - 24ed.** AMGH Editora, 2014. ISBN 9788580552935.

BERNAUER, U. et al. The use of in vitro data in risk assessment. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 96, n. 3, p. 176-81, Mar 2005.

CHEN, M. et al. A decade of toxicogenomic research and its contribution to toxicological science. **Toxicol Sci**, v. 130, n. 2, p. 217-28, Dec 2012.

CHIN, K. V.; KONG, A. N. Application of DNA microarrays in pharmacogenomics and toxicogenomics. **Pharm Res**, v. 19, n. 12, p. 1773-8, Dec 2002.

DENAMUR, S. et al. Apoptosis induced by aminoglycosides in LLC-PK1 Cells: comparative study of neomycin, gentamicin, amikacin, and isepamicin using electroporation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 6, p. 2236-8, Jun 2008.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food Chem Toxicol**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, Feb-Mar 2002.

FABIAN, G. et al. High-density real-time PCR-based in vivo toxicogenomic screen to predict organ-specific toxicity. **Int J Mol Sci**, v. 12, n. 9, p. 6116-34, 2011.

FRANCA, F. D. et al. Alteration in cellular viability, pro-inflammatory cytokines and nitric oxide production in nephrotoxicity generation by Amphotericin B: involvement of PKA pathway signaling. **J Appl Toxicol**, v. 34, n. 12, p. 1285-92, Dec 2014.

FUCHS, T. C.; HEWITT, P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity-an overview for applied toxicology. **AAPS J**, v. 13, n. 4, p. 615-31, Dec 2011.

GANIS, P. et al. Polyene macrolide antibiotic amphotericin B. Crystal structure of the N-iodoacetyl derivative. **J Am Chem Soc**, v. 93, n. 18, p. 4560-4, Sep 8 1971.

GOMASE, V. S.; TAGORE, S. Toxicogenomics. **Curr Drug Metab**, v. 9, n. 3, p. 250-4, Mar 2008.

GUERREIRO, N. et al. Toxicogenomics in drug development. **Toxicol Pathol**, v. 31, n. 5, p. 471-9, Sep-Oct 2003.

HALL, J. E.; GUYTON, A. C. **Guyton E Hall Tratado De Fisiologia Médica**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2011. ISBN 9788535254785.

HARMSSEN, S. et al. Amphotericin B is cytotoxic at locally delivered concentrations. **Clin Orthop Relat Res**, v. 469, n. 11, p. 3016-21, Nov 2011.

HARTUNG, T. From alternative methods to a new toxicology. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 77, n. 3, p. 338-49, Apr 2011.

KAKIASHVILI, E. et al. The epidermal growth factor receptor mediates tumor necrosis factor-alpha-induced activation of the ERK/GEF-H1/RhoA pathway in tubular epithelium. **J Biol Chem**, v. 286, n. 11, p. 9268-79, Mar 18 2011.

KANDAROVA, H.; LETASIOVA, S. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. **Interdiscip Toxicol**, v. 4, n. 3, p. 107-13, Sep 2011.

KANDAROVA, H.; LETASIOVA, S. Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods. **Interdiscip Toxicol**, v. 4, n. 3, p. 107-13, Sep 2011. *apud* RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen: London, 1959.

KONDO, C. et al. Predictive genomic biomarkers for drug-induced nephrotoxicity in mice. **J Toxicol Sci**, v. 37, n. 4, p. 723-37, 2012.

KUMAR, S.; LIU, J.; MCMAHON, A. P. Defining the acute kidney injury and repair transcriptome. **Semin Nephrol**, v. 34, n. 4, p. 404-17, Jul 2014.

LANIADO-LABORIN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Rev Iberoam Micol**, v. 26, n. 4, p. 223-7, Dec 31 2009.

LASSER, K. E. et al. Timing of new black box warnings and withdrawals for prescription medications. **JAMA**, v. 287, n. 17, p. 2215-20, May 1 2002.

LIEBSCH, M.; SPIELMANN, H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. **Toxicol Lett**, v. 127, n. 1-3, p. 127-34, Feb 28 2002.

MARQUES, R. G.; MORALES, M.M.; PETROIANU, A. Brazilian law for scientific use of animals. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo , v. 24, n. 1, p. 69-74, Feb. 2009.

MATLHAGELA, K.; TAUB, M. Involvement of EP1 and EP2 receptors in the regulation of the Na,K-ATPase by prostaglandins in MDCK cells. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 79, n. 1-2, p. 101-13, Mar 2006.

MOFFAT, I. et al. Comparison of toxicogenomics and traditional approaches to inform mode of action and points of departure in human health risk assessment of benzo[a]pyrene in drinking water. **Crit Rev Toxicol**, v. 45, n. 1, p. 1-43, Jan 2015.

MOHAMED-AHMED, A. H.; BROCCINI, S.; CROFT, S. L. Recent advances in development of amphotericin B formulations for the treatment of visceral leishmaniasis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 25, n. 6, p. 695-702, Dec 2012.

NASCIMENTO, C. R. et al. Comparative study on the effects of cyclosporin a in renal cells in culture. **Nephron Exp Nephrol**, v. 99, n. 3, p. e77-86, 2005.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nat Protoc**, v. 1, n. 3, p. 1559-82, 2006.

OGA, S.; DE ALMEIDA CAMARGO, M. M.; DE OLIVEIRA BATISTUZZO, J. A. **Fundamentos de toxicologia**. Atheneu, 2008. ISBN 9788574540986.

OGA, S.; DE ALMEIDA CAMARGO, M. M.; DE OLIVEIRA BATISTUZZO, J. A. **Fundamentos de toxicologia**. Atheneu, 2014. ISBN 9788574541075 .

PRICE, P. M.; SAFIRSTEIN, R. L.; MEGYESI, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, n. 2, p. F378-84, Feb 2004.

RAMSEYER, V. D.; GARVIN, J. L. Tumor necrosis factor-alpha: regulation of renal function and blood pressure. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 304, n. 10, p. F1231-42, May 15 2013.

SCHLOTTFELDT, F. D. et al. Prevention of amphotericin B nephrotoxicity through use of phytotherapeutic medication. **Rev Esc Enferm USP**, v. 49, n. spe, p. 74-79, Feb 2015.

SERVAIS, H. et al. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 4, p. 1213-21, Apr 2006.

SERVAIS, H. et al. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. **Apoptosis**, v. 13, n. 1, p. 11-32, Jan 2008.

SHIN, H. J. et al. Establishment and characterization of Mardin-Darby canine kidney cells stably expressing human organic anion transporters. **Arch Pharm Res**, v. 33, n. 5, p. 709-16, May 2010.

SOHN, S. J. et al. In vitro evaluation of biomarkers for cisplatin-induced nephrotoxicity using HK-2 human kidney epithelial cells. **Toxicol Lett**, v. 217, n. 3, p. 235-42, Mar 13 2013.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. Fundamentos da circulação extracorpórea. 2. ed. [s.l.]: [s.n.], 2006. Disponível em:<
<https://blogcomcienciadotcom.files.wordpress.com/2013/04/livro-fundamentos-circulac3a7c3a3o-extracorp3b3rea.pdf> >. Acesso em: fev. 2016.

SPIELMANN, H. et al. Successful validation of in vitro methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Exp Toxicol Pathol**, v. 60, n. 2-3, p. 225-33, Jun 2008.

SPINDLER, P.; SJOBERG, P.; KNUDSEN, L. E. First exposure in man: toxicological considerations. **Pharmacol Toxicol**, v. 86 Suppl 1, p. 8-12, 2000.

SUTER, L.; BABISS, L. E.; WHEELDON, E. B. Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. **Chem Biol**, v. 11, n. 2, p. 161-71, Feb 2004.

SYCHEVA, L. P.; ZHURKOV, V. S.; RAKHMANIN IU, A. [Actual problems of genetic toxicology]. **Genetika**, v. 49, n. 3, p. 293-302, Mar 2013.

SZASZI, K. et al. Depolarization induces Rho-Rho kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in kidney tubular cells. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 289, n. 3, p. C673-85, Sep 2005.

TAGLIATI, C. A. et al. A comparison of BGM and LLC-PK1 cells for the evaluation of nephrotoxicity. **Drug Chem Toxicol**, v. 35, n. 3, p. 258-63, Jul 2012.

THEODOSIOU, M.; AMIR-ASLANI, A.; MEGARBANE, B. Emerging technologies and challenges for better and safer drugs. **Biotechnol Lett**, v. 36, n. 4, p. 677-84, Apr 2014.

THUKRAL, S. K. et al. Prediction of nephrotoxicant action and identification of candidate toxicity-related biomarkers. **Toxicol Pathol**, v. 33, n. 3, p. 343-55, 2005.

TIONG, H. Y. et al. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical in vitro models. **Mol Pharm**, v. 11, n. 7, p. 1933-48, Jul 7 2014.

VAIDYA, V. S. et al. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. **Nat Biotechnol**, v. 28, n. 5, p. 478-85, May 2010.

VAN DER HARST, M. R. et al. Gentamicin nephrotoxicity--a comparison of in vitro findings with in vivo experiments in equines. **Vet Res Commun**, v. 29, n. 3, p. 247-61, Apr 2005.

VARLAM, D. E. et al. Apoptosis contributes to amphotericin B-induced nephrotoxicity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 3, p. 679-85, Mar 2001.

WANDALL, B.; HANSSON, S. O.; RUDEN, C. Bias in toxicology. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 9, p. 605-17, Sep 2007.

WANG, E. J. et al. Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. **Toxicology**, v. 246, n. 2-3, p. 91-100, Apr 18 2008.

WATERS, M. D.; FOSTEL, J. M. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 12, p. 936-48, Dec 2004.

WATKINS, C. D. K. J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull (Lange)**. McGraw Hill Brasil, 2009. ISBN 9788580551327.

WILMES, A. et al. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. **Toxicol In Vitro**, v. 25, n. 3, p. 613-22, Apr 2011.

YANO, T. et al. Amphotericin B-induced renal tubular cell injury is mediated by Na⁺ Influx through ion-permeable pores and subsequent activation of mitogen-activated protein kinases and elevation of intracellular Ca²⁺ concentration. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p. 1420-6, Apr 2009.

ZUK, A.; BONVENTRE, J. V. Acute Kidney Injury. **Annu Rev Med**, v. 67, p. 293-307, Jan 14 2016.