

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

FLÁVIA DAYRELL FRANÇA

**Avaliação do envolvimento da via de
sinalização PKA na nefrotoxicidade
causada pela Anfotericina B e Ciclosporina
utilizando linhagens celulares LLC-PK1 e
MDCK**

Belo Horizonte

2013

FLÁVIA DAYRELL FRANÇA

**Avaliação do envolvimento da via de
sinalização PKA na nefrotoxicidade
causada pela Anfotericina B e Ciclosporina
utilizando linhagens celulares LLC-PK1 e
MDCK**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Míriam Chaves Shultz
Co-orientador: Carlos Alberto Tagliati

**Belo Horizonte
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
2013**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Este trabalho foi realizado no laboratório de Bioquímica do Envelhecimento e Doenças Correlacionadas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação da Dra. Míriam Chaves Shultz e co-orientação do Dr. Carlos Alberto Tagliati.

APOIO FINANCEIRO:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

COLABORADORES:

- Dra. Daniela Caldeira Costa
- Dra. Karen Moraes
- Dr. Joamyr Rossoni Júnior.

À minha mãe, saudade eterna.

“Lembre que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento. É o seu bem mais precioso. Explore, viaje, descubra. Conheça.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e por me iluminar sempre.

A minha mãe, presença constante em meus pensamentos, pelo eterno incentivo.

Agradecimento especial ao meu pai, irmãs e Didi pelo incentivo, apoio, confiança e compreensão: Amo vocês! Aos meus cunhados, sobrinhos, Tia Lígia, Tio Leandro e filhos pelo carinho, sempre.

A minha orientadora profa. Miriam Chaves Shultz e ao co-orientador Prof. Carlos Alberto Tagliati pela dedicação, confiança e ensinamentos. Muito obrigada!

Aos colegas do laboratório, Barbara, Raquel, Sandra, Andrea e Glaucia pela amizade e compreensão.

Ao prof. Dawidson Gomes pelos ensinamentos com o Citômetro de Fluxo.

A *In Vitro* Cells Pesquisa Toxicológica S/A pela oportunidade.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica e Bioquímica Metabólica da UFOP, em especial ao Joamyr e Glaucy.

Às professoras da UFOP Daniela Caldeira Costa e Karen Moraes, sempre dispostas a ajudar e ensinar.

Aos meus amigos, em especial Karine Vale, Guilherme Diniz, Alexandre, Márcia Gonçalves, Ana Letícia, Ana Paula, Viviane e Adelmo, por entenderem a minha ausência e me apoiarem sempre.

A República Minas das Minas, pela amizade e por me acolher sempre tão bem em Ouro Preto.

Ao programa de pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG, CAPES, CNPq e FAPEMIG.

RESUMO

Anfotericina B (antifúngico) e Ciclosporina (imunossupressor) são fármacos muito utilizados na clínica médica, porém é comum a ocorrência de Nefrotoxicidade. A proposta do presente estudo foi avaliar o envolvimento da via de sinalização celular PKA na nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B e Ciclosporina utilizando linhagens celulares renais: LLC-PK1 (túbulos proximais de porcos) e MDCK (túbulos distais de cães). Para tal avaliamos parâmetros envolvidos na nefrotoxicidade como: Citotoxicidade (Vermelho Neutro e MTT), Morte Celular (Citometria de Fluxo), recuperação do efeito tóxico (Vermelho Neutro), quantificação de citocinas inflamatórias, efeito vasodilatador (quantificação de óxido nítrico) e participação da via PKA (Western Blot). Os resultados mostraram que ambos os fármacos foram citotóxicos para as ambas as linhagens, como avaliado pelos testes Vermelho Neutro e MTT; e causaram fragmentação do DNA, conforme avaliado pela Citometria de Fluxo utilizando Iodeto de Propídeo. As duas linhagens celulares conseguiram se recuperar do efeito tóxico causado pela Anfotericina B e Ciclosporina, porém o tempo de recuperação varia de acordo com o fármaco utilizado e com a linhagem celular empregada. Na análise do envolvimento da via de sinalização PKA na nefrotoxicidade causada pelos fármacos, quando as células foram pré-tratadas com H89 (inibidor da via PKA) e em seguida com os fármacos, não ocorreu diferença significativa entre os grupos, conforme avaliado pelo teste Vermelho Neutro. Quando a mesma análise foi realizada utilizando a Citometria de Fluxo, nas células MDCK a inibição da via PKA diminuiu a porcentagem de morte celular ocasionada pelos mesmos. A inibição da via não afetou a capacidade de recuperação celular em nenhuma das duas linhagens. Quando avaliamos a produção de citocinas pro-inflamatórias relacionadas com o processo nefrotóxico, percebemos que a Anfotericina B estimulou a produção de IL-6 e esta foi dependente da via PKA, enquanto a Ciclosporina não alterou a produção dessa citocina. Em relação ao TNF- α , os dois fármacos estimularam a produção do mesmo, mas esta não foi alterada pela inibição da via. Ambos os fármacos causaram diminuição na produção de Óxido Nítrico (substância vasodilatadora) e essa produção mostrou-se dependente da via PKA. Os resultados do Western Blot confirmaram que os dois fármacos induzem a

ativação da via PKA. Assim, nossos resultados sugerem que a inibição da via PKA pode auxiliar na prevenção/diminuição da nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B e Ciclosporina.

Palavras chaves: nefrotoxicidade, Anfotericina B, Ciclosporina, LLC-PK1, MDCK, PKA, IL-6, TNF- α e Óxido Nítrico.

ABSTRACT

Amphotericin B (antifungal) and Cyclosporine (immunosuppressant) are commonly used drugs in medical clinics; however, these often present Nephrotoxicity. The proposal of the present study was to evaluate the involvement of the cellular PKA signaling pathway on Nephrotoxicity caused by Amphotericin B and Cyclosporine using renal cell lines: LLC-PK1 (proximal tubules of pigs) and MDCK (distal tubules of dogs). To accomplish this goal, the present study evaluated parameters involved in Nephrotoxicity, such as cytotoxicity (Neutral Red and MTT), cell death (Flow Cytometry), the recovery of toxic effects (Neutral Red), inflammatory cytokine quantification, the vasodilator effect (quantification of nitric oxide), and the participation of PKA (Western Blot). The results showed that both drugs, when evaluated by neutral Red and MTT tests, proved to be cytotoxic to both cell lines, and when evaluated by Flow Cytometry using Propidium iodide, they caused DNA fragmentation. The two cell lines were able to recover from the toxic effect caused by Amphotericin B and Cyclosporine, but the recovery times varied, depending on the drugs and cell lines used. In the analysis of the involvement of the PKA signaling pathway on Nephrotoxicity caused by these drugs, when cells were pre-treated with H89 (PKA inhibitor) and then with the drugs, no significant difference between the groups, when evaluated by Neutral Red, could be observed. When the same analysis was performed using Flow Cytometry in MDCK, the inhibition of the PKA pathway decreased the percentage of cell death caused by Amphotericin B and Cyclosporine. Inhibition of the pathway did not affect the capacity of cell recovery in either of the two cell lines. When the production of pro-inflammatory cytokines was evaluated as regards the nephrotoxic process, it could be observed that Amphotericin B stimulated the production of IL-6, which proved to be dependent on the PKA pathway, whereas Cyclosporine did not alter the production of this cytokine. In relation to TNF- α , both drugs stimulated this production; however, the inhibition of the PKA pathway did not alter this production. Both drugs caused a decrease in the production of Nitric Oxide (vasodilator substance), and this production proved to be dependent on the PKA pathway. Western Blot results confirmed that both drugs induce the activation of the PKA pathway. Thus, the present study's results suggest that

the inhibition of the PKA pathway can aid in preventing/reducing Nephrotoxicity caused by Amphotericin B and Cyclosporine.

KEY WORDS: nephrotoxicity, Amphotericin B, Cyclosporine, LLC-PK1, MDCK, PKA, IL-6, TNF- α , Nitric Oxide.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura química da Anfotericina B..... | 20 |
| Figura 2. Estrutura química da Ciclosporina..... | 21 |
| Figura 3. Ação da Ciclosporina..... | 22 |
| Figura 4. Formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da arginina pela ativação da enzima Oxido Nítrico Sintase (NOS)..... | 28 |
| Figura 5. Diagrama esquemático da via de sinalização PKA/AMPc..... | 32 |
| Figura 6. Ligação da PKA a AKAPs..... | 33 |
| Figura 7. Ativação do CREB pela via AMPc/PKA..... | 35 |
| Figura 8. Esquema do ensaio de recuperação celular..... | 50 |
| Figura 9. Esquema do ensaio de envolvimento da PKA na recuperação celular..... | 50 |
| Figura 10. Determinação do “Double time” celular..... | 54 |
| Figura 11. Avaliação da viabilidade celular nas linhagens celulares renais expostas à Anfotericina B utilizando Vermelho Neutro e MTT..... | 56 |
| Figura 12. Avaliação da viabilidade celular nas linhagens celulares renais expostas à Ciclosporina utilizando Vermelho Neutro e MTT..... | 58 |
| Figura 13. Fragmentação de DNA induzida pela Anfotericina B e Ciclosporina..... | 59 |
| Figura 14. Efeito da inibição da via PKA na viabilidade das células renais expostas a Anfotericina B e Ciclosporina..... | 60 |
| Figura 15. Efeito da inibição da via PKA na Fragmentação do DNA das células renais expostas a Anfotericina B e Ciclosporina..... | 61 |
| Figura 16. Efeito induzido pela Anfotericina B sobre a capacidade de recuperação celular nas células LLC-PK1 | 62 |
| Figura 17. Efeito induzido pela Anfotericina B sobre a capacidade de recuperação celular nas células MDCK | 63 |
| Figura 18. Efeito induzido pela Ciclosporina sobre a capacidade de recuperação celular nas células LLC-PK1 | 64 |

| | |
|---|----|
| Figura 19. Efeito induzido pela Ciclosporina sobre a capacidade de recuperação celular nas células MDCK | 65 |
| Figura 20. Avaliação do envolvimento da via PKA na recuperação celular após tratamento com Anfotericina B..... | 66 |
| Figura 21. Avaliação do envolvimento da via PKA na recuperação celular após tratamento com Ciclosporina..... | 67 |
| Figura 22. Efeitos da Anfotericina B na produção de IL-6 e TNF- α em células renais..... | 68 |
| Figura 23. Efeitos da Ciclosporina na produção de IL-6 e TNF- α em células renais..... | 70 |
| Figura 24. Efeitos da Anfotericina B na produção de Óxido Nítrico (NO) em células renais..... | 71 |
| Figura 25. Efeitos da Ciclosporina na produção de Óxido Nítrico (NO) em células renais..... | 72 |
| Figura 26. Indução da ativação da via PKA pela Anfotericina B nas células renais LLC-PK1 e MDCK..... | 74 |
| Figura 27. Indução da Ativação da via PKA pela Ciclosporina nas células renais LLC-PK1 e MDCK..... | 75 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC = Adenil ciclase

AIF = Fator indutor de apoptose

AKAPs = Proteínas de ancoramento de cinases

AMPc = Monofostato de adenosina 3,5 cíclico

APS = Persulfato de Amônio

AQP-2 = Aquaporinas

ATP = Trifosfato de adenosina

BAK = Bcl-2 antagonist/killer-1

BAX = Proteína X associada a Bcl-2

BCL = Proteína de leucemia de célula B

BSA = Albumina Bovina

CRE = Elemento responsivo ao AMPc

CREB = Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc

DMSO = Dimetilsulfóxido

DTT = Ditioneitol

EGF = Fator de crescimento epidermal

ENaC = Canal de Sódio epitelial

eNOS = Óxido nítrico sintase endotelial

ERK = Cinase regulada por sinal extracelular

EROs = Espécies reativas de oxigênio

GC = Guanilato ciclase

GMPc = Monofosfato cíclico de guanosina

Gp130= Glicoproteína 130

GTP = Trifosfato de Guanosina

H89 = *N*-[2-*p*-bromo-cinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide

HGF = Fator de crescimento de hepatócios

IGF-1 = Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IL-1 β = Interleucina – 1beta

IL-2 = Interleucina 2

IL-6 = Interleucina 6

IL-6R = Receptor da Interleucina- 6

iNOS = Óxido nítrico sintase indutiva
ISO = *International Standardization Organization*
JAKs = Janus cinases
JNK = c-jun NH₂ terminal
KCl = Cloreto de potássio
KH₂PO₄ = Fosfato monobásico de potássio
LPS = Lipopolissacarídeos
MAPK = Proteínas cinases ativadas por mitógenos
MTT = *3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
Na₂HPO₄ = Fosfato de sódio dibásico
NaCl = Cloreto de sódio
NaNO₂ = Nitrito de Sódio
NaOH = Hidróxido de sódio
NFAT = Fator Nuclear Ativador de Células T
NF-κB = Fator nuclear kappa B
NHE3 = Trocador" sódio/hidrogênio
nNOS = Óxido nítrico sintase neuronal
NO = Óxido nítrico
NOS = Óxido Nítrico Sintase
OECD = *Organisation for Economic Cooperation and Development*
PBS = Solução salina tamponada sem cálcio e magnésio
PCR = Proteína C Reativa
PDE = Fosfodiesterases
PI = Iodeto de Propídeo
PI3K-Akt = Fosfatidilinositol 3 cinase
PKA = Proteína Cinase A
RNAm = RNA mensageiro
SDS = Lauril sulfato de sódio
STAT = *Signal transduction and transcription*
TEMED = Tetrametiletenodiamina
TLR4 = Receptor do Tipo Toll 4
TNF-α = Fator de Necrose Tumoral alfa
TNFR1 = Receptor do TNF-alfa 1

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 Fármacos nefrotóxicos..... | 19 |
| 1.2 Morte celular..... | 23 |
| 1.3 Citocinas..... | 25 |
| 1.4 Óxido Nítrico..... | 27 |
| 1.5 Transdução de sinais..... | 30 |
| 1.5.1 Proteína Cinase A (PKA)..... | 31 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 36 |
| 3. OBJETIVO GERAL | 36 |
| 3.1 Objetivos específicos..... | 37 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 4.1 Reagentes..... | 38 |
| 4.2 Soluções..... | 38 |
| 4.3 Cultivo Celular..... | 44 |
| 4.4 Contagem celular utilizando azul de Trypan..... | 45 |
| 4.5 Determinação do “doubling time” das células..... | 45 |
| 4.6 Ensaios de viabilidade celular..... | 46 |
| 4.7 Avaliação de Morte Celular por Citometria de Fluxo..... | 47 |
| 4.8 Avaliação do envolvimento da via PKA na viabilidade celular..... | 48 |
| 4.9 Avaliação da recuperação celular..... | 49 |
| 4.10 Efeitos do inibidor da proteína Cinase A (PKA) na produção de IL-6 e TNF- α em células renais..... | 51 |
| 4.11 Efeitos do inibidor da Proteína Cinase A (PKA) na produção do NO em células renais..... | 51 |
| 4.12 <i>Western Blot</i> | 52 |

| | |
|--|-----------|
| 4.13 Análise Estatística..... | 53 |
| 5. RESULTADOS..... | 54 |
| 5.1 Determinação do “double time” das células..... | 54 |
| 5.2 Avaliação da Viabilidade celular utilizando Vermelho Neutro e MTT.... | 55 |
| 5.3 Avaliação de Morte celular por Citometria de Fluxo..... | 59 |
| 5.4 Avaliação do envolvimento da via PKA na viabilidade celular..... | 60 |
| 5.5 Avaliação da recuperação celular..... | 62 |
| 5.6 Avaliação do envolvimento das vias PKA na capacidade de recuperação celular..... | 66 |
| 5.7 Efeitos do inibidor da proteína Cinase A (PKA) na produção de IL-6 e TNF- α em células renais..... | 67 |
| 5.8 Efeitos do inibidor da Proteína Cinase A na produção do NO em células renais..... | 71 |
| 5.9 <i>Western Blot</i> | 73 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 76 |
| 6.1 Avaliação da Viabilidade celular utilizando Vermelho Neutro e MTT.... | 76 |
| 6.2 Avaliação de Morte celular por Citometria de Fluxo..... | 81 |
| 6.3 Envolvimento da via PKA..... | 83 |
| 6.4 Avaliação da recuperação celular..... | 84 |
| 6.5 Influência da via PKA na produção de IL-6 e TNF- α | 86 |
| 6.6 Influência da via PKA na produção de óxido nítrico..... | 89 |
| 6.7 Anfotericina B e Ciclosporina induzem a ativação da via PKA..... | 91 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 94 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 95 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 96 |
| ANEXO – Artigos científicos decorrentes deste trabalho..... | 112 |

1. INTRODUÇÃO

Os rins representam o maior alvo para xenobióticos tóxicos devido ao seu papel no controle de fluidos corporais e homeostase de eletrólitos. A alta taxa de perfusão sanguínea e a capacidade de metabolizar, concentrar, extrair e secretar compostos tóxicos torna os rins extremamente vulneráveis a uma larga variedade de toxinas. A indução nefrotoxicidade pelos xenobióticos é a maior causa de falência renal aguda e crônica e representam um significativo desafio para as indústrias farmacêuticas. Devido à heterogenicidade funcional e bioquímica dos néfrons, a susceptibilidade a nefrotoxicidade pode variar entre os segmentos dos néfrons (Wilmes et al., 2011). De acordo com a região renal afetada (túbulos distais e/ou proximais) os biomarcadores de nefrotoxicidade também podem ser diferenciados (Hoffmann et al., 2010).

Dentre os efeitos tóxicos promovidos por produtos terapêuticos, a nefrotoxicidade é um dos maiores fatores que acometem os pacientes e que, obrigatoriamente, leva os mesmos ao abandono da terapia à qual estão submetidos. A indução de toxicidade renal por fármacos é uma reação adversa freqüente com conseqüências graves para a saúde dos pacientes. De 100 fármacos usadas nas unidades de terapia intensiva, 25% apresentam potencial nefrotóxico (Peyrou & Cribb, 2007), destacando-se a Anfotericina B e a Ciclosporina (Walker & Endre, 2008). Das internações hospitalares devido a lesões renais agudas, 20% são decorrentes da nefrotoxicidade induzida por fármacos (Shahbazi et al., 2012). Assim, aperfeiçoar o entendimento dos mecanismos de ação desses toxicantes é necessário. Como a toxicidade é geralmente diretamente relacionada às perturbações biológicas no nível celular, aumentar o conhecimento das mesmas e suas conseqüências para a função celular é essencial (Van de Water et al., 2006).

Na indústria farmacêutica, o rim é um dos órgãos mais avaliados durante avaliações de segurança pré-clínica. O papel crucial dos rins na excreção de fármacos e detoxificação fazem deles um dos principais órgãos envolvidos na

toxicidade de fármacos e um importante alvo para estudos toxicológicos. A exposição dos rins a elevados níveis de fármacos e/ou seus metabólitos pode provocar danos celulares inicialmente devido à alta taxa de filtração sanguínea, *clearance* e metabolismo de xenobióticos. Entretanto, somente 7% dos novos fármacos apresentam falhas nos estudos pré-clínicos decorrente do surgimento da nefrotoxicidade, enquanto a incidência de lesões renais aguda em pacientes nas unidades de terapia intensiva é de cerca de 30 a 50% (Fuchs & Hewitt, 2011).

Estratégias preventivas tais como a hidratação, evitar o uso simultâneo de fármacos nefrotóxicos, ajuste das concentrações com base na função renal, uso de medicação alternativa com nenhum ou menor potencial nefrotóxico e administração preventiva de fármacos antioxidantes têm sido propostas para minimizar a nefrotoxicidade induzida por fármacos. Como a nefrotoxicidade induzida por fármacos continua a ser uma importante causa de morbidade e mortalidade (Shahbazi et al., 2012), aperfeiçoar o conhecimento sobre os mecanismos de nefrotoxicidade é necessário, o que pode ser possível com o emprego de técnicas bioquímicas.

Em 1959 Russell e Burch (Russell & Burch, citado por Spielmann et al., 2008) criaram o conceito dos 3R's (*Reduction, refinement and replacement* - Reduzir, refinar e substituir). A partir desse fato iniciou-se um movimento com extensiva pressão, tanto da sociedade quanto da comunidade científica, para diminuir o uso de animais nos testes experimentais. Tal conceito vem sendo internalizado por institutos de pesquisas científicas de diversos países que desenvolvem métodos alternativos ao uso de animais. Linhagens celulares renais têm sido descritas como importantes ferramentas para o estudo de produtos terapêuticos que induzem a nefrotoxicidade (Pfaller & Gstraunthaler, 1998; Price et al., 2004; Lincopan et al., 2005; Jung et al., 2009) e a tecnologia de culturas celulares permite o estudo de vias específicas em nível celular sem a influência de outros sistemas (Wilmes et al., 2011). O aumento do uso de técnicas *in vitro* que utilizam células renais isoladas, fragmentos de néfrons ou culturas celulares derivadas de tipos celulares renais específicos têm

aperfeiçoado a compreensão do mecanismo molecular envolvido na nefrotoxicidade (Pfaller & Gstraunthaler, 1989).

A linhagem celular LLC-PK1 é uma linhagem de células de rins de porco que possui características do túbulo proximal (como sistemas de transporte dependente de sódio - Na^+ , enzimas localizadas na membrana apical incluindo fosfatase alcalina e glutamiltanspeptidase) sendo, portanto, uma ferramenta de relevância para examinar funções do túbulo proximal (Nielsen et al., 1998; Ramseyer & Garvin, 2013). Além disso, são modelos aceitos de células do túbulo proximal para o estudo da toxicidade da Gentamicina (Servais et al., 2006), para estudar apoptose e necrose ocasionadas pela Ciclosporina (Nascimento et al., 2005) e Anfotericina B (Yano et al., 2009).

As células MDCK (modelo de células dos túbulos distais - Ramseyer & Garvin, 2013) também são bastante empregadas em estudos de nefrotoxicidade (Yuan et al., 2011; Shin et al., 2010; Van der Harst et al., 2005; Jeon et al., 2005; Rezzani et al., 2002). A linhagem celular MDCK é um sistema bem definido de cultura celular que mantém a polaridade morfológica característica das células epiteliais dos túbulos renais 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 retém respostas apropriadas a hormônios, assim como a sistemas de transporte, como a bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ (Matlhagela & Taub, 2006).

As células LLC-PK1 exibem alta atividade de enzimas da membrana apical quando comparadas com as células MDCK, em que alta atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ pode ser detectada (Pfaller & Gstraunthaler, 1985).

Ambas as linhagens são bastante empregadas em estudos que avaliam a participação da proteína cinase A (PKA) em diversos processos celulares

(Katsura et al., 1997; Liu et al., 2001; Amsler, 2005; Raychowdhury et al., 2004, Burgos et al., 2004; Gekle et al., 1997; Kohler et al., 2004).

Os ensaios *in vitro* apresentam algumas vantagens em relação aos testes *in vivo* uma vez que fornecem melhor controle sobre as condições experimentais, o que permite melhor reprodutividade dos ensaios e resultados, simplicidade, rapidez, diminuição do custo com a consequente redução do número de animais utilizados nos experimentos. 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.

1.1 Fármacos nefrotóxicos

A Anfotericina B (agente antifúngico) e a Ciclosporina (agente imunossupressor) são fármacos amplamente utilizados na clínica médica, porém, podem ocasionar nefrotoxicidade (Nascimento et al., 2005; Van der Harst et al., 2005; Jennings et al., 2009; Balakumar et al., 2010; Mukherjee et al., 2010).

A Anfotericina B, um antibiótico macrolídeo poliênico, é a fármaco mais efetivo para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes com câncer, AIDS e transplantados (Yano et al., 2009). Além disso, é um dos mais importantes fármacos para o tratamento de leishmaniose visceral (Iman et al., 2011). Entretanto, o uso clínico desse agente antifúngico é frequentemente limitado por sua severa nefrotoxicidade, cuja incidência está entre 49 e 65% (Yano et al., 2009).

O mecanismo clássico de ação da Anfotericina B é que a sua estrutura poliênica (Figura 1) permite a ligação ao ergosterol, o principal esteroide presente na membrana dos fungos. A parte polar da molécula é orientada para o interior do ergosterol, com os grupos hidroxilas formando um canal central. A

cadeia poliênica interage via forças de *Van der Waals* com moléculas de esterol/colesterol e fosfolípidos de membrana. Devido à formação de poros em sua membrana, o organismo alvo sensível perde sua integridade celular, a qual pode ser monitorada pelo rápido efluxo de potássio (Lemke et al., 2005). A ligação do fármaco ao ergosterol causa um aumento da permeabilidade da membrana fúngica, vazamento de eletrólitos e morte celular (Fukasawa, 2005). Nas células dos mamíferos, o fármaco se liga ao colesterol das membranas, o que provoca a formação de poros e danos renais (Yano et al., 2009). Também tem sido sugerido que a Anfotericina B pode ser auto-oxidada com a subsequente produção de radicais livres e em *Candida albicans*, a Anfotericina B induz apoptose através da produção de espécies reativas de oxigênio (Sangali-Leite et al., 2011).

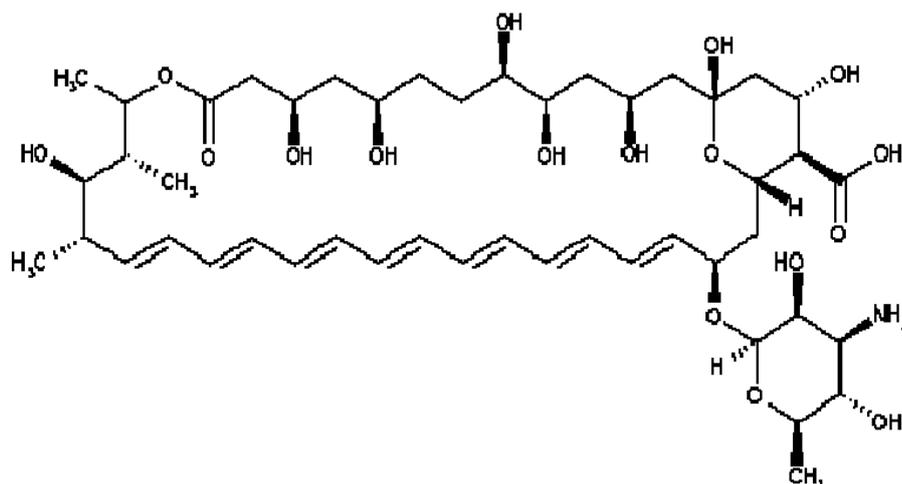


Figura 1. Estrutura química da Anfotericina B. Fonte: Gil et al., 2007.

Embora os mecanismos exatos pelos quais a Anfotericina B ocasiona nefrotoxicidade ainda não tenham sido totalmente esclarecidos, muitos mecanismos vem sendo postulados e incluem vasoconstrição e/ou ação tóxica direta nas células tubulares epiteliais renais (Yano et al., 2009; Leon et al., 2005). A Anfotericina B estimula a transcrição e produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina – 1beta (IL-1 β) e prostaglandinas (Mukherjee et al., 2010).

A Ciclosporina é um dos fármacos imunossupressores mais prescritos para o tratamento de pacientes transplantados ou com doenças autoimunes (Shrikant et al., 2011). É um peptídeo cíclico de 11 aminoácidos (Figura 2), extraído do fungo *Hypocladium inflatum*, cuja ação imunossupressora depende da formação de um complexo heterodimérico com seu receptor citoplasmático, a ciclofilina. A ciclofilina é uma peptidil-prolil-isomerase que se liga a e inibe a atividade fosfatase da calcineurina, o que resulta na inibição da expressão de genes de proteínas nucleares envolvidas na ativação celular e formação de linfócitos T citotóxicos. Um destes substratos é o Fator Nuclear Ativador de Células T (NFAT), um dos responsáveis pela ativação do gene da interleucina 2 (IL-2), cujo bloqueio é considerado o principal efeito da Ciclosporina (Figura 3) (Kahan, 1989; Fruman et al., 1992).

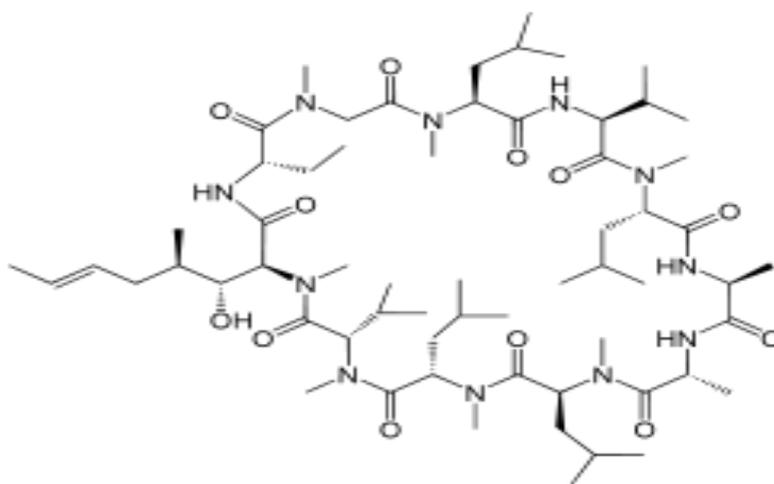


Figura 2. Estrutura química da Ciclosporina. Fonte: Zanini et al., 2007.

A Ciclosporina modifica diferentes aspectos da função celular: a partir da ativação de receptores hormonais, vias de segundos mensageiros, transcrição e tradução de RNA mensageiro (RNAm), alteração na síntese e formação de proteínas, mudanças no metabolismo celular, mudanças na hemodinâmica renal e, finalmente, mecanismos de reparo celular e expressão de várias citocinas e fatores de crescimento, todos os quais contribuem para a expressão final da nefrotoxicidade (Walker & Endre, 2008). A vasoconstrição induzida pela Ciclosporina resulta em hipóxia renal, o que leva a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam lesão celular e promovem morte

celular (Bobadilla & Gamba, 2007). O mecanismo pelo qual a Ciclosporina induz a geração de EROs permanece desconhecido, embora disfunção mitocondrial pareça ter um papel importante (Wilmes et al., 2011).

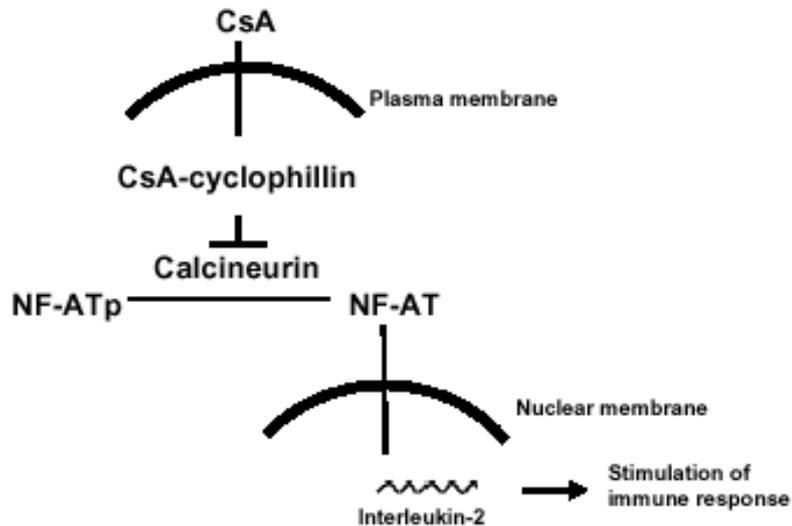


Figura 3. Ação da Ciclosporina. Fonte: Nabel, 2004.

A Ciclosporina pode causar vasoconstrição renal e sistêmica por meio do aumento da liberação de endotelina-1, ativação do sistema renina-angiotensina, aumento da produção de tromboxano A₂ e diminuição da produção de vasodilatadores como óxido nítrico e prostaciclina (Fadili et al., 2013). Pode induzir danos reversíveis e irreversíveis a todos os compartimentos do rim, incluindo glomérulos, arteríolas e células tubulares, sendo que um desequilíbrio entre prostaglandinas vasodilatadoras/vasoconstritoras e estresse oxidativo podem ser responsáveis pela nefrotoxicidade induzida por este fármaco (Naesens et al., 2009). A Ciclosporina prejudica as funções renais e altera a morfologia através de múltiplos mecanismos incluindo hipoxia, geração de estresse oxidativo, inflamação e apoptose (Chander et al., 2005; Sanchez-Pozos et al., 2010).

Devido à sua alta lipofilicidade, a Ciclosporina pode ter um acúmulo significativo em certos órgãos e tecidos, principalmente nos rins (Jiang & Acosta, 1993) e estudos experimentais e clínicos demonstraram que a nefrotoxicidade da Ciclosporina é caracterizada pela sua acumulação em células tubulares renais (Lally et al., 1999).

1.2 Morte celular

As respostas de células tubulares renais a lesões incluem morte celular, diferenciação de células viáveis, proliferação, diferenciação e reconstituição do epitélio normal. Vias de morte celular são iniciadas pelas mesmas substâncias causadoras de estresse capazes de iniciar respostas adaptativas, incluindo isquemia e substâncias tóxicas. Quando houver falha na resposta adaptativa para recuperar a célula, a morte celular é iniciada por apoptose ou necrose. Estas respostas estão intimamente relacionadas aos eventos do ciclo celular que provocam recuperação ou morte celular. A distinção entre os modos de morte celular (apoptose ou necrose) é importante para definir estratégias terapêuticas (Walker & Endre, 2008).

A apoptose é um tipo de morte celular que ocorre de forma organizada e controlada. Esse processo de morte celular programada tem papel fundamental no desenvolvimento e na manutenção dos organismos. A apoptose também está envolvida na formação de tecidos, no desenvolvimento do sistema imune e na manutenção da homeostase uma vez que permite a eliminação de células e tecidos lesados (Kerr et al., 1972). As células que entram em apoptose, inicialmente, sofrem retração e a membrana celular envolve partes do citoplasma formando vesículas chamadas corpos apoptóticos. Ao final, os fragmentos das células são removidos por fagócitos sem haver perturbação das células adjacentes (Wyllie et al., 1980; Savill & Fadok, 2000).

As alterações morfológicas observadas na apoptose são consequência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos e geneticamente regulados (Grivicich et al., 2007). Durante a apoptose observa-

se, também, condensação e fragmentação do núcleo (Robertson et al., 1978; Wyllie et al., 1980). Organelas como o complexo de Golgi, o retículo endoplasmático e as mitocôndrias são fragmentadas (Frank et al., 2001; Lane et al., 2002). A fragmentação atinge não apenas estruturas, mas moléculas como o DNA e proteínas. Sabe-se que a clivagem de proteínas durante a apoptose é realizada, principalmente, por caspases (Nicholson, 1999; Creagh et al., 2003).

A necrose é, geralmente, considerada um tipo de morte celular não programada. Nesse processo, há aumento do volume celular, hidrólise do DNA e perda da integridade de membranas, inclusive de lisossomos. Com a lise da célula, o conteúdo intracelular é liberado e induz resposta inflamatória e imune no tecido adjacente (Kumar et al., 2005). Apesar de ser normalmente tida como um processo desordenado, estudos demonstram que a necrose é controlada pela interação de diferentes vias de sinalização (Festjens et al., 2006; Golstein & Kroemer, 2007).

A homeostasia celular é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas (Grivicichi et al., 2007). As mitocôndrias possuem um papel central nas células em apoptose, através do aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, diminuição do potencial transmembrana, liberação de Citocromo C e fator indutor de apoptose (AIF) e produção de espécies reativas de oxigênio. Membros da família anti-apoptótica Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL) podem bloquear estes eventos mitocondriais, enquanto membros pro-apoptóticos da família Bcl-2 (Bax, Bak, Bad) podem favorecer tais eventos (Park et al., 2005). Estudos anteriores mostraram que a translocação do Bax para a mitocôndria pode alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial externa, o que provoca a liberação de Citocromo C no citosol (Goping et al., 1998) e ativação da cascata de caspases que levam a morte celular apoptótica (Park et al., 2005).

Agentes nefrotóxicos são capazes de induzir apoptose ou necrose em vários órgãos. O grau de dano celular depende da célula alvo e do agente

tóxico e a ativação de mediadores de morte e/ou fatores de sobrevivência pode levar a apoptose ou necrose. Células renais são capazes de produzir fatores de sobrevivência intrínsecos como o fator de crescimento IGF-1, prostaglandinas derivadas da ciclooxigenase-2 e eicosanoides, os quais facilitam recuperação (ou evitam lesão tóxica). É consensual que diferentes tipos celulares requerem diferentes mediadores para sofrer apoptose ou sobreviver a lesões tóxicas (Varlam et al., 2001).

As células respondem aos estresses fisiológicos e patológicos de diferentes maneiras, incluindo adaptação, reparo ou detendo o crescimento celular. Proliferação celular é um processo rigorosamente regulado que envolve uma sequência ordenada de eventos moleculares que asseguram que, antes da divisão, as células tenham uma completa replicação do DNA e segregação cromossômica. A proliferação das células tubulares renais possui um papel chave no reparo celular em consequência de lesão tóxica ou isquêmica e a interrupção do crescimento celular mediado por agentes nefrotóxicos pode ter implicações na regeneração das células tubulares. Portanto, conhecer como determinadas vias estão envolvidas nos mecanismos de morte e recuperação celular é importante para auxiliar na terapêutica da nefrotoxicidade.

1.3 Citocinas

As citocinas podem estar envolvidas nos mecanismos de nefrotoxicidade da Anfotericina B e Ciclosporina e dentre as citocinas pró-inflamatórias que têm sido associadas à fisiopatologia da doença renal destacam-se a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral (TNF- α) (Vianna et al., 2011). Especificamente no tecido renal, as citocinas induzem proliferação local de células tubulares e intersticiais, síntese de matriz extracelular, atividade pró-coagulante do endotélio, formação de espécies reativas de oxigênio e aumento da expressão de moléculas de adesão e lípidos biologicamente ativos (Rao et al., 2007). Citocinas pró-inflamatórias contribuem no desenvolvimento de

espécies reativas de oxigênio e desenvolvimento de disfunção mitocondrial (Weil et al., 2010).

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que possui um papel importante na inflamação aguda e na evolução para o estado inflamatório crônico (Fonseca et al., 2009). É produzida por diversos tipos celulares como as células T, células B, monócitos, fibroblastos, osteoblastos, queratinócitos, células endoteliais, células mesangiais e algumas células tumorais (Kishimoto, 1989). A IL-6 se liga especificamente ao receptor da IL-6 (IL-6R), formando o complexo IL-6/IL-6R que se liga a gp130, uma proteína de membrana, envolvida na transdução de sinal. Há a ativação de vias de sinalização intracelulares incluindo a Janus cinases (JAKs) Jak1 e Jak2, STAT1 e STAT3 e fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Fonseca et al., 2009). A IL-6 induz a diferenciação de linfócitos B em células produtoras de anticorpos e a produção de proteínas de fase aguda como Proteína C Reativa (PCR) e fibrinogênio. Além disso, esta citocina estimula a proliferação de células renais mesangiais (Yvan-Charvet et al., 2009).

A produção de IL-6 é aumentada por uma variedade de estímulos, incluindo citocinas (IL-1 e TNF- α), forskolina (ativador da Proteína cinase A - PKA), ésteres de forbol, e lipopolissacarídeos (LPS) (Stein e Sutherland, 1998).

TNF- α é o protótipo da citocina inflamatória e possui um papel central em muitas doenças infecciosas e inflamatórias e pode ser produzido por uma variedade de células não-imunes e imunes (Miller et al., 2010), como linfócitos, macrófagos e células endoteliais e epiteliais. Infiltrados de células inflamatórias, células mesangiais, células epiteliais dos túbulos proximais, alça de henle e dos ductos coletores são fontes de TNF- α nos rins. TNF- α aumenta em resposta a endotoxemia, lipopolissacarídeos, hipertensão, falência renal, glomerulonefrites, nefropatia diabética e nefrite tubular intersticial. TNF- α também é aumentado na doença renal crônica, que é caracterizada por progressiva perda da função renal, lesão renal e hipertensão (Yeo et al., 2010).

Um aumento na expressão renal de TNF- α foi demonstrado em camundongos com nefrotoxicidade induzida pela Cisplatina (Miller et al., 2010).

Situações que estimulam a produção de TNF- α incluem ativação do Receptor do Tipo Toll 4 (TLR4) por LPS e estresse oxidativo (Ebenezer et al., 2009). Em geral, TNF- α ativa muitas vias de sinalização como o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) incluindo cinase regulada por sinal extracelular (ERK), p38 MAPK e c-jun NH₂ terminal (JNK) (Baud & Karin, 2001). A via fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K)-Akt e PKA também podem ser ativadas pelo TNF- α (SAITO et al., 2010).

Elevações nos níveis de TNF- α renal aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio e expressão de moléculas de adesão endoteliais e quimiocinas nos rins. Alguns autores relatam que o TNF- α induz danos renais (Ramseyer & Garvin, 2013) provavelmente devido às ações diretas do TNF- α nas células renais (Ortiz et al., 2001). O receptor do TNF- α 1 (TNFR1) contém um domínio de morte e as ações proapoptóticas são atribuídas a esse receptor (Itoh & Nagata, 1993).

1.4 Óxido Nítrico

A vasoconstrição renal pode ser atribuída a um desequilíbrio na liberação de substâncias vasoativas, incluindo a redução de fatores vasodilatadores, especialmente óxido nítrico (NO) (Shihab et al., 2000; Yoon & Yang, 2009). Em condições fisiológicas, o óxido nítrico atua como um segundo mensageiro importante para o relaxamento dos vasos sanguíneos, atuando também na regulação da função imune como neurotransmissor. O óxido nítrico é um mediador pró-inflamatório (Park et al., 2013) formado a partir da L-arginina pela Óxido Nítrico Sintase (NOS) e é importante para o controle do tônus vascular renal e hemodinâmica renal (Romero et al., 1992) e possui efeitos diretos nos processos vascular, inflamatórios e celulares (Hegarty et al., 2002). A síntese do Óxido Nítrico resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidínicos

da L-arginina, que é convertida em L-citrulina e óxido nítrico (Figura 4) (Berg et al., 2008). A decomposição do óxido nítrico resulta na formação de nitrito e nitrato, que são frequentemente utilizados como indicadores da produção de NO pelas células (Oga et al., 2008).

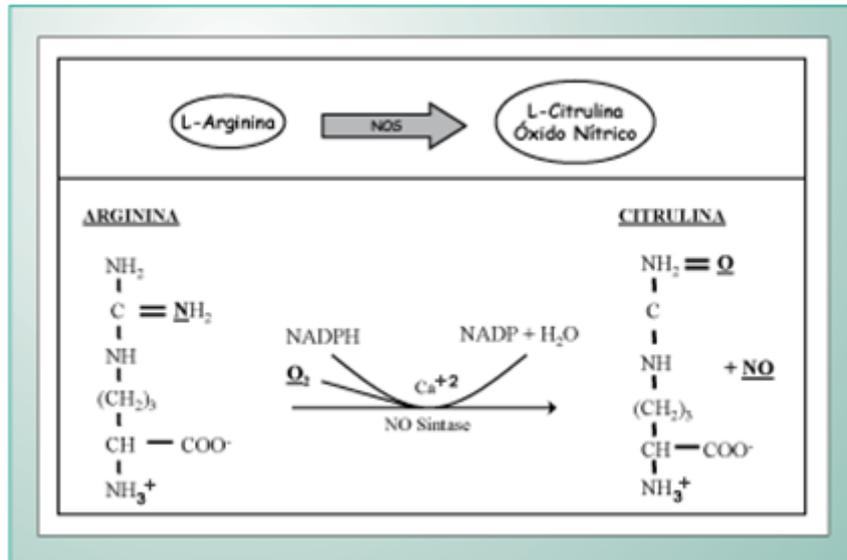


Figura 4. Formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da arginina pela ativação da enzima Óxido Nítrico Sintase (NOS) (adaptado de Lehninger, 2002).

A família de NOS apresenta 3 isoformas: 2 constitutivas (Óxido nítrico sintase neuronal - nNOS, Óxido nítrico sintase endotelial - eNOS), que são dependentes dos íons cálcio e da calmodulina e que está envolvida diretamente na sinalização celular. A outra forma é a indutiva (iNOS) que sob condições fisiológicas não é expressa e não requer cálcio e calmodulina como cofatores, sendo expressa em resposta a citocinas e endotoxinas. Todas as três isoformas de NOS estão presentes nos rins (Star RA., 1997) e são induzidas por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células incluindo macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (Guzik et al., 2003).

A modulação do fluxo sanguíneo cortical e medular pode ser fundamental para as ações de vários compostos nefrotóxicos. A heterogeneidade da

distribuição da óxido nítrico sintase (NOS) dentro dos rins influencia essas diferenças regionais de perfusão renal e contribui para a lesão citotóxica (Star RA., 1997). NO formado a partir da eNOS está envolvido na regulação e manutenção do fluxo sanguíneo e NO sintetizado pela nNOS na macula densa é importante na modulação do *feedback* tubuloglomerular e regulação da taxa de filtração glomerular. iNOS está presente nos túbulos dos rins de ratos, predominantemente na alça ascendente, mas seu envolvimento na regulação da função renal sobre condições fisiológicas normais é desconhecido. Estudos quantitativos da atividade de NOS e produção de NO sugerem que a medula renal é o principal local para a síntese basal de NO nos rins, o que sugere um importante papel do NO na regulação da circulação medular.

A resistência vascular renal é aumentada pela inibição da NOS, o que resulta em hipertensão e diminuição do fluxo plasmático renal (Lahera et al., 1991). Doenças renais em pacientes são acompanhadas por redução na produção de NO (Hannedouche et al., 1993).

Muitos estudos tem mostrado o papel do NO na nefrotoxicidade da Anfotericina B, entretanto, isto não está bem definido. Embora estudos tenham relatado que a Anfotericina B pode prejudicar a produção de NO (Chander et al., 2005), outros estudos demonstraram que a síntese de NO está bem preservada ou ligeiramente aumentada na nefrotoxicidade da Anfotericina B (Bobadilla et al., 1994). A Ciclosporina prejudica as funções renais através de múltiplos mecanismos incluindo hipoxia, geração de estresse oxidativo e inflamação (Chander et al., 2005; Sanchez-Pozos et al., 2010) e a modulação do óxido nítrico contribui para a toxicidade da Ciclosporina (Walker & Endre, 2008).

Assim, como os mecanismos de nefrotoxicidade são complexos e vários parâmetros estão envolvidos, conhecer como determinadas vias de sinalização participam da nefrotoxicidade é de extrema importância para auxiliar no desenvolvimento de métodos alternativos para prevenção/diminuição deste efeito. Alterações nas vias de sinalização podem ser causadas por eventos iniciais da nefrotoxicidade de fármacos e podem prejudicar a recuperação

celular (Walker & Endre, 2008). O entendimento dos sinais envolvendo a sinalização de morte celular e a contribuição dos vários componentes moleculares dessas vias na lesão renal são aspectos importantes que devem ser compreendidos (Padanilan, 2003).

1.5 Transdução de sinais

As vias de sinalização celular são responsáveis por receber um sinal, transmitir e amplificá-lo, provocando respostas celulares apropriadas (Gertids et al., 2008). As proteínas cinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para treonina, serina (cinase específica para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina (cinase específica para Tyr) presentes em algum substrato protéico. A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extra e intracelular, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas (Silva et al., 2009).

A ativação de proteínas cinases é fundamental na regulação da expressão de vários genes. Muitas proteínas cinases existem e cada uma tem uma função celular própria, a qual depende da localização celular e da disponibilidade de substrato. Substratos incluem fatores de transcrição que tornam ativados após fosforilação e, portanto, afetam a expressão gênica resultando em uma resposta biológica definida. Proteínas cinases também modulam a fosforilação de muitas outras proteínas que não afetam a expressão gênica diretamente, mas podem afetar outros eventos/comportamentos celulares. A atividade de proteínas cinases é contra balanceada pela atividade de proteínas fosfatases, as quais catalisam a reação de hidrólise do fosfato. O balanço entre várias proteínas cinases e fosfatases que são ativadas/desativadas em condições de estresse celular determina o resultado biológico: sobrevivência celular ou morte celular, diferenciação, mitogênese, etc (Van de Water et al., 2006). Diante disso, um detalhado entendimento do mecanismo de controle das proteínas cinases é foco de interesse de muitas pesquisas (Silva et al., 2009).

1.5.1 Proteína Cinase A (PKA)

A via de sinalização PKA é caracterizada em detalhes em vários tipos celulares (Tasken & Aandahl, 2004) e a PKA fosforila substratos que controlam diversos fenômenos celulares. PKA é uma cinase serina/treonina que na sua forma inativa consiste em um tetrâmero composto por 2 subunidades regulatórias (R) e 2 subunidades catalíticas (C). Cada subunidade R contém 2 sítios de ligação para o monofostato de adenosina 3,5 cíclico (AMPc), um segundo mensageiro celular. Após a ligação do AMPc ao sítio regulatório ocorre a dissociação das subunidades regulatórias e catalíticas e as 2 subunidades catalíticas são liberadas, permitindo que elas catalisem a fosforilação de proteínas em resíduos regulatórios (Figura 5). Após ativação do receptor acoplado proteína G, a proteína trimerica $G\alpha\beta\gamma$ dissocia-se na subunidade ativa $G\alpha$, ligada ao GTP. A $G\alpha$ ligada ao GTP ativa a adenil ciclase (AC), a qual gera AMPc a partir do ATP. Na sequência, AMPc se liga às subunidades regulatórias (R) da PKA e induz dissociação da holoenzima. As subunidades catalíticas (C) podem então fosforilar seus substratos. Fosfodiesterases (PDE) hidrolizam AMPc em AMP. Ambas as subunidades regulatória e catalítica possuem propriedades físicas e biológicas distintas, sendo diferentemente expressas e capazes de formar diferentes formas de PKA.

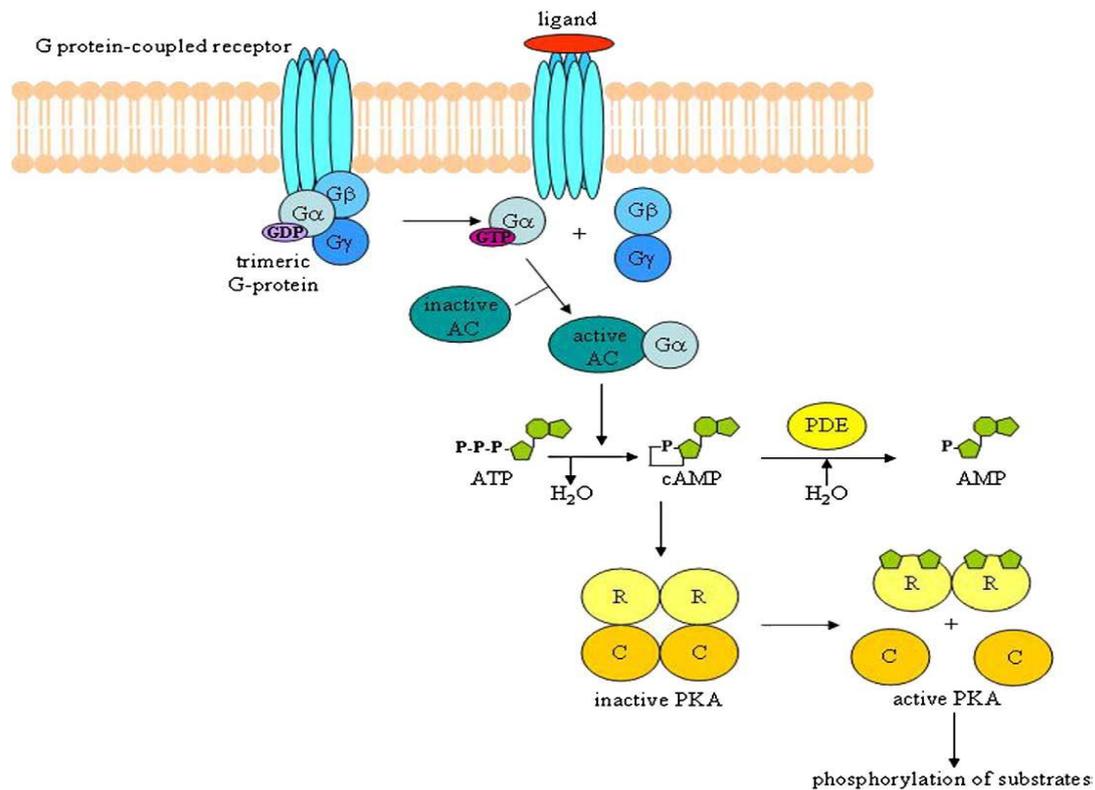


Figura 5. Diagrama esquemático da via de sinalização PKA/AMPc. (Fonte: Gerits et al., 2008).

Duas classes de isoenzimas da PKA, designadas como tipo I e tipo II, foram identificadas e diferem no conteúdo das subunidades R, chamadas RI e RII, respectivamente. Através das técnicas de clonagem molecular, a heterogeneidade das subunidades foi identificada: RI α , RI β , RII α e RII β , assim como as subunidades C (C α , C β , C γ). As subunidades R exibem diferentes afinidades de ligação ao AMPc, com diferentes limiares para ativação. A PKA tipo I possui maior afinidade de ligação para o AMPc, sendo ativada com menores concentrações. As subunidades R são expressas de maneira diferenciada em diferentes células e tecidos e são capazes de formar homo e heterodímeros gerando um grande número de combinações, os quais contribuem para especificidade e diversidade da via de sinalização do AMPc.

A compartimentalização e os alvos intracelulares da PKA são controlados através da associação com as proteínas de ancoramento de cinases (AKAPs) (Figura 6). AKAPs pertencem a uma família estruturalmente

diversa de proteínas funcionais e elas são definidas com base na sua habilidade de ligação à PKA. As AKAPs contribuem ainda mais para a especificidade e versatilidade da via AMPc-PKA por montar complexos de sinalização multiproteicos que permitem a finalização do sinal pelas fosfatases e o “cross-talk” entre diferentes vias de sinalização localizadas próximas ao substrato. Ligação do ligante a receptores acoplados a proteína G ativa Adenil Ciclases nas suas proximidades e gera AMPc. A concentração local e distribuição do gradiente de AMPc é limitado pela presença das fosfodiesterases (PDEs). As estruturas subcelulares podem abrigar isozimas específicas da PKA através de ancoramento com as AKAPs (Diviani & Scott, 2001).

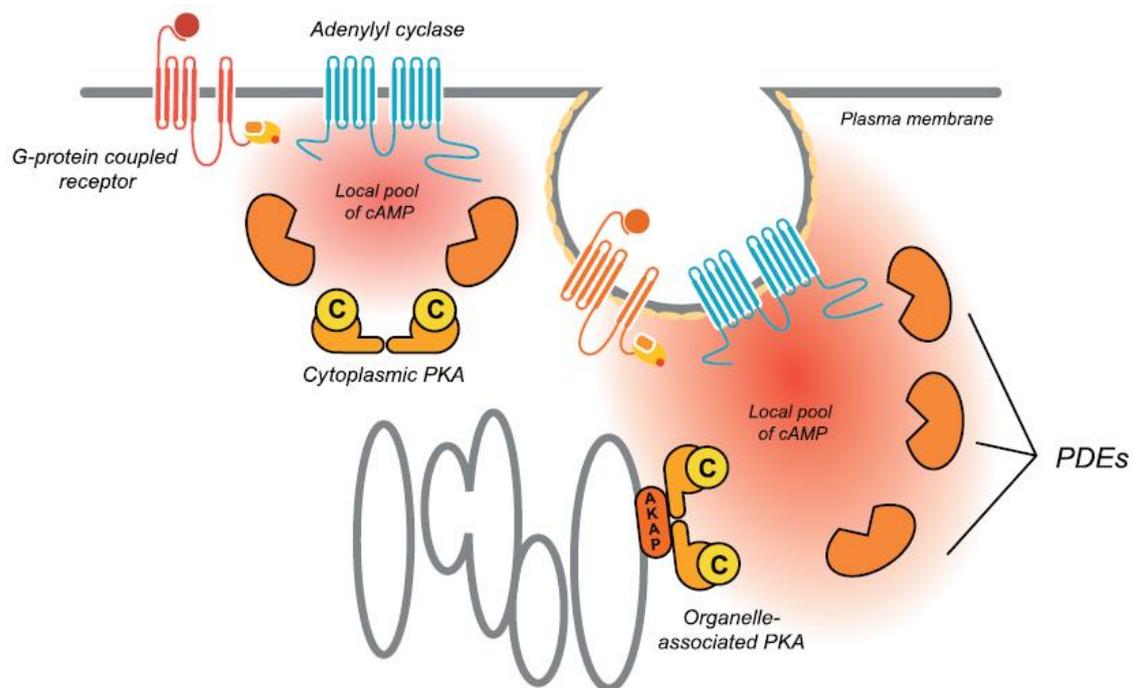


Figura 6. Ligação da PKA a AKAPs. Fonte: Tasken & Aandahl, 2004.

A localização celular da PKA depende do ancoramento das subunidades R pelas AKAPs, que contribuem para realçar a eficiência e a especificidade dos eventos de sinalização. Enquanto a PKA tipo I é classicamente conhecida por ser bioquimicamente solúvel e assim citoplasmática, a PKA tipo II é tipicamente

particulada e confinada às estruturas subcelulares e ancoradas pelas AKAPs a células e tecidos específicos (Tasken & Aandahl, 2004).

Sabe-se que a PKA possui especificidade pelos aminoácidos serina e treonina presentes em motivos específicos, fosforilados em resposta a diferentes sinais intra e extracelulares. A sinalização por esta cinase é crítica em todos os níveis de organização celular (Skalhegg, 1997). A ativação da PKA pode afetar uma ampla variedade de eventos celulares por fosforilação de proteínas citoplasmáticas e nucleares (Kopperud et al., 2003).

A via de sinalização da PKA é uma das vias mais comuns e versáteis presente nas células eucarióticas e está envolvida na regulação das funções celulares em quase todos os tipos de tecidos nos mamíferos, incluindo regulação do ciclo celular, proliferação e diferenciação, assim como regulação dos mecanismos de transporte intracelular e fluxo de íons (Bichet, 2006).

Especificamente nos rins, a PKA regula as fosforilações de moléculas transportadoras como o “trocaador” Na^+/H^+ (NHE3) e canal de Na^+ epitelial (ENaC), importantes para modular as taxas de transporte através das membranas das células renais (Gross et al., 2001). A PKA também é importante na regulação da reabsorção de água nas células renais, através da fosforilação dos canais de água - aquaporinas AQP-2 (Tasken & Aandahl, 2004). ENaC e AQP-2 são importantes no transporte de água e reabsorção de Na^+ nos ductos coletores e expressão aumentada de ENaC e AQP-2 provocam aumento na retenção de água e sódio (Edemir et al., 2008). Além disso, a cascata AMPc/PKA determina a transcrição de genes da renina-angiotensina (Pan et al., 2001).

Alguns autores tem relacionado a regulação da expressão de genes de citocinas com a via AMPc/PKA. (Grandjean-Laquerriere et al., 2003). O aumento dos níveis intracelulares de AMPc resulta em estimulação da PKA, fosforilação da proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc (CREB) (Figura 7) e ligação do CREB ao sítios do elemento responsivo ao AMPc (CRE) (Tan et al., 2007). Muitos relatos têm indicado que a via AMPc/PKA/CREB

regulam a resposta inflamatória mediada pelo fator nuclear kappa B (Park et al., 2013).

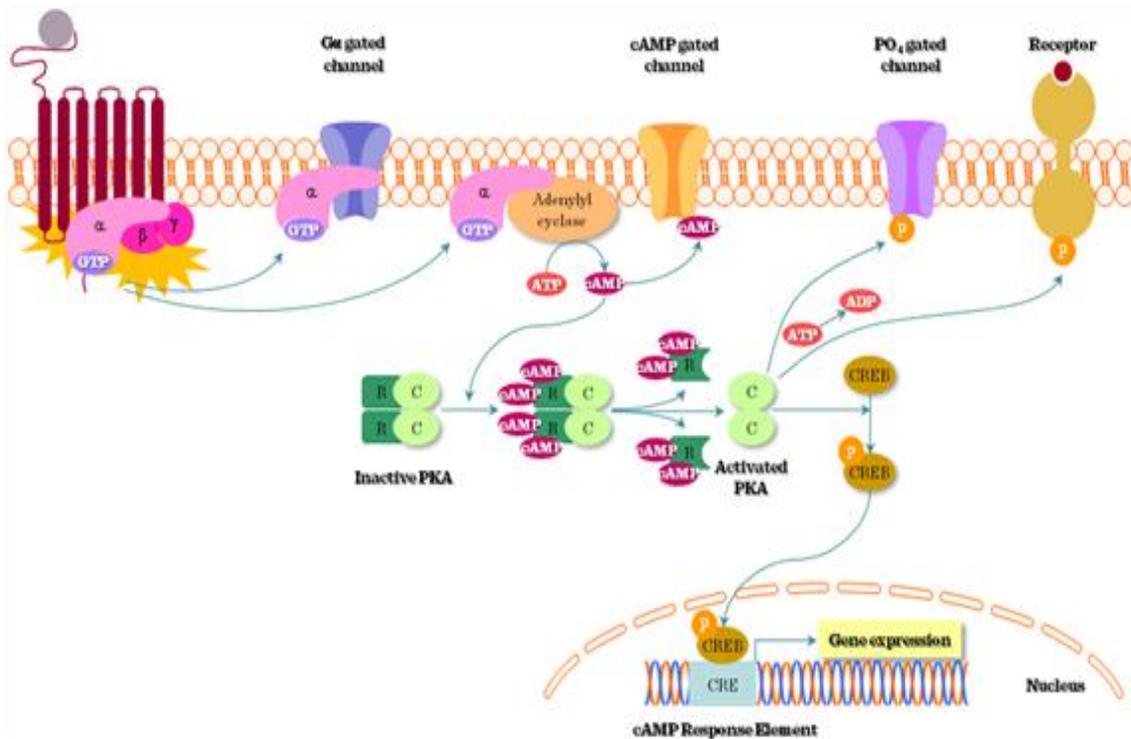


Figura 7. Ativação do CREB pela via AMPc/PKA.

http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0011_1A_Jelatvitel_en_book/c_h02s04.html

O CREB é um fator de transcrição que regula diversas respostas celulares, incluindo proliferação, sobrevivência e diferenciação. O CREB é induzido por uma variedade de fatores de crescimento e sinais inflamatórios e medeia a transcrição de genes que contem o elemento responsivo ao AMPc (CRE). Muitos genes relacionados com o sistema imune possuem o CRE, incluindo IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- α . Em adição, tem sido proposto que o CREB fosforilado diretamente inibe a ativação do NF- κ B por bloquear a ligação do CREB ao complexo NF- κ B, portanto limitando as respostas pró-inflamatórias (Wen et al., 2010).

Os mecanismos de sinalização usados pela via PKA para controlar a morte celular programada são complexos e tipo celulares específicos. Por

exemplo, AMPc medeia a ativação da PKA e estimula apoptose em timócitos (McConkey et al., 1990) e em linhagens celulares leucêmicas (Lanotte et al., 1991). As expressões de Bax e do fator indutor da apoptose são reguladas pela via de sinalização PKA (Park et al., 2005).

Há um mecanismo alternativo de ativação da PKA independente de AMPc. Em resposta a ativadores clássicos de NF- κ B (TNF- α e LPS) e a um aumento do influxo intracelular de sódio ocorre ativação da PKA de maneira independente do AMPc. A subunidade catalítica da PKA (PKAc) é liberada após dissociação de um complexo contendo PKAc/I κ B α /p65-NF- κ B (Vinciguerra et al., 2003). p65-NF- κ B pertence a uma família de fatores de transcrição do retículo endoplasmático liso que regulam a expressão de genes envolvidos na resposta imune e resposta inflamatória, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (Ghosh et al., 2002).

2. JUSTIFICATIVA

Como a via de sinalização da PKA está envolvida na regulação de diversas funções celulares como regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose, produção de citocinas e óxido nítrico decidimos avaliar como tal via está envolvida na nefrotoxicidade induzida pela Anfotericina B e Ciclosporina, a partir da avaliação de parâmetros de viabilidade celular, morte celular, recuperação celular, produção de citocinas pro-inflamatórias e óxido nítrico, a fim de buscar alternativas para auxiliar na diminuição/prevenção desse evento tóxico.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento da via de sinalização celular PKA na nefrotoxicidade ocasionada pela Anfotericina B e Ciclosporina utilizando linhagens celulares renais LLC-PK1 e MDCK.

3.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito citotóxico da Anfotericina B e Ciclosporina nas linhagens celulares LLC-PK1 e MDCK através das técnicas do Vermelho Neutro e MTT;
- ✓ Verificar se os fármacos provocam morte celular utilizando a técnica de Citometria de fluxo;
- ✓ Avaliar se as células LLC-PK1 e MDCK conseguem se recuperar da nefrotoxicidade ocasionada pela Anfotericina B e Ciclosporina e se a inibição da via PKA influencia este processo;
- ✓ Estudar se a via de sinalização celular PKA está envolvida na nefrotoxicidade ocasionada pela Anfotericina B e Ciclosporina nas células LLC-PK1 e MDCK utilizando as técnicas de Vermelho Neutro e Citometria de Fluxo;
- ✓ Verificar se os fármacos provocam a liberação de citocinas pro-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e óxido nítrico e se a via PKA esta envolvida nesse processo;
- ✓ Verificar se a Anfotericina B e Ciclosporina induzem a ativação da via PKA nas linhagens celulares renais LLC-PK1 e MDCK através da técnica de *Western Blot*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

1. Ácido acético glacial – ECIBRA
2. Ácido clorídrico – ECIBRA
3. Ácido etileno diamino tetracético (EDTA) - Sigma
4. Álcool etílico absoluto – SIGMA
5. Anfotericina B - CRISTÁLIA
6. Azul de Trypan - SIGMA
7. Bicarbonato de sódio – ECIBRA
8. Cloreto de cálcio – ECIBRA
9. Cloreto de Potássio - ECIBRA
10. Cloreto de sódio – ECIBRA
11. Dimetilsulfóxido – ECIBRA
12. Estreptomicina - SIGMA
13. Fosfato Dissódico – ECIBRA
14. Fosfato Monopotássico – ECIBRA
15. Hidróxido de sódio – VETEC
16. Meio de cultura RPMI 1640 - SIGMA
17. Penicilina G Potássica - SIGMA
18. Soro fetal bovino – GIBCO
19. H89 – CALBIOCHEM
20. Vermelho neutro - VETEC
21. MTT – Sigma
22. Iodeto de propídeo – SIGMA
23. Coquetel inibidor de proteases (SIGMA - P8340)
24. Ciclosporina – CRISTÁLIA
25. ECL - Amersham Biosciences
26. DTT - SIGMA
27. APS - SIGMA
28. Acrilamida - MERCK
29. Iodeto de propídeo – SIGMA
30. TEMED - SIGMA
31. SDS - SIGMA
32. Kits IL-6 e TNF- α - Enzo Life Sciences
33. Metanol PA - SIGMA

4.2 Soluções

1. *Solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS)*

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais: Na_2HPO_4 (1,15 g), KH_2PO_4 (0,20 g), NaCl (8,0 g), KCl (0,20 g), sendo o volume final completado para 1 litro com água ultra-pura. O pH da solução (7,3) foi acertado utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N. A solução final foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 μm (MILLIPORE).

2. Solução de Tripsina 0,20% e EDTA 0,02%

A Tripsina 1: 250 (2,0 g) foi dissolvida em 800 mL de PBS sob agitação constante e após 2 horas de agitação o EDTA foi adicionado (0,20 g) e volume completado para 1 litro com solução de PBS. O pH da solução foi acertado para 7,4 - 7,5 utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N e a solução filtrada em membrana de porosidade de 0,22 μm (MILLIPORE) e conservada a - 20 °C.

3. Solução de Penicilina/Estreptomicina

Primeiramente diluiu-se um frasco de penicilina G potássica 5.000.000 U e um frasco de estreptomicina 5 g em 250 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 μm e conservada a - 20 °C. A concentração final da solução estoque foi 200 U/mL de penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina.

4. Meio de cultura RPMI

Um frasco de RPMI (16,4 g) foi diluído em 900 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 2,2 g de bicarbonato de sódio. O volume final foi ajustado para 1000 mL e a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 μm e colocada em recipiente estéril.

5. Solução estoque de Vermelho Neutro

Foram adicionados 0,4 g de Vermelho Neutro a 100 mL de água destilada. Após o preparo da solução a mesma foi armazenada em frasco âmbar e recoberta por papel alumínio.

6. Solução de trabalho de Vermelho Neutro (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Um mL da solução estoque de vermelho neutro foi adicionado a 79 mL de RPMI com 10% (v/v) de Soro fetal bovino e 1% (v/v) da mistura de antibióticos: Penicilina/Estreptomicina. Em seguida, a solução foi incubada a 37 °C em banho-maria (HEMOQUÍMICA) por 30 minutos para que ocorresse a solubilização dos cristais de vermelho neutro. Logo após a solução foi centrifugada (FANEMÓ) por 10 minutos a 413 g.

9. Solução de Álcool ácido (1% v/v de ácido acético em 50% de álcool etílico absoluto)

10. Solução de azul de Trypan 0,3% em PBS

11. Solução de MTT

A solução de MTT foi preparada com 5 mg de MTT para 1 mL de PBS e estocada em recipiente fechado, vedado de luz e ar sob refrigeração de 2 a 8 °C.

12. Solução de Anfotericina B

A Anfotericina B (CRISTÁLIA[®]) foi gentilmente cedida pelo professor da Faculdade de Farmácia/UFMG Lucas Antônio Miranda Ferreira e as concentrações avaliadas (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 µg/mL) foram baseadas no trabalho de WASAN *et al.*,1994. Primeiramente, 0,017 g de Anfotericina B (90% de grau de pureza) foram solubilizadas em cerca de 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, o volume foi completado para 50 mL com PBS estéril em um balão volumétrico (0,02% de DMSO). O volume de DMSO na solução de uso foi inferior a 0,5% (v/v), conforme recomendação da ISO 10.993-5 (2009). A solução estoque (300 µg/mL) foi armazenada em vidro âmbar até o momento de uso (2 a 8 °C por no máximo um mês) e a partir dessa solução estoque foram obtidas as 8 concentrações. Diferentes volumes da solução estoque foram adicionados ao meio de cultura RPMI e completados com PBS estéril para obtenção de volumes finais iguais.

13. Solução de Ciclosporina

A Ciclosporina foi gentilmente doada pela CRISTÁLIA[®] e as concentrações avaliadas (5, 10, 20, 25, 30, 40, 45 e 50 µM) foram baseadas no trabalho de

NASCIMENTO *et al.*,(2005). Primeiramente, 0,06 g de Ciclosporina foram solubilizados em cerca de 1 mL de DMSO e, em seguida, diluiu-se em 10 mL de PBS estéril em um balão volumétrico (solução estoque). Posteriormente a solução estoque (500 μ M) foi diluída 2 vezes, a fim de obter uma solução de 250 μ M (solução de uso). O volume de DMSO na solução de uso foi inferior a 0,5% (v/v), conforme recomendação da ISO 10.993-5 (2009). Essa foi armazenada em vidro âmbar até o momento de uso (2 a 8 °C por no máximo um mês) e a partir dessa solução estoque foram obtidas as 8 concentrações. Diferentes volumes da solução estoque foram adicionados ao meio de cultura RPMI e completados com PBS estéril para obtenção de volumes finais iguais.

14. Inibidor da via sinalização celular PKA (H89)

O H89 (N-[2-p-bromo-cinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide - Calbiochem®) é um inibidor altamente seletivo para a PKA (Bracken *et al.*, 2006) e foi utilizado em uma concentração previamente estabelecida por nosso grupo de trabalho. De acordo com trabalhos publicados por Chaves *et al.*, 2009; Nogueira-machado *et al.*, 2006, o H89 na concentração de 1,0 μ M apresentou viabilidade celular de 93%, portanto sendo utilizado nessa concentração em nossos experimentos. Foi diluído em DMSO (Solução estoque – 10.000 μ M). A partir da solução estoque, foram realizadas diluições em meio de cultura para obter a solução de uso, sendo esta de 1,0 μ M. O volume de DMSO na solução de uso foi inferior a 0,5% (v/v), conforme recomendação da ISO 10.993-5 (2009).

15. Solução Fluorocrômica Hipotônica

Esta solução foi composta por 50 μ g/mL de Iodeto de Propídeo (Sigma, USA), 0,5% de Triton X-100 (Sigma, USA) em citrato de sódio 1% (Merck, Brasil). A solução foi estocada em recipiente fechado, ao abrigo da luz e ar sob refrigeração de 2 a 8 °C.

16. Solução de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10% em água ultra pura.

17. *Solução de Tris HCl 1 M em água ultra pura a pH 6,8.*

18. *Solução de Tris HCl 1 M em água ultra pura a pH 7,6.*

19. *Solução de Tris HCl 1 M em água ultra pura a pH 8,8.*

20. *Solução de EDTA a 0,5 M em água ultra pura*

21. *TBS*

Vinte mL da solução de Tris HCl pH 7,6 (1 mM) e 30 mL de solução de NaCl (5 M) foram adicionados a um balão volumétrico e o volume completado com água Ultra pura q.s.p 1 litro e armazenado sob refrigeração a 2 a 8 °C.

22. *TBST*

Vinte mL da solução de Tris HCl pH 7,6 (1 mM), 30 mL de solução de NaCl (5 M) e 1 mL de *Tween* 20 foram adicionados a um balão volumétrico e o volume completado com água Ultra pura q.s.p 1 litro e armazenado sob refrigeração a 2 a 8 °C.

23. *Solução de Bloqueio*

Leite em pó desnatado (2,5 g) foram dissolvidos em 50 mL de TBST.

24. *Solução de acrilamida a 30%*

25. *Gel de resolução a 10%*

Em um béquer, foram misturados 1,7 mL de Solução de acrilamida a 30%, 1,3 mL de solução de Tris HCl pH 8,8 (1,5 M), 1,9 mL de água Ultra pura, 50 µL de solução de SDS a 10%, 50 µL de Solução de APS a 10% e 2 µL de TEMED.

26. Gel de "largada"

Em um béquer, foram misturados 465 μL de Solução de acrilamida a 30%, 125 μL de solução de Tris HCl pH 6,8 (1,0 M), 389 μL de água Ultra pura, 10 μL de solução de SDS a 10%, 10 μL de Solução de APS a 10% e 1 μL de TEMED.

27. Tampão de corrida para Western Blot

Em um béquer, 15,1 g de Tris Base e 94 g de Glicina foram dissolvidos em 50 mL de solução de SDS a 10% e o volume final transferido para um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume completado para 1 litro com água Ultra pura. Esta solução foi preparada no dia do uso.

28. Solução de transferência

Em um béquer, 3,03 g de Tris Base e 14,4 g de Glicina foram dissolvidos em 200 mL de Metanol PA. A seguir, 2 mL de solução de SDS a 10% foram adicionados e o volume final transferido para um balão volumétrico de 1 L, sendo o volume completado para 1 litro com água Ultra pura. O pH foi ajustado para 8,3. Esta solução foi preparada no dia do uso.

29. Solução descorante para gel de acrilamida

Noventa mL de Metanol P.A. e 10 mL de Ácido acético P.A. foram adicionados a um balão volumétrico e o volume completado com água Ultra pura para 1 litro.

30. Solução de lise de células

50 μL de Solução de Tris HCl (pH 7,6), 2 μL de Solução de EDTA (5M), 2,5 μL de Nonidet P40, 2 μL de DTT, 5 μL de Coquetel inibidor de protease, 13,3 μL de Solução de NaCl foram acrescentados a 425 μL de água Ultra pura, sendo o volume final de 500 μL utilizados no homogenato celular.

31. *Solução corante de gel de acrilamida:*

0,5 g de Azul de coomassie foram adicionados a 800 mL de Etanol P.A. e 140 mL de ácido acético P.A., sendo transferidos para um balão volumétrico e o volume completado para 2 litros com água Ultra pura.

32. *Solução tampão amostra de SDS:*

Dez mL de Solução Tris HCl 1M (pH 6,8), 4 mL de Solução de SDS a 10%, 2 mL de Glicerol, 0,2 mL de Beta-mercaptoetanol e 0,2 mg de Azul de bromofenol foram misturados e o em um balão volumétrico o volume completado com água Ultra pura para 10 mL.

33. *Agonista PKA (Forskolina) 10 µM*

4.3 Cultivo celular

As linhagens celulares renais LLC-PK1 (células dos túbulos proximais de rim de porco), MDCK (células dos túbulos distais de cão - *Madin-Darby canine kidney*), foram adquiridas do *Cell Bank* (Banco de Células do Rio de Janeiro) e apresentaram ausência de contaminação por micoplasmas. Para cultivar as linhagens celulares, as mesmas foram colocadas em frascos de crescimento de 75 cm² (SARDEST) contendo o meio de cultura RPMI. Ao meio foram adicionados, 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de uma mistura dos antibióticos: Penicilina (200 U/mL) e Estreptomicina (200 mg/mL). As garrafas foram armazenadas em estufa (SHELLAB) a 37 °C, umidificada com 5% de dióxido de carbono (CO₂). O meio foi substituído a cada dois ou três dias, de acordo com a confluência da monocamada celular e os subcultivos (passagens) realizados. Quando as garrafas atingiram 100% de confluência o meio foi aspirado e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS). Posteriormente, para o descolamento das monocamadas, utilizou-se solução de Tripsina 0,20% e EDTA 0,02%. Em seguida, foi realizada a contagem das células com azul de

trypan 0,3% na câmara de Neubauer (OPITIK LABOR), conforme descrito no item 4.4.

Para realização dos ensaios, as células foram utilizadas sempre com passagens (repiques) próximos, sendo sempre utilizadas células que estavam com, no máximo, 18 passagens (OECD número 129, 2010).

Para manter as células em estoque, periodicamente foi realizado um congelamento. As células ($1,0 \times 10^6$ células/mL) foram armazenadas em criotubos de 2 mL (SARDEST) contendo 950 μ L de Soro Fetal Bovino (GIBCO) e 50 μ L de DMSO (Vetec). Estes criotubos foram identificados e armazenados no freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (MARCONI[®]), por no máximo, 6 meses. Para o descongelamento, retirou-se o criotubo do freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e transferiu-se todo o conteúdo do criotubo para uma garrafa de 75 cm^2 , contendo meio de cultura suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino.

4.4 Contagem celular utilizando azul de Trypan

Para a realização dos experimentos, bem como para a manutenção das células viáveis em estoque, foi estimado o número de células viáveis com o uso do corante azul de Trypan. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento (Konopka et al., 1996). Resumidamente, 100 μ L da suspensão celular foi adicionada a 900 μ L do azul de trypan (0,3%) e posteriormente uma gota foi colocada na câmara de Neubauer para a realização da contagem.

4.5 Determinação do “double time” das células

As células foram cultivadas em frascos de 25 cm^2 (SARDEST) contendo meio de cultura RPMI. Ao meio foram adicionados 10% (v/v) de soro fetal

bovino e 1% (v/v) de uma mistura dos antibióticos: Penicilina (200 U/mL) e Estreptomicina (200 mg/mL). No dia 1, foram preparadas 8 garrafas contendo 100.000 células/garrafa com 5 mL de Meio de cultura. Durante 4 dias (96 horas), no intervalo de 24 horas, cada duplicada de garrafas teve o meio aspirado e 0,5 mL de Tripsina foram adicionados para o descolamento das células. Posteriormente, as células foram lavadas com 5 mL de meio de cultura, centrifugadas e o sobrenadante retirado e o pellet celular resuspendido em 1 mL de azul de trypan (0,3%). A contagem foi realizada na câmara de Neubauer e o “Double time” das populações de células LLC-PK1 e MDCK calculado pelo algoritmo fornecido pelo site <http://www.doubling-time.com> (Koninckx et al., 2011).

4.6 Ensaios de viabilidade celular

4.6.1 Vermelho Neutro

O corante Vermelho Neutro tem sido utilizado como indicador de citotoxicidade em culturas primárias de hepatócitos e em outras linhagens celulares. Caracteriza-se por acumular nos lisossomas de células viáveis (Fotakis & Timbrell, 2006) que incorporam esse corante vital, ligeiramente catiônico, que penetra na membrana celular por difusão passiva não-iônica e se concentra nos lisossomas, onde se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos inclusive fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal (Melo, 2000). As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^3$ células/poço contendo 180 μ L de meio RPMI e em seguida foram incubadas com 20 μ L de oito diferentes concentrações dos fármacos testados por 1, 18 e 24 horas (Anfotericina B) e por 1, 6 e 24 horas (Ciclosporina). Decorrido esses tempos de exposição, o meio, contendo o fármaco, foi removido e 200 μ L da solução de vermelho neutro (40 μ g/mL) foi adicionada e a placa incubada a 37 °C em estufa umidificada com 5% de CO₂ por 1 hora. Posteriormente, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 μ L de solução de

álcool ácido (Babich & Boreunfreund, 1991). A absorvância foi lida a 540 nm (Labsystems Multiskan MCC7340).

4.6.2 MTT

O teste MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) foi realizado baseado nos estudos de Mosmann (1983). As desidrogenases mitocondriais convertem o MTT em um produto de coloração roxa, o formazam. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^3$ células/poço contendo 180 μL de meio de cultura RPMI e em seguida foram incubadas com 20 μL de oito diferentes concentrações dos fármacos testados por 1, 18 e 24 horas (Anfotericina B) e por 1, 6 e 24 horas (Ciclosporina). Decorridos esses tempos, os fármacos foram removidos e substituídas por 200 μL /poço de uma solução contendo 5,0 mg/mL de MTT em RPMI e incubadas por 1 h a 37 °C. A solução de MTT foi então removida e 100 μL de DMSO foram adicionados a cada poço. A absorvância foi lida a 570 nm (Labsystems Multiskan MCC7340).

Para os dois ensaios, o cálculo utilizado para avaliar a percentagem de viabilidade celular foi: Absorvância das células tratadas/ absorvância do controle x 100. A percentagem de citotoxicidade foi assim calculada: 100 – percentagem de viabilidade. Para cada tempo de incubação foi realizado um controle (células não tratadas). Ao controle atribuiu-se 100% de viabilidade (0% de citotoxicidade). Dessa forma, foi verificado se as linhagens celulares estudadas possuíam sensibilidade adequada para avaliação da nefrotoxicidade provocada pela Anfotericina B e Ciclosporina.

4.7 Avaliação de Morte Celular por Citometria de Fluxo

O ensaio de Citometria de Fluxo utilizando iodeto de propideo (PI) tem sido amplamente utilizado para a avaliação de morte celular em diferentes modelos experimentais e foi realizado no laboratório do prof. Dawidson Assis

Gomes, no departamento de Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG É baseado no princípio de que células apoptóticas, entre outras características típicas, caracterizam-se pela fragmentação do DNA e, conseqüentemente, a perda do conteúdo de DNA nuclear (Riccardi e Nicoletti, 2006). O ensaio de fragmentação de DNA pode ser usado para a avaliação de morte celular induzida por diferentes tipos de estímulos: químicos (Mcneill-Blue et al., 2006; Gahr et al., 2008; Ramakrishnan et al., 2009), biológicos (Schoier et al., 2001) ou físicos (Tokalov et al., 2007; Zhang et al., 2008).

Para avaliar se a Anfotericina B e Ciclosporina induziam fragmentação do DNA utilizamos a Citometria de fluxo, em que núcleos são corados com iodeto de propídeo (PI), um agente intercalante fluorescente que se liga ao DNA corando-o de vermelho. Essa substância é amplamente usada no estudo de morte celular, pois não penetra através da membrana celular íntegra e, portanto, diferencia células normais de células apoptóticas e necróticas (Aubry et al., 1999). O iodeto de propídeo emite fluorescência ao se ligar ao DNA. A membrana plasmática é impermeável a este marcador fluorescente, que se liga ao DNA em situações de ruptura da integridade da membrana, portanto em situações de morte celular. Para cada análise foram contadas automaticamente 5.000 células. A análise do conteúdo do DNA presente no núcleo celular é um marcador para apoptose bastante utilizado, uma vez que células apoptóticas apresentam fragmentação deste material (Oancea et al., 2006). Dependendo da fase do ciclo celular em que se encontram, células normais deverão apresentar conteúdo de DNA igual a $2n$ ou $4n$, enquanto células em apoptose apresentaram DNA menor que $2n$. Para esta análise, utilizamos o protocolo descrito por Riccardi & Nicoletti (2006).

Resumidamente, as células foram incubadas por 24 horas em placas de 24 poços ($1,0 \times 10^4$ células/poço) e decorrido este tempo o meio foi substituído pelos fármacos Anfotericina B e Ciclosporina e as placas incubadas novamente por mais 24 horas. Posteriormente, os sobrenadantes foram cuidadosamente retirados das placas, centrifugados (413 g) por 5 minutos e lavados com PBS. Em seguida, o pellet celular foi exposto a 300 μ L de uma solução fluorocrômica hipotônica contendo o corante Iodeto de Propídeo (50 μ g/mL) por uma hora a 4

°C (ao abrigo da luz) e a as amostras submetidas à análise por Citometria de Fluxo (Modelo Guava easyCyte™ Millipore). Os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de células mortas em cada amostra foi definida como a porcentagem de células coradas com iodeto de propideo comparada com o número total de células analisadas na amostra e para tais análises foi utilizado o software do Citometro Guava-Millipore.

4.8 Avaliação do envolvimento da via PKA na viabilidade celular

4.8.1 Avaliação utilizando o ensaio Vermelho Neutro

As células foram incubadas por 24 horas em placas de 96 poços (5,0 x 10³ células/poço) e decorrido este tempo o meio foi substituído e as células foram pré-incubadas por 30 minutos com o inibidor da via PKA (H89-1µM). Posteriormente, os fármacos foram adicionados e as células incubadas por mais 24 horas. Em seguida, foi realizado o ensaio de Viabilidade Vermelho Neutro, conforme descrito no item 4.6.1.

4.8.2 Avaliação utilizando a técnica Citometria de Fluxo

As células foram incubadas por 24 horas em placas de 24 poços (1,0 x 10⁴ células/poço) e decorrido este tempo o meio foi substituído e as células foram pré-incubadas por 30 minutos com o inibidor da via PKA (H89-1µM). Posteriormente, os fármacos foram adicionados e as células incubadas por mais 24 horas. Em seguida, foi realizado o ensaio de Citometria de Fluxo, conforme descrito no item 4.7.

4.9 Avaliação da recuperação celular

Para complementar os ensaios de citotoxicidade, avaliamos se as células conseguem se recuperar dos efeitos tóxicos dos fármacos. Tal análise foi realizada após 24, 48 e 72 horas da retirada dos fármacos.

Para este estudo foram preparadas 4 placas de 96 poços e as células ($5,0 \times 10^3$ células/poço) foram expostas aos fármacos estudados por 24 horas (Figura 8). Decorrido este tempo, analisou-se a viabilidade celular na primeira placa. Nas outras 3 placas o meio contendo os fármacos foi retirado e suplementado e após 24, 48 e 72 horas as análises realizadas. O ensaio utilizado foi o Vermelho Neutro, conforme descrito no item 4.6.1. Para cada tempo de incubação foram realizados controles (células não tratadas).

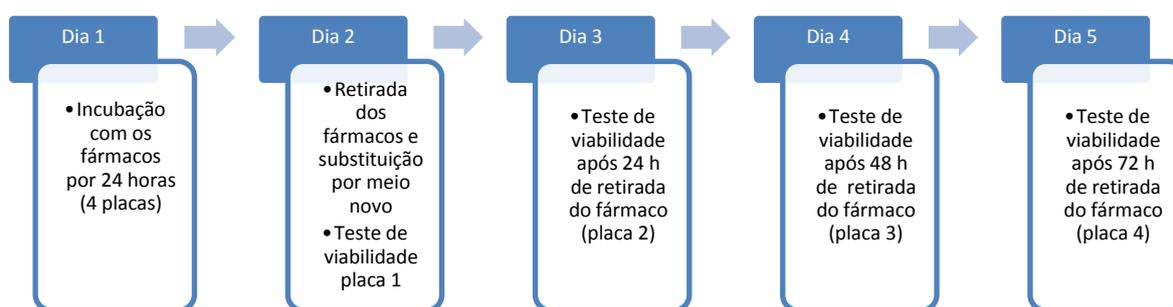


Figura 8. Esquema do ensaio de recuperação celular.

4.9.1 Avaliação do envolvimento da via PKA na capacidade de recuperação celular

Inicialmente foram preparadas 4 placas de 96 poços e as células ($5,0 \times 10^3$ células/poço) foram pré-incubadas por 30 minutos com o inibidor da via de sinalização PKA (H89 – $1 \mu\text{M}$) (Figura 9). Em seguida, as células foram expostas aos fármacos por 24 horas. Decorrido este tempo, analisou-se a viabilidade celular na primeira placa. Nas outras 3 placas o meio contendo os fármacos foi retirado e substituído e após 24, 48 e 72 horas as análises foram realizadas. O ensaio utilizado foi o Vermelho Neutro, conforme descrito no item 4.6.1. Para cada tempo de incubação foram realizados controles (células não tratadas).

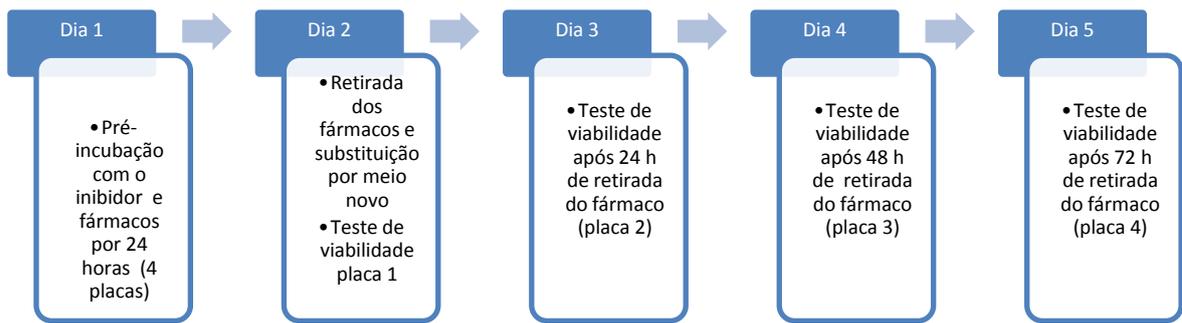


Figura 9. Esquema do ensaio de envolvimento da PKA na recuperação celular.

4.10 Efeitos do inibidor da proteína Cinase A (PKA) na produção de IL-6 e TNF- α em células renais

As células LLC-PK1 e MDCK foram incubadas por 24 horas em placas de 24 poços ($5,0 \times 10^5$ células/poço) e decorrido este tempo foram pré-tratadas por 30 minutos com o inibidor da via PKA H89 ($1,0 \mu\text{M}$). Em seguida, foram tratadas com Anfotericina B ($4,0 \mu\text{g/mL}$) e Ciclosporina ($5,0 \mu\text{M}$) na ausência e presença do H89 e as placas incubadas novamente por mais 24 horas. Posteriormente, os sobrenadantes celulares foram cuidadosamente retirados das placas e centrifugados 413 g por 10 minutos. Nos sobrenadantes foram realizados os ensaios de quantificação de IL-6 e TNF- α , de acordo com instruções do fabricante (Enzo Life Sciences) e as leituras realizadas no leitor de Elisa nos comprimentos apropriados.

4.11 Efeitos do inibidor da Proteína Cinase A (PKA) na produção do NO em células renais

Avaliamos a quantificação de nitrito segundo reação de Griess (Green et al., 1982) com o intuito de verificar se o óxido nítrico está envolvido na nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B e Ciclosporina. Inicialmente, as células LLC-PK1 e MDCK ($5,0 \times 10^5$ células/poço) foram incubadas com meio de cultura em placas de 24 poços por 24 horas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em estufa umidificada com 5% de CO_2 . Posteriormente, as células foram pré-incubadas por 30 minutos com o inibidor H89 e em seguida foram incubadas com os fármacos

Anfotericina B (4,0 µg/mL) e Ciclosporina (5,0 µM). Outros grupos utilizados nos experimentos foram tratados apenas com os fármacos e como controle negativo utilizamos as células incubadas apenas com meio de cultura. Decorridas essas 24 horas, os sobrenadantes dos poços foram retirados e centrifugados por 10 minutos a 413 g. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem do nitrito. Para dosagem do nitrito, foram utilizados 100 µL de sobrenadante, os quais foram dispostos em placas de 96 poços. Aos sobrenadantes, foram adicionados 100 µL de solução de Griess (sulfanilamina 1% em 2,5% de ácido fosfórico e naitilenodiamina 0,1% em 2,5% de ácido fosfórico), na proporção 1:1 v/v. O conteúdo da placa foi analisado empregando leitor de ELISA, no comprimento de onda 540 nm. A concentração de nitrito foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão obtida a partir de uma solução de Nitrito de sódio (NaNO₂) 1mM.

4.12 Western Blot

4.12.1 Obtenção do homogenato celular

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² e quando atingiram aproximadamente 80% de confluência celular foram incubadas por 3 horas com os fármacos e inibidor da via PKA. Em seguida, foram lavadas com PBS e tratadas com tripsina para o descolamento celular. Após centrifugação por 5 minutos a 420 g, o pellet celular foi incubado com 500 µL da solução de lise (Tris HCl 1 M pH 7,6; EDTA 5 M; Nonidet P-40; DTT 100 mM; Coquetel inibidor de protease (Sigma); NaCl 0,9%, SDS 10% e água Milli Q). Posteriormente as amostras foram homogeneizadas e sonicadas. Em seguida, foram centrifugadas por 2 horas, a 4 °C, 4.380 g. O sobrenadante foi usado imediatamente para dosagem de proteínas.

4.12.2 Dosagem de proteínas

A proteína total dos homogenatos foi quantificada por meio do ensaio colorimétrico de Bradford (1976). A albumina sérica bovina (BSA) foi usada para a curva padrão em concentrações variando de 0 a 500 ng/mL. Para o volume final de 500 µL adicionou-se 100 µL de reagente de Bradford e após 5 minutos verificou-se a absorbância a 595 nm no espectrofotômetro (Espectrofotômetro cuvette digital – Biosystems). A concentração proteica da amostra foi quantificada fazendo-se a equação da curva padrão, utilizando-se o programa Microsoft Excel.

4.12.3 Eletroforese, transferência e revelação

Foram utilizadas 100 µg de proteínas por canaleta do gel e esta foi separada por eletroforese usando um gel de poliacrilamida 10%. Em seguida, foi feita transferência das proteínas para uma membrana de Nitrocelulose 0,45 µm (BioRad, Hercules, CA) durante 2 horas e 30 minutos em sistema semi seco (BioRad, Hercules, CA) sob voltagem de 20 Volts e corrente de 250 mA. Então, a membrana foi bloqueada empregando-se TBST contendo 5% de leite desnatado por 2 horas. O *Western blot* foi realizado como descrito por Yano e colaboradores (2009). O anticorpo primário usado foi: anti-PKA α produzido em coelhos 1: 250 (Sigma) A incubação com os anticorpos primários foi feita *overnight* a 4 °C. Após três lavagens com TBST, a membrana foi incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma) (1: 10.000) por 2 horas à temperatura ambiente. As bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência (ECL plus, Amersham Biosciences). O filme foi escaneado com um densitômetro GS-700 (Bio-Rad, Hercules, CA) e a análise quantitativa foi realizada usando o Quantity One software (Bio-Rad).

4.12.4 Método de coloração utilizando Azul de Coomassie

Para a coloração do gel, utilizamos o método de coloração pelo Azul de Coomassie. Após a migração do gel, este foi embebido durante 2 horas a temperatura ambiente em solução corante (fixadora). Em seguida, essa

solução foi descartada e foi acrescentada a solução descolorante (metanol: ácido acético 9:1 v/v) por 40 minutos. Decorrido este tempo, a solução foi descartada e lavou-se o gel com água destilada.

4.13 Análise Estatística

Todos os dados apresentados representam pelo menos três experimentos independentes e foram expressos pela média \pm desvio padrão da média (DP). A análise estatística foi realizada com o Programa Graph versão 5.0 PRISM *statistical software* (GraphPad, San Diego, CA). Os grupos de dados foram comparados usando One-Way ANOVA e pos-test Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação do “double time” das células

A fim de conhecermos melhor o tempo e a capacidade proliferativa das células realizamos o teste de “doubling time”. A partir da fase log da curva o “doubling time” populacional foi calculado e os valores foram de 24,31 horas para as células LLC-PK1 e de 25,6 horas para as células MDCK, o que indica que essas células são altamente proliferativas (Singh & Sharma, 2011). Assim, existe uma fase lag de aproximadamente 24 horas depois que as células são adicionadas nas placas (ou garrafas), o que representa uma fase de adaptação na curva. Após esta fase as células proliferam rapidamente e entram em crescimento exponencial ou fase log (Figura 10). Diante disso, decidimos que a incubação com os fármacos estudados seria realizada somente após 24 horas de crescimento celular.

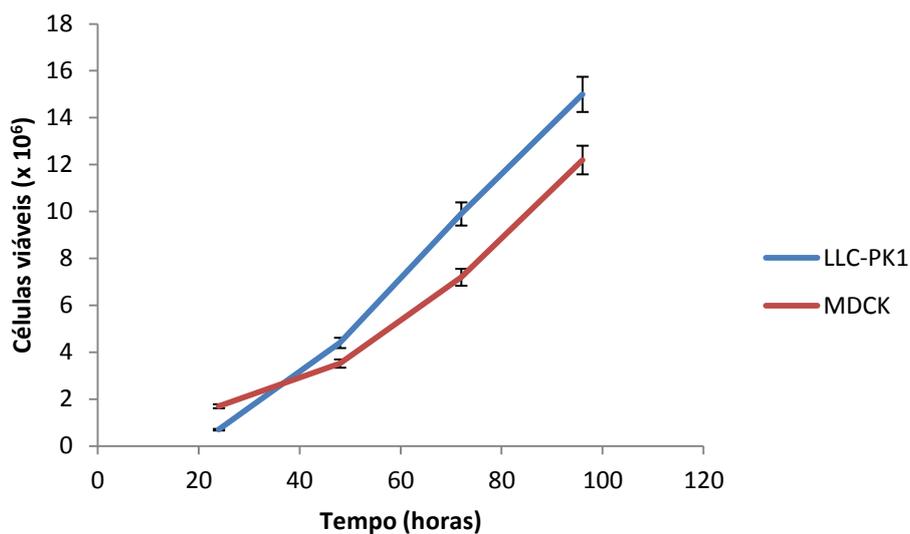


Figura 10. Determinação do “Double time” celular. $1,0 \times 10^5$ células foram incubadas em garrafas 25 cm^2 e a cada 24 horas a contagem celular realizada. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer e o “Doubling time” das populações de células LLC-PK1 e MDCK calculado pelo algoritmo fornecido pelo site <http://www.doubling-time.com>

5.2 Avaliação da Viabilidade celular utilizando Vermelho Neutro e MTT

5.2.1 Anfotericina B

Os resultados mostraram que a Anfotericina B causou toxicidade nas duas linhagens celulares renais avaliadas de acordo com os dois métodos empregados (Figura 11). Efeitos significativos foram observados em concentrações $\geq 4,0 \mu\text{g/mL}$, sendo mais acentuada quando utilizada nas concentrações de 15, 20 e $30 \mu\text{g/mL}$, após 24 horas. Nas células LLC-PK1, nos três tempos avaliados as 8 concentrações (2 a $30 \mu\text{g/mL}$) de Anfotericina B provocaram redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular, tanto no teste de citotoxicidade Vermelho Neutro como no MTT. Nas células MDCK, após 1 hora de exposição ao fármaco, apenas as concentrações de 10, 15, 20 e $30 \mu\text{g/mL}$ de Anfotericina B apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular, pelo teste Vermelho Neutro. Pelo MTT, neste mesmo

tempo, nenhuma das 8 concentrações provocou queda significativa da viabilidade celular. Com 18 e 24 horas as 8 concentrações provocaram perda significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular, de acordo com os 2 testes.

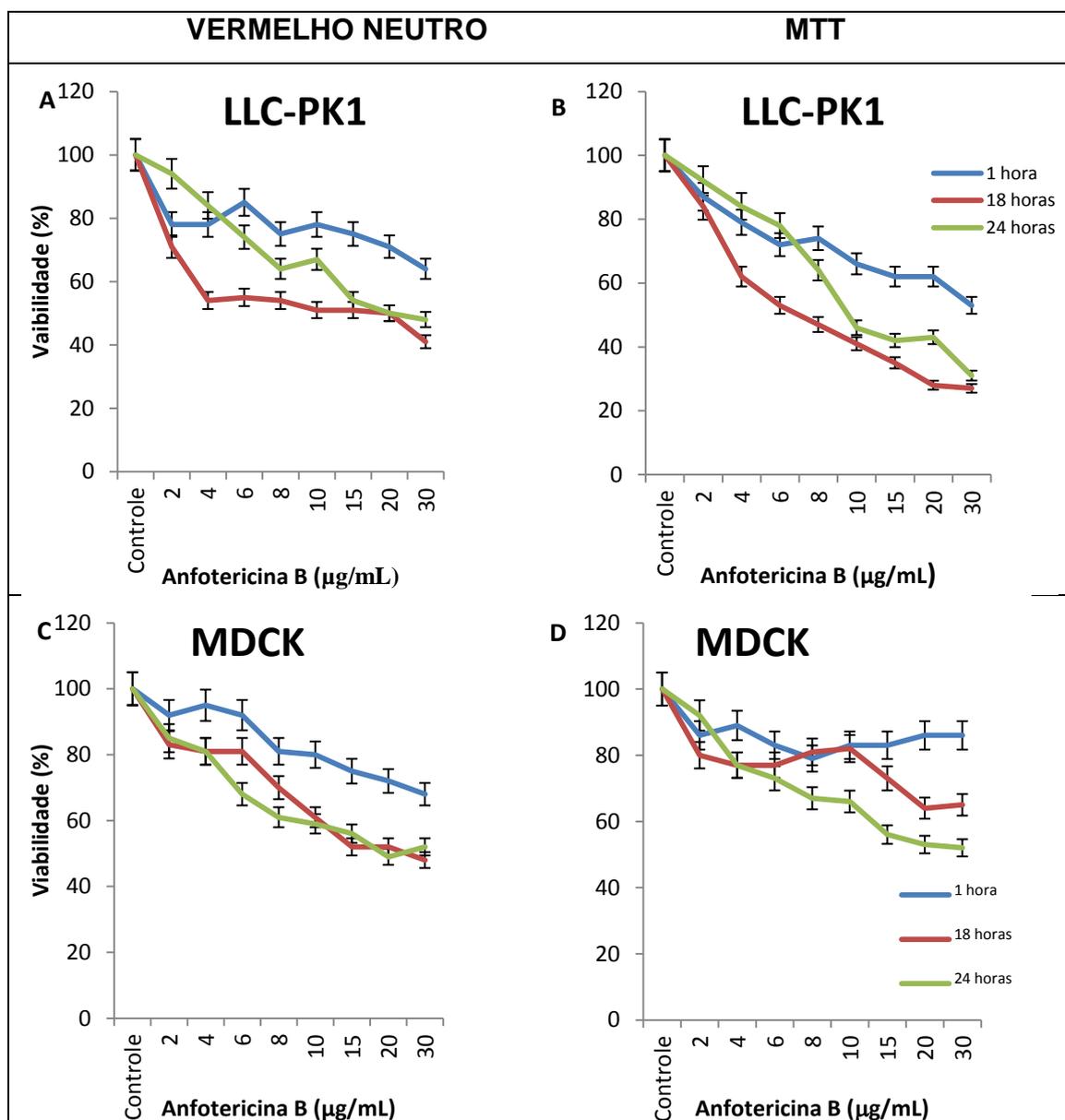


Figura 11. Avaliação da viabilidade celular nas linhagens celulares renais expostas à Anfotericina B utilizando Vermelho Neutro e MTT. Células foram incubadas por 1, 18 e 24 horas com 8 concentrações de Anfotericina B (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 µg/mL) para avaliação da viabilidade celular, utilizando os ensaios Vermelho Neutro (A e C) e MTT (B e D). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, em 3 experimentos independentes, sendo que para cada tempo de incubação foi realizado um controle (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular.

5.2.2 Ciclosporina

Ciclosporina também causou toxicidade nas duas linhagens celulares renais avaliadas, de acordo com os dois métodos empregados (Figura 12). Efeitos significativos foram observados em concentrações $\geq 5,0 \mu\text{M}$, sendo mais acentuada quando utilizada nas concentrações de 40, 45 e 50 μM , após 24 horas. Nas células LLC-PK1, nos três tempos avaliados as 8 concentrações (5 a 50 μM) de Ciclosporina provocaram redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular, tanto no teste de citotoxicidade Vermelho Neutro como no MTT. Nas células MDCK, após 1 hora de exposição ao fármaco, apenas as concentrações de 40, 45 e 50 μM de Ciclosporina apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular, pelo teste Vermelho Neutro. Pelo MTT, neste mesmo tempo, as concentrações de 45 e 50 μM provocaram queda significativa da viabilidade celular. Com 6 e 24 horas as 8 concentrações provocaram perda significativa ($p < 0,05$) da viabilidade celular, de acordo com os 2 testes.

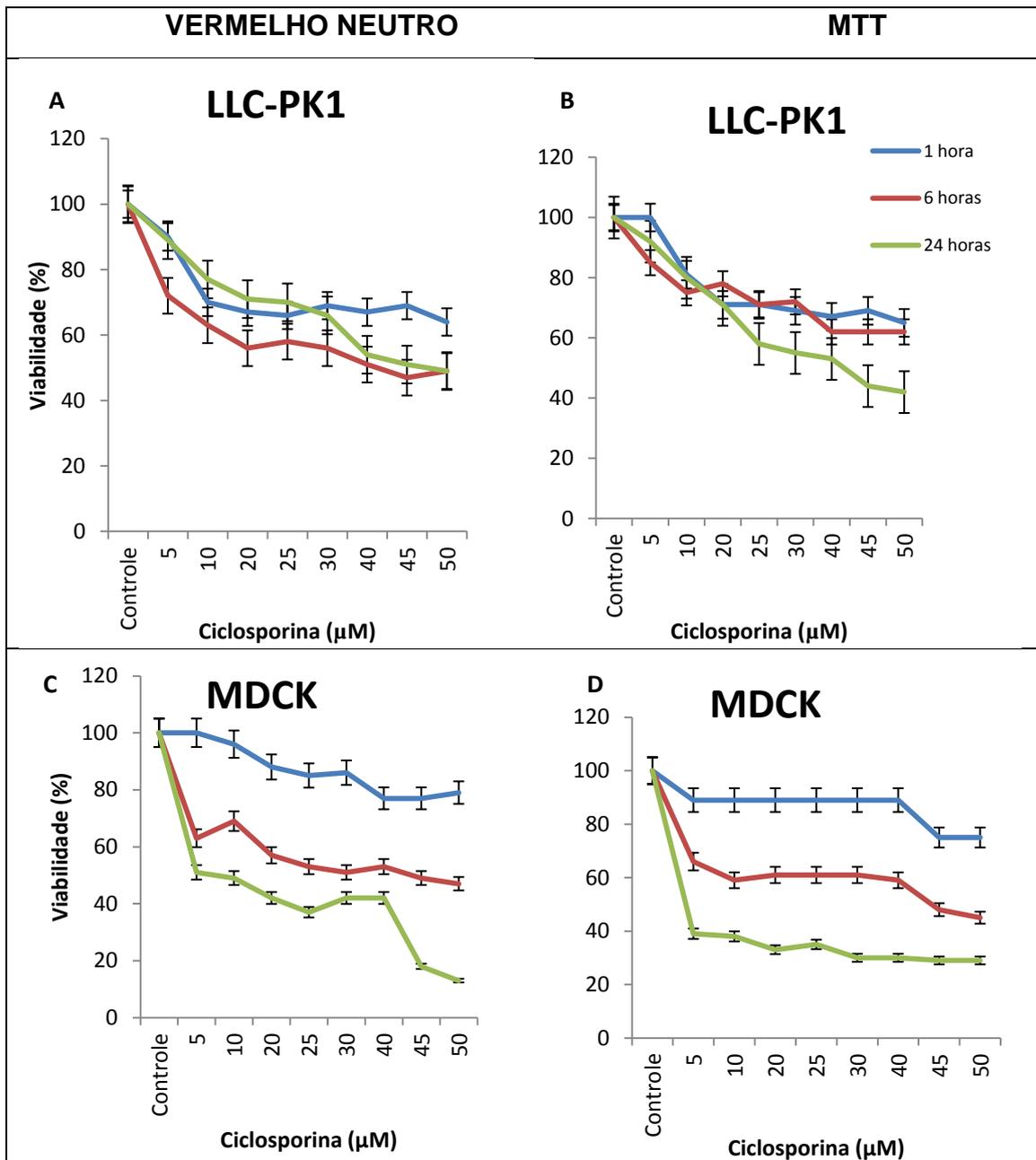


Figura 12. Avaliação da viabilidade celular nas linhagens celulares renais expostas à Ciclosporina utilizando Vermelho Neutro e MTT. Células foram incubadas por 1, 6 e 24 horas com 8 concentrações de Ciclosporina (5, 10, 20, 25, 30, 40, 45 e 50 μM) para avaliação da viabilidade celular, utilizando os ensaios Vermelho Neutro (A e C) e MTT (B e D). Os ensaios foram realizados em sextuplicata, em 3 experimentos independentes, sendo que para cada tempo de incubação foi realizado um controle (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular.

5.3 Avaliação de Morte celular por Citometria de Fluxo

Uma vez que observamos que a Anfotericina B e Ciclosporina reduzem a viabilidade celular questionamos se as mesmas provocam fragmentação do DNA. A fragmentação do DNA pode ser interpretada como morte celular. As culturas de células LLC-PK1 e MDCK foram expostas a Anfotericina B (4,0 µg/mL) e Ciclosporina (5,0 µM) por 24 horas e posteriormente coradas com iodeto de Propídeo e analisadas por citometria de fluxo. A análise quantitativa da população de células com DNA fragmentado demonstrou que a Anfotericina B e Ciclosporina provocaram fragmentação significativa do DNA nas duas linhagens estudadas (Figura 13). A Anfotericina B causou 31,9 % de morte celular nas células LLC-PK1 (Figura 13, A) e 17,9% na MDCK (Figura 13, B). A Ciclosporina provocou 7,94% de morte celular nas células LLC-PK1 (Figura 13, A) e 14,19% na MDCK (Figura 13, B). Estes resultados foram considerados significativos ($p < 0,05$) quando comparados com o controle negativo (Figura 13).

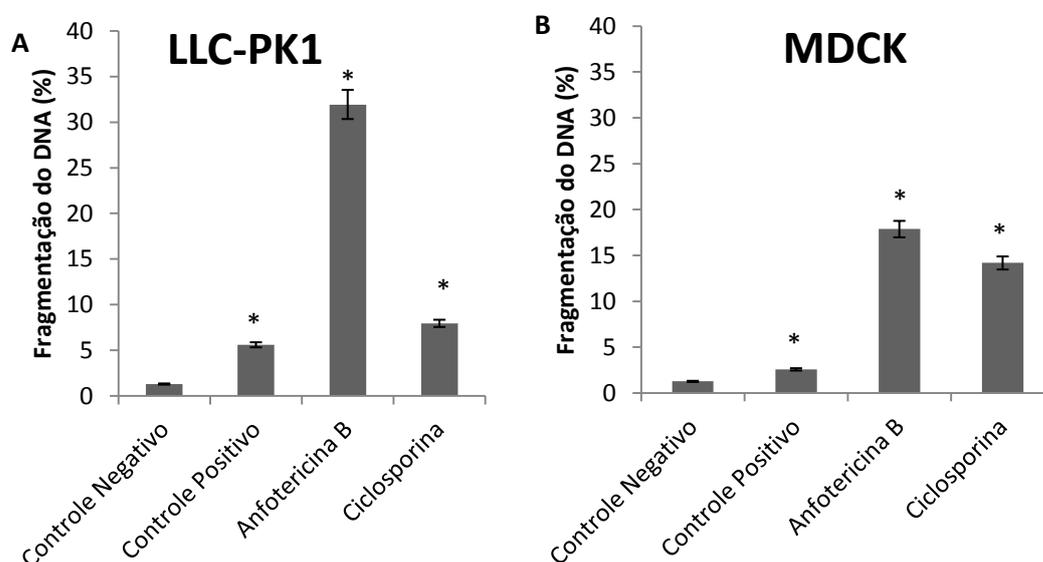


Figura 13. Fragmentação de DNA induzida pela Anfotericina B e Ciclosporina. Resultados são expressos como porcentagem de eventos de um total de 5.000 eventos. Os resultados representam média±DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ em relação ao controle negativo (células não tratadas). Controle positivo: Cisplatina 10 µM. Anfotericina B: 4,0 µg/mL. Ciclosporina: 5,0 µM.

5.4 Avaliação do envolvimento da via PKA na viabilidade celular

5.4.1 Avaliação utilizando o ensaio Vermelho Neutro

Como foi observado que a Anfotericina B e Ciclosporina reduziram a viabilidade e provocaram morte celular foi avaliado se a inibição da via de sinalização PKA modula estes processos. Quando foi realizado o teste de viabilidade Vermelho Neutro, em nenhuma das duas linhagens a inibição da via PKA alterou a citotoxicidade induzida pela Anfotericina B e Ciclosporina (Figura 14, A e B). Não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com Anfotericina B em relação aos grupos pré-tratados com H89 e Anfotericina B. O mesmo ocorreu com os grupos tratados com Ciclosporina e comparados com os grupos pré-tratados com H89 e Ciclosporina.

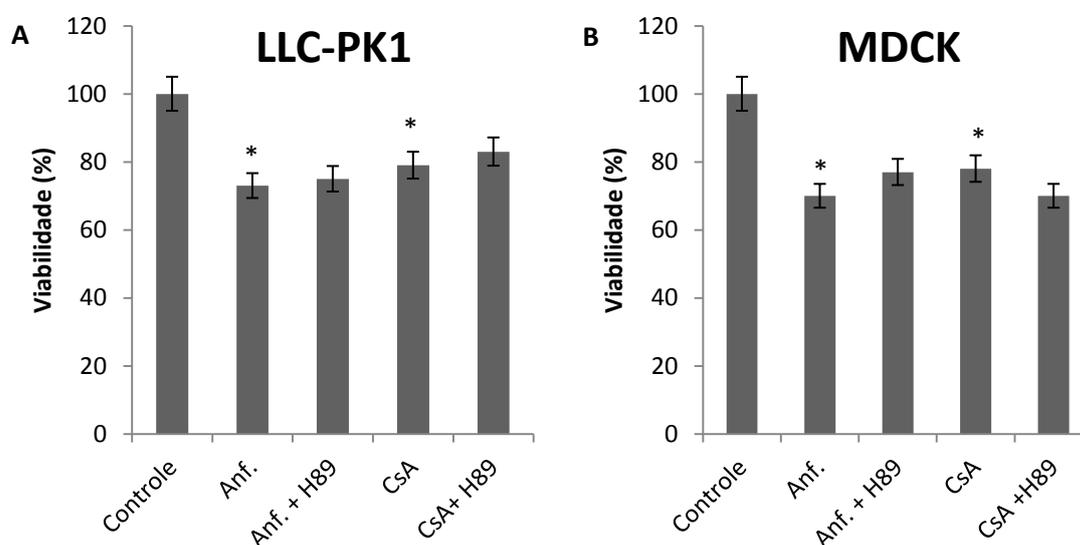


Figura 14. Efeito da inibição da via PKA na viabilidade das células renais expostas a Anfotericina B e Ciclosporina. As células LLC-PK1 (A) e MDCK (B) foram pré-incubadas com o inibidor H89 por 30 minutos e expostas a Anfotericina B (Anf. 4,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Ciclosporina (CsA-5,0 μM) por 24 horas. Para o controle (células não tratadas) considerou-se 100% de viabilidade. * $p < 0,05$ em relação às células não tratadas (controle). O teste empregado foi o Vermelho Neutro.

5.4.2 Avaliação utilizando Citometria de Fluxo

Como a Anfotericina B e Ciclosporina provocaram morte celular (fragmentação do DNA), avaliamos se a via de sinalização PKA poderia estar envolvida neste processo. As células foram pré-incubadas com o inibidor H89 por 30 minutos. Nas células LLC-PK1 a inibição das via PKA não alterou a porcentagem de morte celular ocasionada pela Anfotericina B e Ciclosporina (Figura 15, A). Entretanto, nas células MDCK quando as células foram pré-tratadas com o inibidor da via PKA e em seguida com Anfotericina B, ocorreu uma queda significativa ($p < 0,05$) na fragmentação do DNA de 57% quando comparado com as células tratadas apenas com Anfotericina B (Figura 15, B). O mesmo perfil foi observado quando as células MDCK foram pré-tratadas com o H89 e em seguida com Ciclosporina. Houve uma redução na fragmentação do DNA de 25%, quando comparado com as células tratadas apenas com Ciclosporina (Figura 15, B).

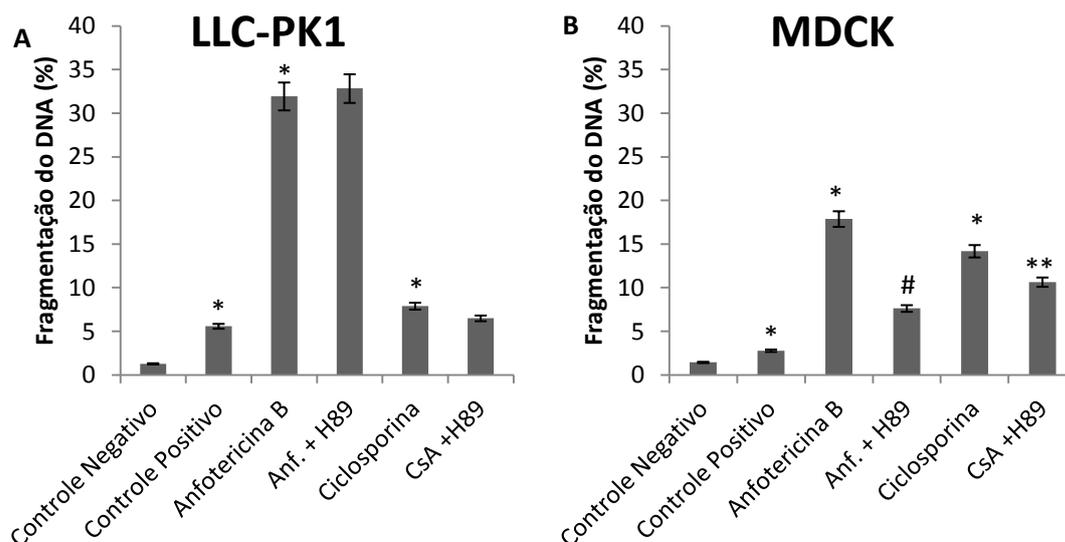


Figura 15. Efeito da inibição da via PKA na Fragmentação do DNA das células renais expostas a Anfotericina B e Ciclosporina. Resultados são expressos como porcentagem de eventos de um total de 5.000 eventos. Os resultados representam média±DP de três experimentos independentes. As células LLC-PK1 (A) e MDCK (B) foram pré-incubadas com o inibidor H89 por 30 minutos e expostas a Anfotericina B (Anf. 4,0 µg/mL) e Ciclosporina (CsA - 5,0 µM) por 24 horas. Controle Positivo: Cisplatina 10 µM. *p<0,05 em relação às células não tratadas (controle negativo). #p<0,05 em relação às células tratadas com Anfotericina B. **p<0,05 em relação às células tratadas com Ciclosporina.

5.5 Avaliação da recuperação celular

5.5.1 Anfotericina B

Ambas as linhagens celulares conseguiram se recuperar do efeito tóxico da Anfotericina B, porém o tempo de recuperação difere entre elas. Consideramos recuperadas as células que conseguiram restabelecer culturas com aspecto e comportamento semelhantes ao das culturas que não foram expostas ao fármaco. As células LLC-PK1 (Figura 16) conseguiram se recuperar após 48 horas da interrupção do tratamento com Anfotericina B e as células MDCK (Figura 17) somente após 72 horas.

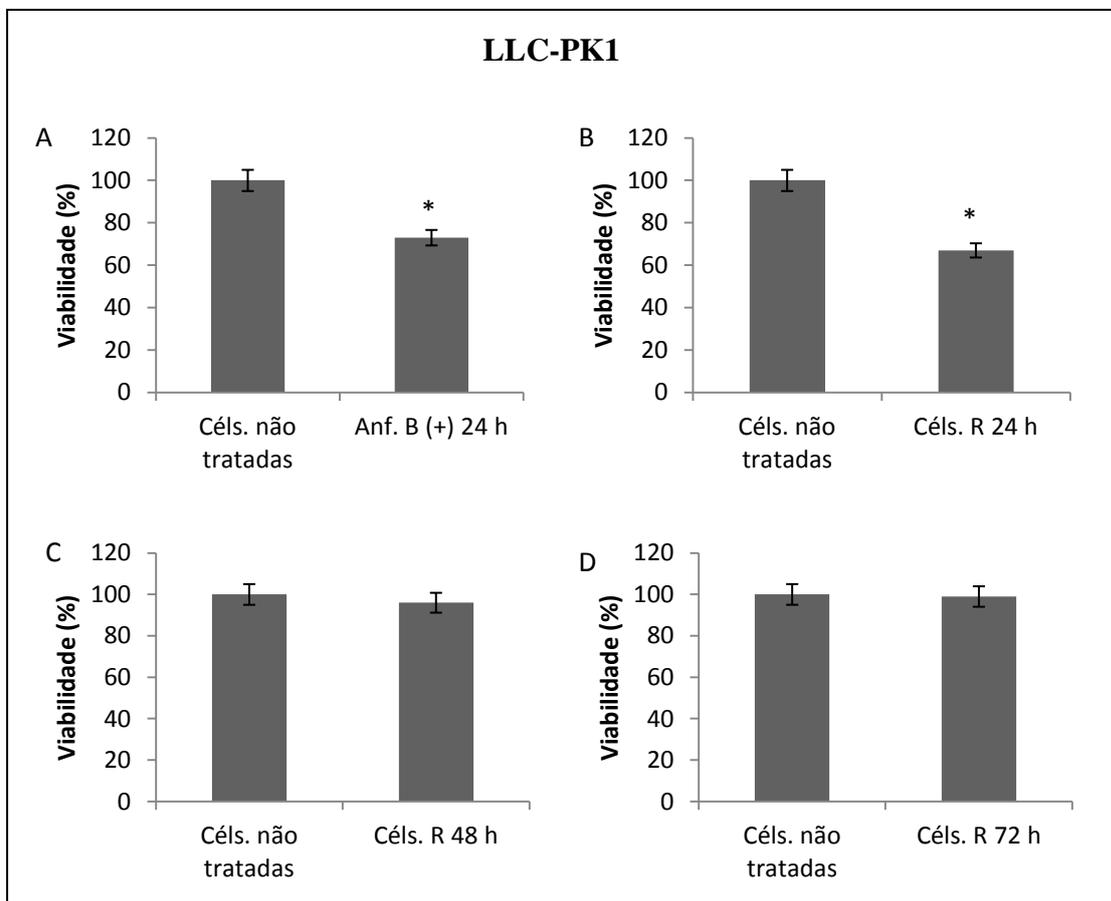


Figura 16. Efeito induzido pela Anfotericina B sobre a capacidade de recuperação celular nas células **LLC-PK1**. (A) Efeito após 24 h de tratamento com Anfotericina B; (B) Ausência de recuperação celular após 24 h da retirada da Anfotericina B (Céls. R 24 h); (C) Recuperação celular após 48 h da retirada da Anfotericina B (Céls. R 48 h); (D) Recuperação celular após 72 h da retirada da Anfotericina B (Céls. R 72 h). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * diferença estatisticamente significativa em relação às Céls. Não tratadas ($p < 0,05$).

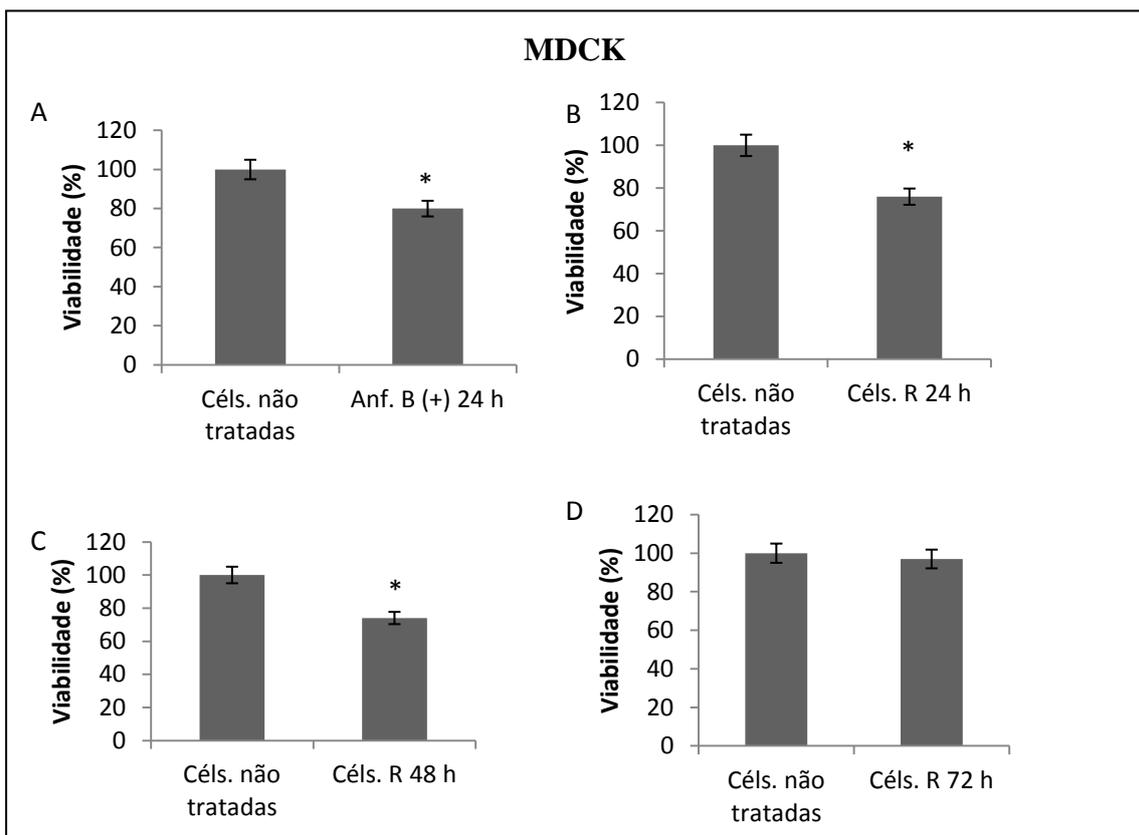


Figura 17. Efeito induzido pela Anfotericina B sobre a capacidade de recuperação celular nas células **MDCK**. (A) Efeito após 24 h de tratamento com Anfotericina B; (B) Ausência de recuperação celular após 24 h da retirada da Anfotericina B (Céls. R 24 h); (C) Ausência de recuperação celular após 48 h da retirada da Anfotericina B (Céls. R 48 h); (D) Recuperação celular após 72 h da retirada da Anfotericina B (Céls. R 72 h). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * diferença estatisticamente significativa em relação às Céls. Não tratadas ($p < 0,05$).

5.5.2 Ciclosporina

Quando avaliamos a capacidade de recuperação das células após incubação com Ciclosporina, percebemos que tanto a LLC-PK1 (Figura 18) quanto a MDCK (Figura 19) conseguiram se recuperar do efeito tóxico da Ciclosporina, sendo que esta recuperação ocorreu após 24 horas da interrupção do tratamento. Consideramos recuperadas as células que conseguiram restabelecer culturas com aspecto e comportamento semelhantes ao das culturas que não foram expostas ao fármaco.

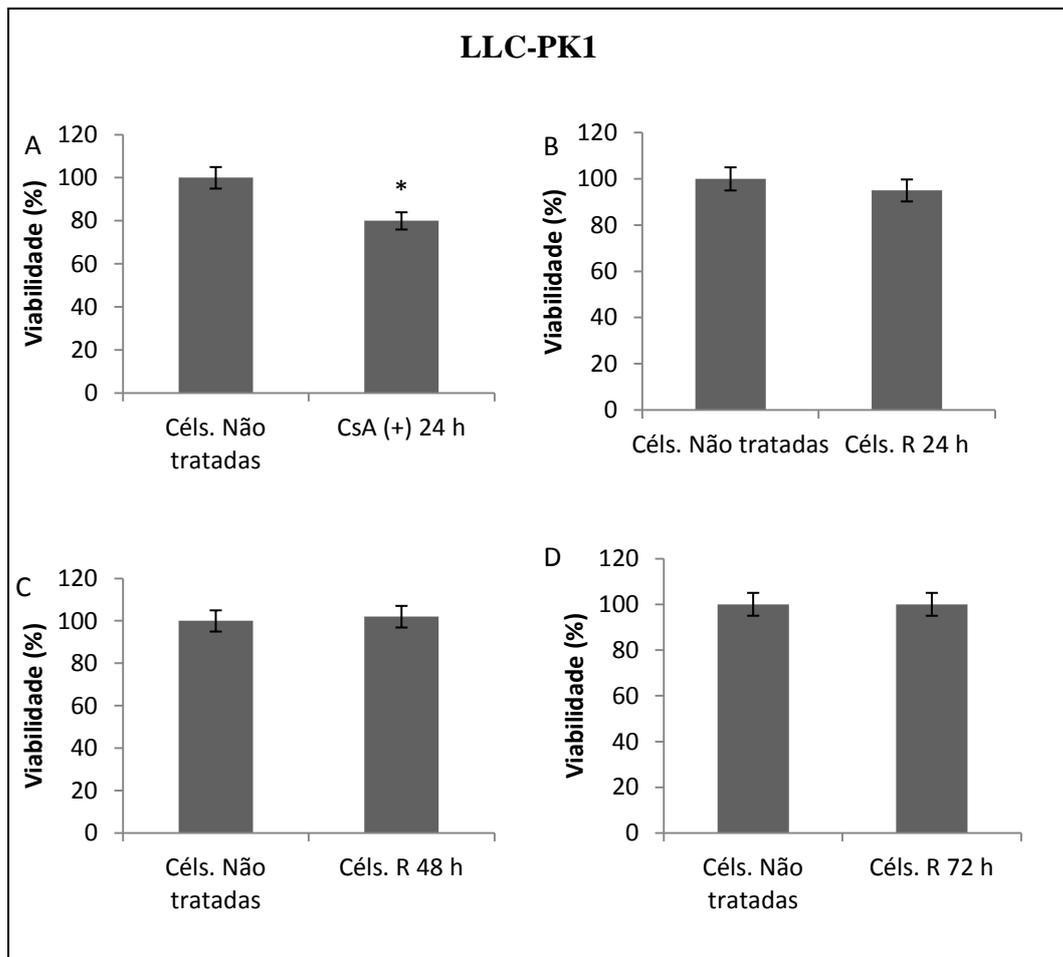


Figura 18. Efeito induzido pela Ciclosporina sobre a capacidade de recuperação celular nas células **LLC-PK1**. (A) Efeito após 24 h de tratamento com Ciclosporina; (B) Recuperação celular após 24 h da retirada da Ciclosporina (Céls. R 24 h); (C) Recuperação celular após 48 h da retirada da Ciclosporina (Céls. R 48 h); (D) Recuperação celular após 72 h da retirada da Ciclosporina (Céls. R 72 h). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * diferença estatisticamente significativa em relação às Céls. Não tratadas ($p < 0,05$).

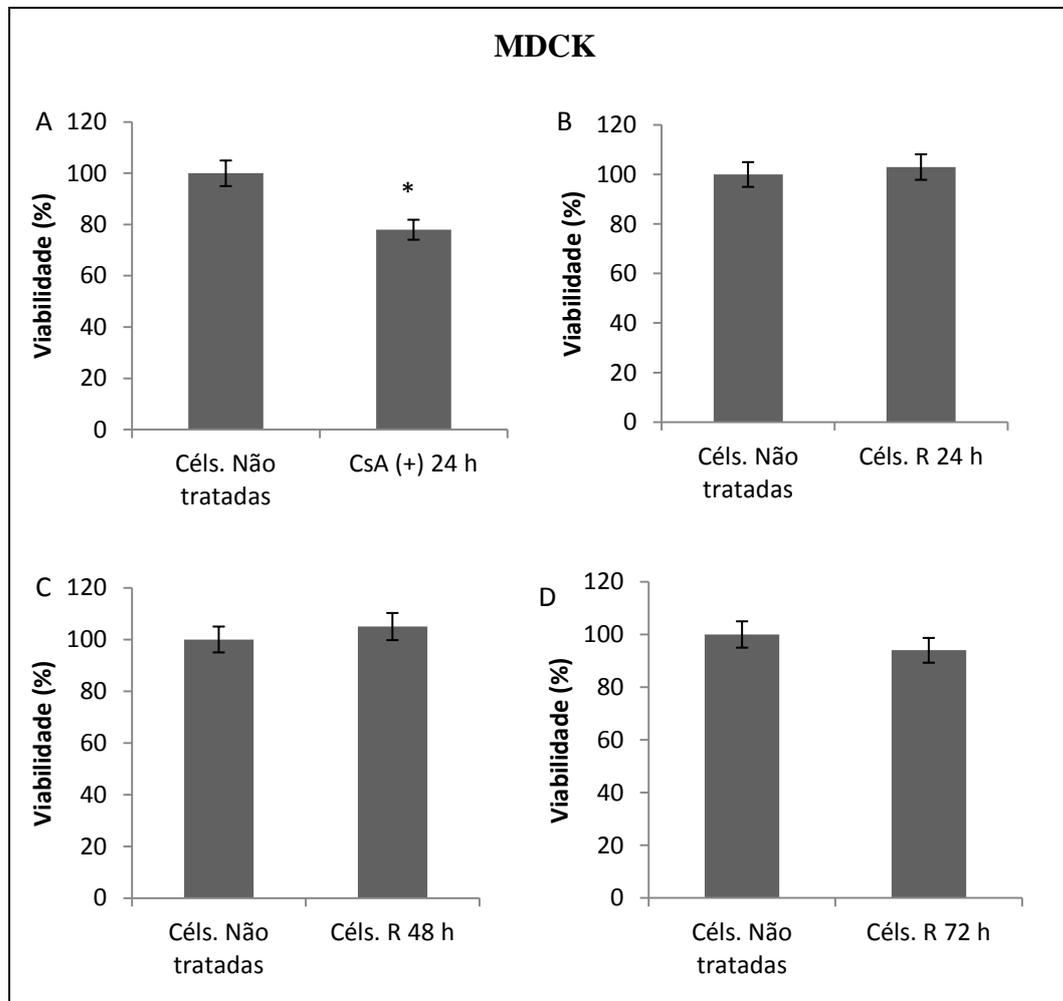


Figura 19. Efeito induzido pela Ciclosporina sobre a capacidade de recuperação celular nas células **MDCK**. (A) Efeito após 24 h de tratamento com Ciclosporina; (B) Recuperação celular após 24 h da retirada da Ciclosporina (Céls. R 24 h); (C) Recuperação celular após 48 h da retirada da Ciclosporina (Céls. R 48 h); (D) Recuperação celular após 72 h da retirada da Ciclosporina (Céls. R 72 h). Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * diferença estatisticamente significativa em relação às Céls. Não tratadas ($p < 0,05$).

5.6 Avaliação do envolvimento das vias PKA na capacidade de recuperação celular

Como 72 horas foi o tempo comum para que as células LLC-PK1 e MDCK se recuperassem do efeito tóxico da Anfotericina B, avaliamos se a inibição da via PKA poderia influenciar esta recuperação. Em nenhuma das linhagens estudadas a inibição da via PKA alterou a capacidade de recuperação celular (Figura 20).

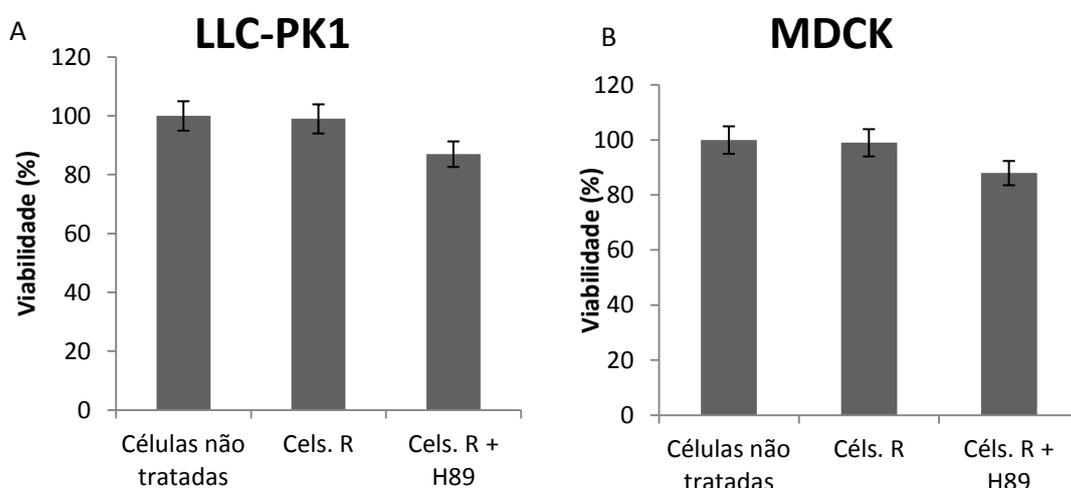


Figura 20. Avaliação do envolvimento da via PKA na recuperação celular após tratamento com Anfotericina B. (A) Células LLC-PK1; (B) Células MDCK. Cels. R: células recuperadas após 72 horas da retirada da Anfotericina B. Cels. R + H89: células foram preincubadas com o inibidor H89 por 30 minutos antes da exposição ao fármaco, posteriormente lavadas e incubadas por 72 horas. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento).

Como 24 horas foi o tempo comum para que as células LLC-PK1 e MDCK se recuperassem do efeito tóxico da Ciclosporina, avaliamos se a inibição da via PKA poderia influenciar esta recuperação. Em nenhuma das 2 linhagens a inibição da via alterou a capacidade de recuperação celular (ver Figura 21).

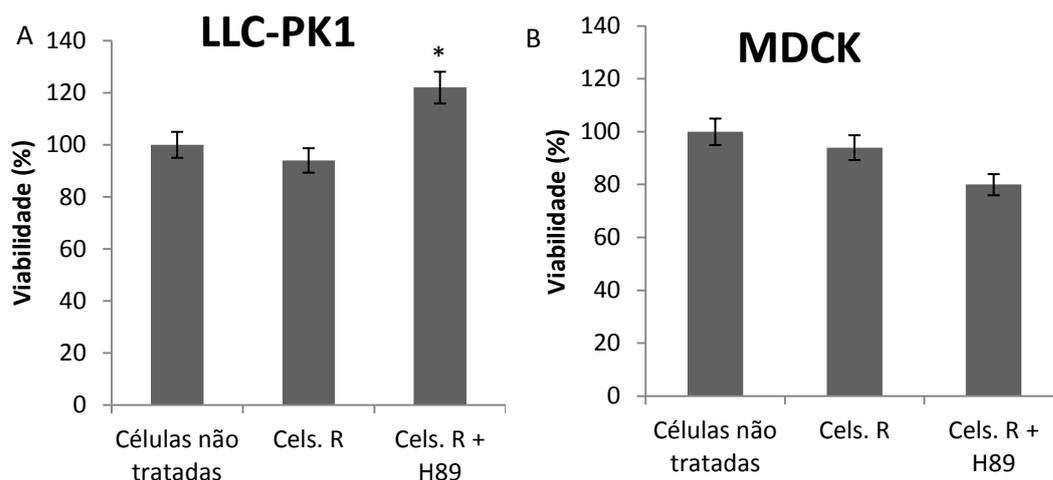


Figura 21. Avaliação do envolvimento da via PKA na recuperação celular após tratamento com Ciclosporina. (A) Células LLC-PK1; (B) Células MDCK. Cels. R: células recuperadas após 24 horas da retirada da Ciclosporina. Cels. R + H89: células foram preincubadas com o inibidor H89 por 30 minutos antes da exposição ao fármaco, posteriormente lavadas e incubadas por 24 horas. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes (três réplicas para cada experimento). * diferença estatisticamente significativa em relação às Cels. Não tratadas ($p < 0,05$).

5.7 Efeitos do inibidor da proteína Cinase A (PKA) na produção de IL-6 e TNF- α em células renais

5.7.1 Anfotericina B

Os resultados mostraram que a inibição da via PKA (H89) diminuiu significativamente a produção de IL-6 nas células LLC-PK1 (45%) e MDCK (37%). Quando as células foram incubadas com Anfotericina B ocorreu um aumento significativo na produção de IL-6, sendo de 77% (LLC-PK1) e 117% (MDCK). Entretanto, quando as células foram tratadas com Anfotericina B e H89, houve uma diminuição significativa na produção de IL-6 nas células LLC-PK1 (60%) e MDCK (70%) (Figura 22, A).

Em relação a produção de TNF- α , a incubação com H89 não alterou a produção em nenhuma das células avaliadas e apenas na MDCK ocorreu um aumento significativo da produção de TNF- α quando as células foram

incubadas com Anfotericina B por 24 horas, sendo de 24%. Quando as células foram expostas a Anfotericina B associada com H89 não houve diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com Anfotericina B (Figura 22, B).

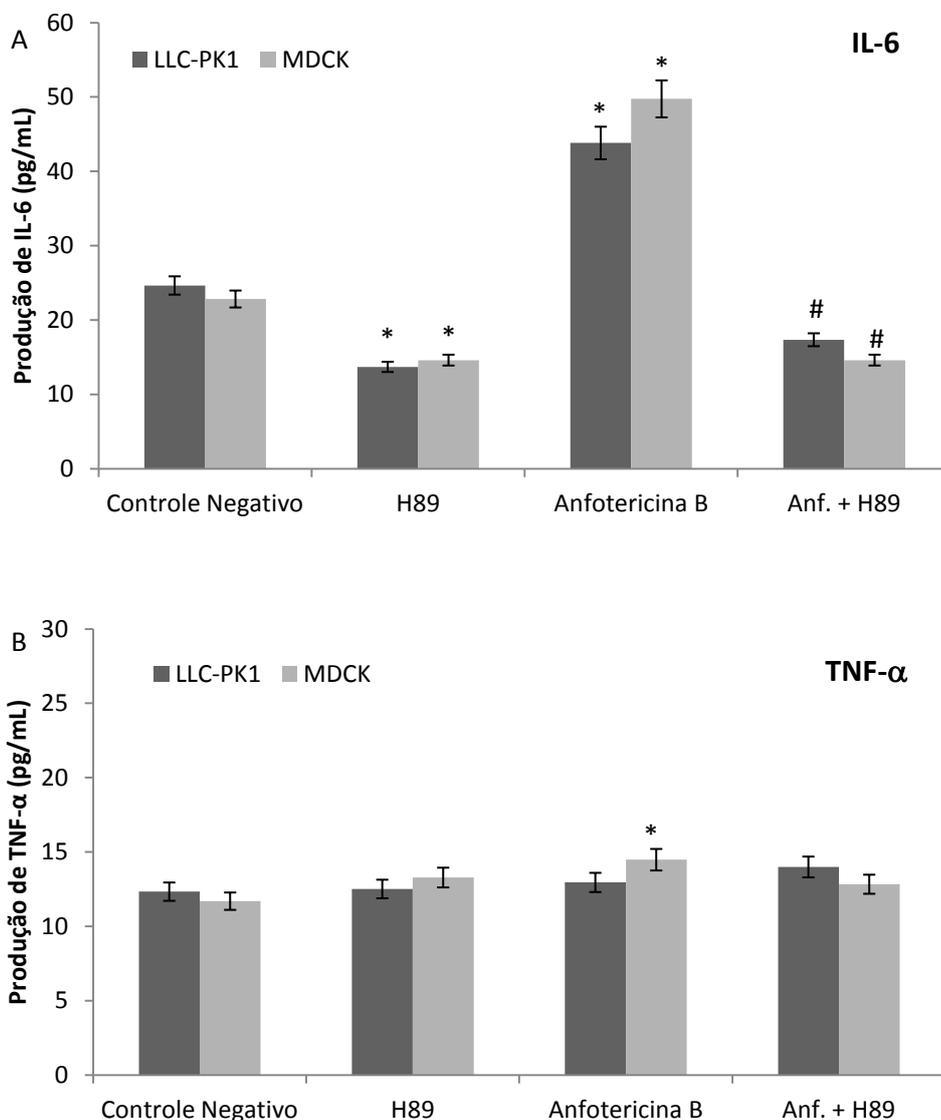


Figura 22. Efeitos da Anfotericina B na produção de IL-6 e TNF- α em células renais. A produção de cada citocina, IL-6 (A) e TNF- α (B), nos sobrenadantes das culturas celulares de LLC-PK1 e MDCK foram determinados por ELISA depois de 24 h de incubação com anfotericina B (4,0 μ g/mL), pre-tratamento por 30 minutos com H89 (1,0 μ M), anfotericina B + H89. Os resultados apresentados em A e B representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo (células não tratadas). # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com Anfotericina B.

5.7.2 Ciclosporina

Os resultados mostraram que a inibição da via PKA com H89 diminuiu significativamente a produção de IL-6 nas células LLC-PK1 (42%) e nas células MDCK (37%). Em ambas as linhagens celulares a Ciclosporina não afetou a produção de IL-6 e quando as células foram pré-tratadas com H89 associado com Ciclosporina também não houve diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com Ciclosporina (Figura 23, A).

Em relação à produção de TNF- α , a incubação com H89 não afetou a produção em nenhuma das células avaliadas. Quando as células foram incubadas com Ciclosporina ocorreu um aumento significativo da produção de TNF- α de 29% nas células LLC-PK1 e de 30% nas células MDCK. Entretanto, quando as células foram pré-tratadas com H89 associada com Ciclosporina, nenhuma diferença significativa ocorreu em relação ao grupo tratado apenas com Ciclosporina (Figura 23, B).

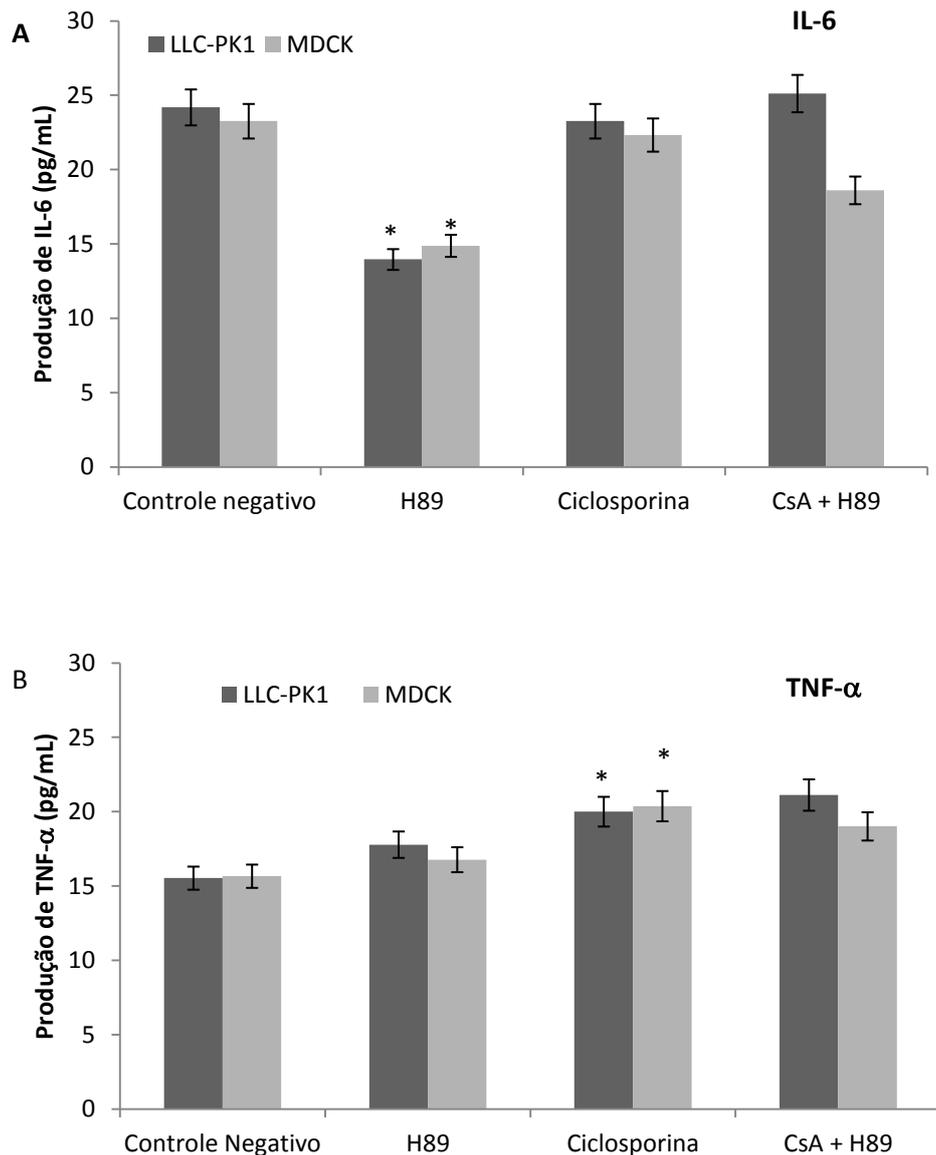


Figura 23. Efeitos da Ciclosporina na produção de IL-6 e TNF- α em células renais. A produção de cada citocina, IL-6 (A) e TNF- α (B), nos sobrenadantes das culturas celulares de LLC-PK1 e MDCK foram determinados por ELISA depois de 24 h de incubação com Ciclosporina (5,0 μ M), pre-tratamento por 30 minutos com H89 (1,0 μ M), Ciclosporina + H89. Os resultados apresentados em A e B representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o controle negativo (células não tratadas).

5.8 Efeitos do inibidor da Proteína Cinase A na produção do NO em células renais

5.8.1 Anfotericina B

Nas duas linhagens renais avaliadas a incubação apenas com o H89 aumentou significativamente a produção de óxido nítrico (Figura 24). Apenas as células MDCK apresentaram uma diminuição significativa (72%) na produção de óxido nítrico quando foram incubadas com Anfotericina B. Entretanto, ambas as linhagens conseguiram aumentar significativamente a produção de óxido nítrico quando foram pré-tratadas com H89 com posterior incubação com Anfotericina B. Nas células LLC-PK1 este aumento foi de 196% e na MDCK foi de 178% (Figura 24).

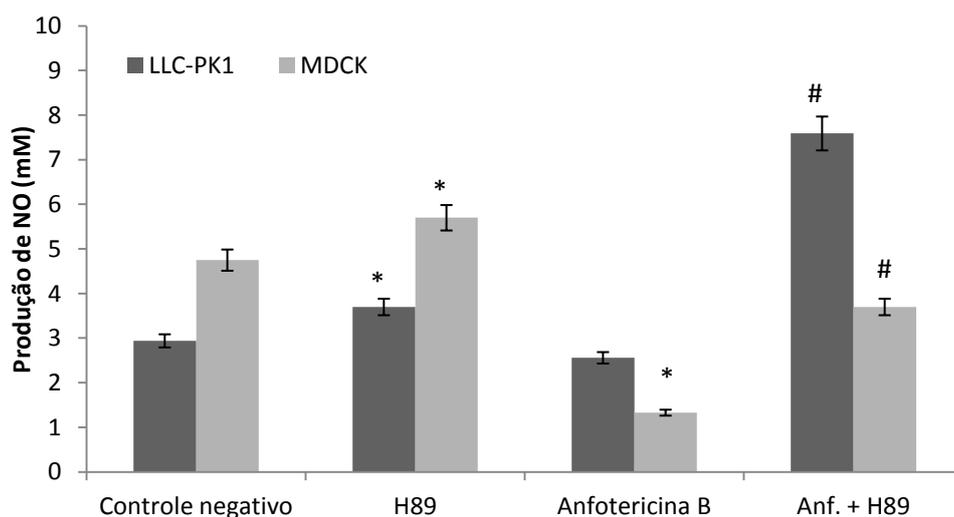


Figura 24. Efeitos da Anfotericina B na produção de Óxido Nítrico (NO) em células renais. A produção de NO nos sobrenadantes das culturas de células LLC-PK1 e MDCK foram determinados pela reação de Griess depois de 24 horas de incubação com Anfotericina B (4,0 µg/mL), pré-tratamento por 30 minutos com H89 (1,0 µM) e Anfotericina B + H89. Os resultados representam média±desvio padrão de três experimentos independentes realizados em sextuplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo (células não tratadas). # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com Anfotericina B.

5.8.2 Ciclosporina

Os resultados mostraram que a incubação com H89 aumentou significativamente a produção de óxido nítrico nas duas linhagens avaliadas (Figura 25). Em ambas as linhagens a Ciclosporina provocou uma significativa diminuição na produção de óxido nítrico, sendo de 26% nas células LLC-PK1 e de 70% nas células MDCK. Entretanto, ambas as linhagens foram capazes de aumentar significativamente a produção de óxido nítrico quando elas foram pré-tratadas com H89 e em seguida com Ciclosporina. Nas células LLC-PK1 a produção de NO aumentou 85% e nas células MDCK 90% (Figura 25), quando comparada com as células tratadas apenas com Ciclosporina.

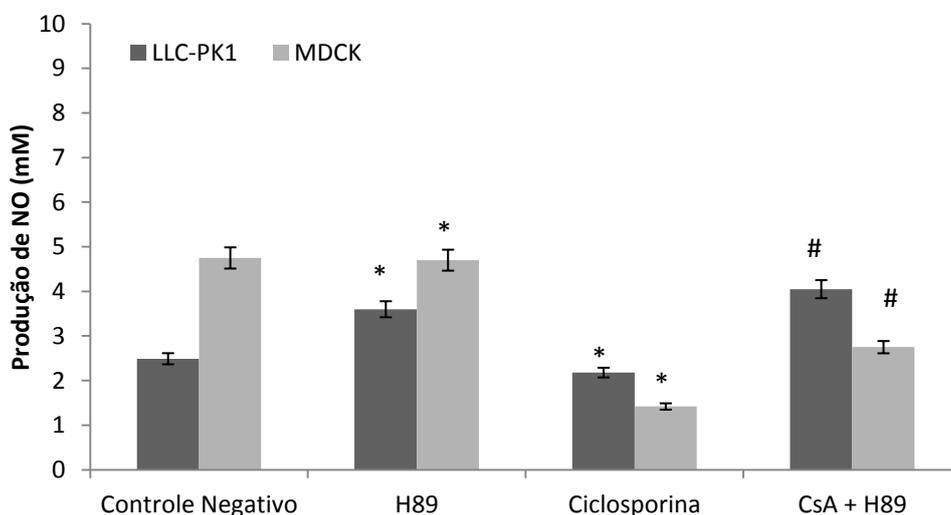


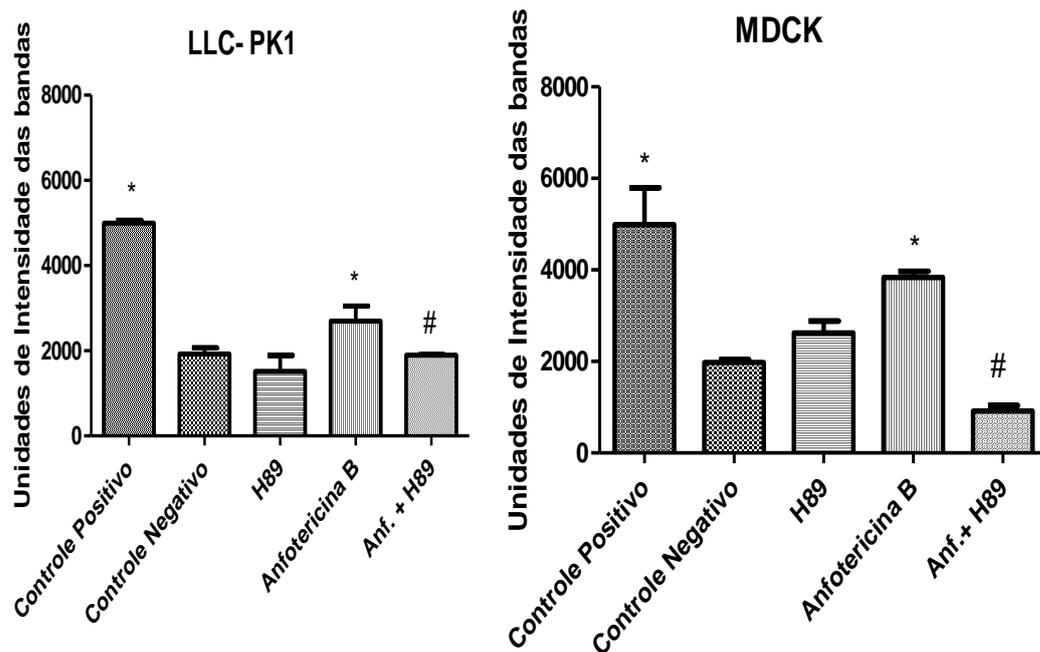
Figura 25. Efeitos da Ciclosporina na produção de Óxido Nítrico (NO) em células renais. A produção de NO nos sobrenadantes das culturas de células LLC-PK1 e MDCK foram determinados pela reação de Griess depois de 24 horas de incubação com Ciclosporina (5,0 μ M), pré-tratamento por 30 minutos com H89 (1,0 μ M) e Ciclosporina + H89. Os resultados representam média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em sextuplicata. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo (células não tratadas). # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado apenas com Ciclosporina.

5.9 Western Blot

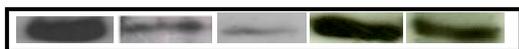
Como os resultados dos ensaios anteriores mostraram que a inibição da via PKA exerce influencia em vários parâmetros envolvidos na nefrotoxicidade como alteração da viabilidade celular, porcentagem de fragmentação do DNA, produção de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e produção de óxido nítrico, decidimos confirmar se a Anfotericina B e Ciclosporina induzem a ativação da via de sinalização PKA.

5.9.1 Anfotericina B induz a ativação da via PKA

Lisados das células estimulados por 3 horas com Forscolina (um ativador direto da Adenilato Ciclase - 10 μ M – Burgos et al., 2004), Anfotericina B (4,0 μ g/mL) e Anfotericina B (4,0 μ g/mL) associada a H89 (1,0 μ M) foram analisados pela técnica de *Western Blot* utilizando o anticorpo anti PKA α (domínio catalítico). Como observado na Figura 26, a intensidade das bandas dos grupos tratados com Forscolina (controle positivo) e com Anfotericina B aumentou significativamente ($p < 0,05$) nas duas linhagens celulares, quando comparadas com as bandas do controle negativo (células não tratadas). Quando as células foram expostas previamente ao inibidor da via PKA (H89) e posteriormente incubadas com a Anfotericina B, a intensidade das bandas foi menor que a do grupo tratado apenas com Anfotericina B.

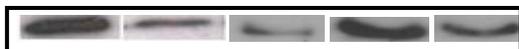


LLC-PK1



α PKA – 49 KDa

MDCK



α PKA – 49 KDa

Figura 26. Indução da ativação da via PKA pela Anfotericina B nas células renais LLC-PK1 e MDCK. Controle positivo: Forscolina (10 μ M); Controle Negativo: células não tratadas; Anf.= anfotericina B (4,0 μ g/mL). * $p < 0,05$ para valores com diferença estatisticamente significativa do grupo controle negativo. # $p < 0,05$ para valores com diferença estatisticamente significativa do grupo tratado apenas com Anfotericina B. A análise estatística foi realizada primeiramente analisando as imagens no software *Quantity One*, Bio-Rad e posteriormente por One-Way ANOVA e post-teste Tukey.

5.9.2 Ciclosporina induz a ativação da via PKA

Lisados das células estimulados por 3 horas com Forscolina (um ativador direto da Adenilato Ciclase - 10 μ M – Burgos et al., 2004), Ciclosporina (5,0 μ M) e Ciclosporina (5,0 μ M) associada a H89 (1,0 μ M) foram analisados pela técnica de *Western Blot* utilizando o anticorpo anti PKA α (domínio catalítico). Como observado na Figura 27, a intensidade das bandas dos grupos tratados com Forscolina (controle positivo) e com Ciclosporina

aumentou significativamente ($p < 0,05$) quando comparadas com as banda do controle negativo (células não tratadas). Quando as células foram expostas previamente ao inibidor da via PKA (H89) e posteriormente incubadas com a Ciclosporina, a intensidade das bandas foi menor que a do grupo tratado apenas com Ciclosporina, nas duas linhagens avaliadas.

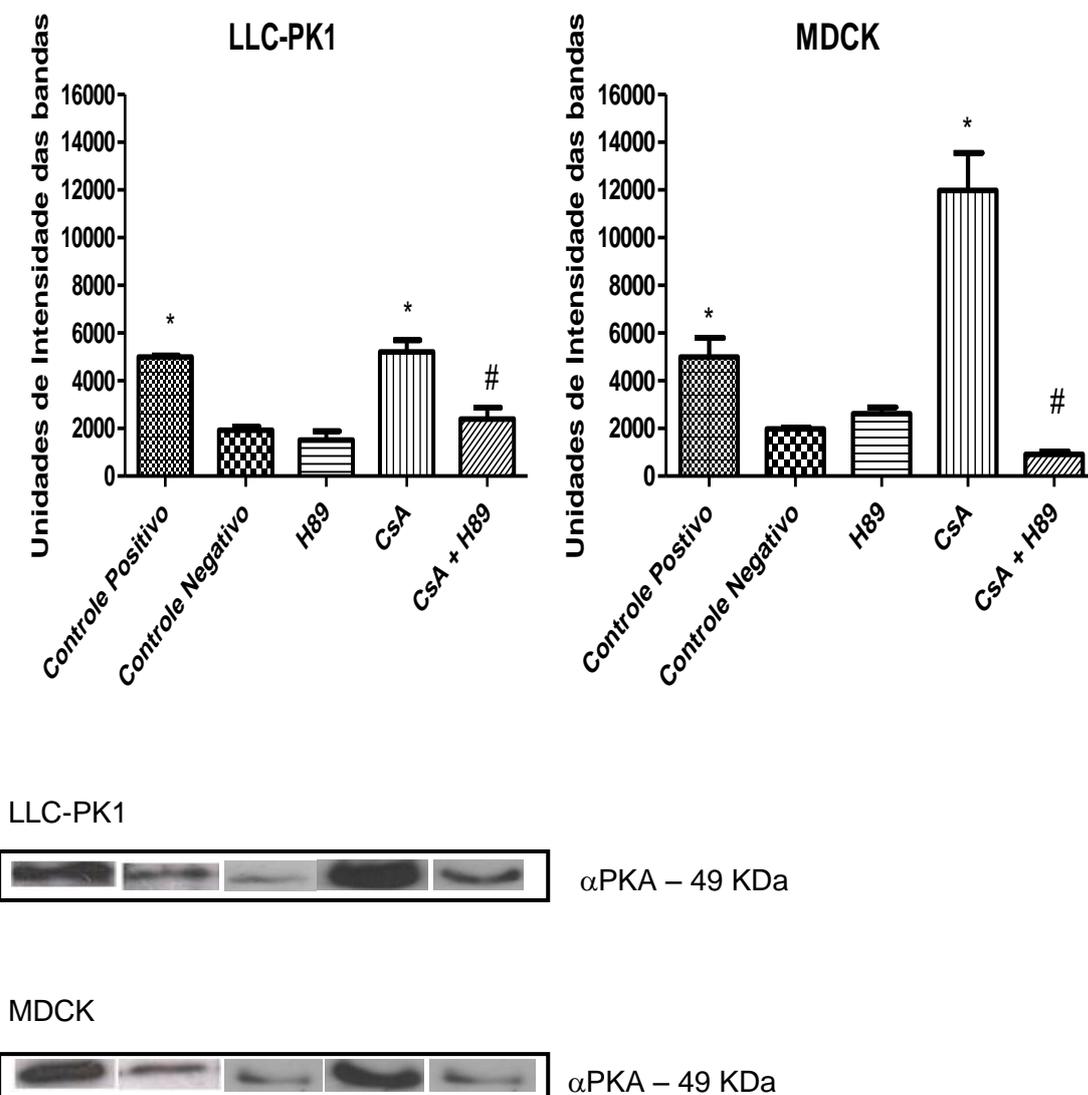


Figura 27. Indução da Ativação da via PKA pela Ciclosporina nas células renais LLC-PK1 e MDCK. Controle positivo: Forscolina (10 μ M); Controle Negativo: células não tratadas; CsA= ciclosporina (5,0 μ M).* $p < 0,05$ para valores com diferença estatisticamente significativa do grupo controle negativo. # $p < 0,05$ para valores com diferença estatisticamente significativa do grupo tratado apenas com Ciclosporina. A análise estatística foi realizada primeiramente analisando as imagens no software Quantity One, Bio-Rad e posteriormente por One-Way ANOVA e pos-teste Tukey.

6. DISCUSSÃO

6.1 Avaliação da Viabilidade celular utilizando Vermelho Neutro e MTT

Os estudos de viabilidade envolvendo dose e tempo/dependência, juntamente com a observação da capacidade de recuperação celular, são parâmetros importantes que podem fornecer importantes informações sobre os mecanismos e os tipos de toxicidade, incluindo apoptose e outros eventos (Eisenbrand et al., 2002). Além disso, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* podem ser usados para prever toxicidade humana e para uma triagem geral de substâncias químicas. Diferentes ensaios de citotoxicidade podem gerar resultados diversos dependendo do agente testado e do teste de citotoxicidade empregado. Portanto, é importante realizar mais de um ensaio de citotoxicidade para distinguir os efeitos entre organelas específicas e citotoxicidade geral (Fotakis & Timbrell, 2006).

Os testes de citotoxicidade do Vermelho Neutro e do MTT estão entre os ensaios mais comuns empregados para detecção de citotoxicidade ou viabilidade celular após exposição a substâncias tóxicas. O teste do MTT é baseado principalmente na conversão enzimática do MTT na mitocôndria, enquanto o teste Vermelho Neutro é um ensaio colorimétrico que avalia a capacidade de captação do corante pelos lisossomas funcionais (Fotakis & Timbrell, 2006). São os métodos *in vitro* mais comumente empregados para avaliação de atividade metabólica e funcional de organelas subcelulares: mitocôndria e lisossomas, respectivamente (Sovcikova et al., 2002).

Diversos estudos têm demonstrado o considerável envolvimento das mitocôndrias e dos lisossomas nos mecanismos de nefrotoxicidade (Rodriguez-Enriquez et al., 2004; Servais et al., 2006; Terman et al., 2006). As mitocôndrias são importantes organelas intracelulares responsáveis pela produção de energia (ATP). Essa energia intermediária é requerida para manutenção da homeostase celular e das funções normais das células. Contudo, após um distúrbio celular, o papel das mitocôndrias pode mudar

drasticamente e se tornarem um promotor da morte celular por apoptose e necrose (Crompton, 1999).

Os lisossomas possuem importante papel no processo apoptótico, pois esse pode ser iniciado pela ruptura dessa organela a partir de um estímulo exógeno. A liberação de enzimas lisossômicas para dentro do citoplasma celular pode iniciar uma cascata de eventos de degradação intracelular. Essas enzimas podem atacar a mitocôndria diretamente e induzir a liberação de citocromo c; direta ou indiretamente aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio mitocondrial (e induzir mais desestabilização lisossomal) e ativar proteínas pró-apoptóticas. Assim, o eixo lisossoma – mitocôndria exerce um importante papel na apoptose (Zhao et al., 2003).

O corante MTT é um sal de tetrazolium solúvel em água, que é convertido a um produto de cor púrpura (formazam) pela ação das succinato desidrogenases mitocondriais. O produto formazam se acumula nas células saudáveis (Fotakis & Timbrell, 2006) e a quantidade do formazam formado pode ser usada para refletir a viabilidade celular (Liu et al., 1997; Molinari et al., 2005).

O ensaio de Viabilidade Vermelho Neutro avalia a acumulação do corante em células viáveis. A incorporação do Vermelho Neutro por células viáveis pode ser modificada por alterações na superfície celular ou na membrana lisossomal. De acordo com a capacidade lisossomal de incorporar o corante, é possível distinguir células viáveis das lesadas ou mortas (Melo, 1996). A avaliação da incorporação do corante pelas células é feita por meio da leitura dos valores de absorvância, sendo esses proporcionais à viabilidade das células e dos lisossomas. Sendo assim, esse ensaio é um indicador de danos provocados ao lisossoma.

Quando realizamos os ensaios de viabilidade MTT e Vermelho Neutro utilizando Anfotericina B (Figura 11) percebemos que a toxicidade renal foi dependente do tempo e da concentração. Essa toxicidade pode ser observada

após uma hora de exposição em concentrações $\geq 4,0$ $\mu\text{g/mL}$, sendo mais acentuada após 24 horas. Muitos estudos mostram que a Anfotericina B causa lesões renais quando utilizada na faixa de concentrações de 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$ (Yano et al., 2009), sendo condizente com os nossos resultados, pois a Anfotericina B nessa faixa de concentração causou perda da viabilidade celular. Pode-se sugerir que seu efeito tóxico é iniciado via lisossomas e mitocôndrias, pois os testes de citotoxicidade utilizados avaliam a integridade dessas organelas.

Na prática clínica, a dose convencional de Anfotericina B é usualmente entre 0,4 a 0,7 mg/kg de peso corporal/dia, que resulta em concentrações plasmáticas de 0,5 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ (Gallis et. al., 1990 e Heinemann et al., 1997) e a resposta terapêutica da Anfotericina B contra fungos invasivos é usualmente alcançada quando níveis plasmáticos de 1,0 a 2,0 $\mu\text{g/mL}$ são obtidos (Bekersky et al., 2002). Tem sido relatado que a nefrotoxicidade aparece após o tratamento com altas doses de Anfotericina B (1,5 mg/Kg/dia), indicando que a concentração plasmática é estimada em cerca de 4,0 $\mu\text{g/mL}$ (Gates & Pinney, 1993), sendo essa a concentração em que a citotoxicidade foi iniciada nos nossos experimentos. Diante disso, esta concentração foi selecionada para ser utilizada nos demais experimentos desse trabalho.

Porém, as linhagens LLC-PK1 e MDCK apresentaram diferentes sensibilidades após uma hora de exposição ao fármaco. Nas células LLC-PK1 as oito concentrações provocaram citotoxicidade, de acordo com os dois testes, o que mostra que esta pode ser uma linhagem mais sensível. Nas células MDCK, pelo teste Vermelho Neutro, apenas as maiores concentrações provocaram citotoxicidade e pelo teste MTT, nenhuma das oito concentrações provocou citotoxicidade. Assim, o tempo de uma hora é importante para nos mostrar como células de diferentes origens podem apresentar diferentes sensibilidades a um determinado fármaco e como isto depende do método utilizado. De acordo com Fotakis & Timbrell (2006) diferentes ensaios de citotoxicidade podem gerar resultados diferentes dependendo do agente testado e do teste de citotoxicidade empregado. Portanto, é importante realizar mais de um ensaio de citotoxicidade para distinguir os efeitos entre organelas

específicas e citotoxicidade geral e também empregar diferentes linhagens celulares.

O transporte da Anfotericina B, assim como o de outros fármacos hidrofóbicos, é mediado por proteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL) e essas estão primariamente envolvidas no transporte de lipídeos e proteínas por toda a circulação sistêmica. Estudos indicam que esse fármaco se liga a lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade *in vivo* e *in vitro* e esse fenômeno está envolvido no desenvolvimento de toxicidade renal (Wasan, 1996).

A Anfotericina B pode penetrar nas células por um mecanismo de endocitose através de receptores LDL (Vertut-doi et al., 1994). O receptor LDL transporta macromoléculas relevantes, principalmente lipoproteínas ricas em colesterol (LDL), para dentro das células através de um processo chamado endocitose mediada por receptor. Esse processo envolve o reconhecimento dos receptores de superfície celular das partículas LDL proveniente da membrana celular externa, internalização dessas e transporte intracelular através de vesículas. A vesícula é degradada após fusão com lisossomas e libera lipídeos para o citoplasma da célula, enquanto isso o receptor é reciclado de volta à superfície da célula para se ligar a outras partículas de LDL (Chung & Wasan, 2004).

Sendo assim, pode-se sugerir que a Anfotericina B é liberada no interior celular dessa maneira, o que também é condizente com o ensaio de toxicidade Vermelho Neutro, pois esse ensaio avalia a integridade lisossomal. Portanto, a Anfotericina B, nas referidas concentrações, pode interagir com as membranas lisossomais, o que pode indicar que essa organela é altamente susceptível a ser danificada por esse fármaco. Assim, pode-se tentar explicar a diferença de sensibilidade do teste Vermelho Neutro em relação ao teste de citotoxicidade MTT.

Os resultados da Ciclosporina mostrados na Figura 12 também sugerem que a Ciclosporina exerce seu efeito tóxico inicialmente via lisossomas e mitocôndria, sendo a citotoxicidade dose-tempo dependente e tendo seu ápice

com 24 horas de exposição. No entanto, dada a complexidade das vias de toxicidade e das interações funcionais entre os principais componentes das células animais, os resultados de citotoxicidade podem diferir dependendo do critério de avaliação de cada teste (Peropadre et al., 2011).

Assim, os resultados de ambos os testes de citotoxicidade foram diferentes. Depois de seis horas de incubação, a citotoxicidade da Ciclosporina foi mais pronunciada pelo teste Vermelho Neutro. Dessa forma, podemos sugerir que a disfunção lisossomal foi induzida antes da disfunção mitocondrial, sendo os lisossomas alvos primários da Ciclosporina.

Além disso, os resultados demonstraram que células de diferentes regiões do néfron apresentam sensibilidade variada aos efeitos tóxicos da Ciclosporina. A LLC-PK1 é um modelo de célula dos túbulos proximais e a MDCK é um modelo de células dos túbulos distais (Ramseyer & Garvin, 2013). De acordo com Wilmes e colaboradores (2011), devido a heterogeneidade funcional e bioquímica dos néfrons, a susceptibilidade a toxicidade pode variar entre os segmentos do néfron. Portanto, as diferenças anatômicas, funcionais e bioquímicas entre os vários tipos celulares ao longo do néfron sugerem que cada uma dessas células responde de maneira característica à exposição de substâncias químicas ou condições patológicas como hipóxia ou isquemia.

De fato, os rins são os alvos primários de muitos fármacos, primeiro por causa da alta taxa de filtração sanguínea e segundo porque a presença de sistemas de transporte celular facilita a concentração destes compostos dentro das células epiteliais do néfron. Por causa da distribuição heterogênea dos sistemas de transporte e diferente habilidade para bioativar ou detoxificar xenobióticos, as diferentes populações celulares (e, portanto, as várias regiões dentro do rim) não possuem o mesmo grau de dano após a exposição a substâncias tóxicas. Portanto, populações de células distintas podem ser particularmente susceptíveis a uma classe de químicos e resistentes a lesão provocada por outra classe de substâncias (Pfaller & Gstraunthaler, 1998). Baseado nessas informações, ressalta-se a importância de padronizar várias linhagens para o estudo da nefrotoxicidade.

O desequilíbrio da homeostase do cálcio intracelular, alquilação proteica e estresse oxidativo celular são descritos como mudanças iniciais observadas em células renais expostas a compostos nefrotóxicos. Mitocôndria, retículo endoplasmático, lisossomas e membrana celular são identificados como alvos (Peyrou & Cribb, 2007). Assim, diante dos resultados obtidos com os ensaios de citotoxicidade Vermelho Neutro e MTT, podemos sugerir que a citotoxicidade provocada pela Ciclosporina é dose-dependente e apresenta seu pico com 24 horas de exposição.

Concentrações terapêuticas de Ciclosporina estão na faixa de 0,1 a 1,6 μM (Hauser et al., 1998; Kovarik et al., 2003). Jiang & Acosta (1993) também relataram que devido a sua alta lipofilicidade a Ciclosporina se acumula principalmente nos rins, e as concentrações podem atingir níveis até 50 vezes maiores do que encontrados no plasma. Diante disso, decidimos proceder os ensaios utilizando a concentração de 5,0 μM de Ciclosporina.

6.2 Avaliação de Morte celular por Citometria de Fluxo

O ensaio de fragmentação de DNA pode ser usado para a avaliação de morte celular induzida por diferentes tipos de estímulos: químicos (Mcneill-Blue et al., 2006; Gahr et al., 2008; Ramakrishnan et al., 2009), biológicos (Schoier et al., 2001) ou físicos (Tokalov et al., 2007; Zhang et al., 2008).

O ensaio de Citometria de Fluxo utilizando iodeto de propideo (PI) tem sido amplamente utilizado para a avaliação da apoptose em diferentes modelos experimentais. É baseado no princípio de que as células apoptóticas, entre outras características típicas, caracterizam-se pela fragmentação do DNA e, conseqüentemente, a perda do conteúdo de DNA nuclear (Riccardi & Nicoletti, 2006). O PI é um agente intercalante fluorescente que se liga ao DNA corando-o de vermelho.

O aumento da fragmentação do DNA observado no presente estudo pode ser interpretado como morte celular (Nicoletti et al., 1991; Lecoecur, 2002). Este achado sugere que a Anfotericina B e a Ciclosporina (Figura 13) podem ter efeitos na conformação ou estrutura do DNA, pois nas células tratadas com os fármacos ocorreram mais ligações do corante iodeto de propídeo com a molécula de DNA do que nas células não tratadas (controle negativo). Assim, este resultado mostra que a redução da viabilidade celular observada nos ensaios de Vermelho Neutro e MTT após o tratamento com Anfotericina B e Ciclosporina pode ser decorrente da morte celular ocasionada pelos mesmos.

As células renais epiteliais são alvos primários para as lesões e dependendo da natureza e extensões dos estímulos tóxicos as células tubulares perdem a integridade funcional transitoriamente ou morrem por necrose ou apoptose (Zhang et al., 2008).

O Iodeto de Propídeo é amplamente usado no estudo de morte celular, pois não penetra através da membrana celular íntegra e, portanto, diferencia células normais de células apoptóticas e necróticas. Uma característica das células em estágios iniciais de apoptose é a manutenção da integridade da membrana e a capacidade de excluir corantes como o PI (Aubry et al., 1999). Fases tardias da apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de PI nas células (Hashimoto et al., 2003). O aumento da permeabilidade da membrana celular pode ocorrer quando as células estão danificadas e metabolicamente inativas pela produção de radicais livres (Sangalli-Leite et al., 2011).

O Iodeto de Propídeo permite, também, analisar a distribuição de uma população de células entre as diferentes fases do ciclo celular. Isso porque a interação entre o corante e o DNA segue uma relação estequiométrica (uma molécula de PI a cada 4 a 5 pares de bases) e o conteúdo de DNA varia durante as diferentes fases do ciclo celular (G1 – 2n; G2 - 4n). Além disso, a fragmentação do DNA pode ser observada por meio dessa coloração, pois,

quando ocorre, o conteúdo de DNA torna-se menor que $2n$ (subdiploide) (Nicoletti et al., 1991).

Dessa maneira, podemos dizer que a Anfotericina B e Ciclosporina provocam morte celular em ambas as linhagens estudadas. Vários trabalhos relatam que baixas concentrações de fármacos induzem apoptose e altas concentrações necrose (Sangalli-Leite et al., 2011). A Anfotericina B provocou maior porcentagem de morte celular nas células LLC-PK1, o que mostra que as células dos túbulos proximais podem ser mais sensíveis aos efeitos tóxicos da Anfotericina B. Em relação a Ciclosporina, a maior porcentagem de morte ocorreu nas células MDCK, sugerindo que os efeitos tóxicos desse fármaco possam ser mais intensos nas células dos túbulos distais.

Através dos poros aquosos formados pela Anfotericina B nas membranas celulares ocorre um aumento do influxo de Ca^{2+} e, nas células dos mamíferos, a captação excessiva de Ca^{2+} pela mitocôndria pode induzir a abertura de poros de transição de permeabilidade, o que leva à despolarização da membrana e a liberação de citocromo c e outras proteínas apoptogênicas para dentro do citosol (Cohen et al., 2010).

Apoptose também tem sido claramente evidenciada em células tubulares e intersticiais de pacientes com nefrotoxicidade causada por uso crônico de Ciclosporina (Hauser et al., 2005). Apoptose de células tubulares é também observada em modelos animais e em culturas celulares (Amore et al., 2000). A geração de espécies reativas de oxigênio (indiretamente demonstrada *in vitro* em células tubulares epiteliais através do efeito protetor da prednisona (Jeon et al., 2005), a redução da expressão de Bcl-2, o aumento da expressão de Bax (em células mesangiais e também *in vivo*) (Han et al., 2006) e a translocação do Bax da mitocôndria (Justo et al., 2003) contribuem para a indução da apoptose. Em cultura de células tubulares, caspases 2, 9 e 3 são diretamente ativadas por Ciclosporina (Tarze et al., 2007).

6.3 Envolvimento da via PKA

Como a Anfotericina B e Ciclosporina provocaram queda na viabilidade e morte celular, resolvemos avaliar se a via de sinalização PKA pode estar envolvida nos mecanismos de nefrotoxicidade. Quando a avaliação foi realizada utilizando a técnica do Vermelho Neutro, a inibição da via PKA não alterou a queda da viabilidade celular provocada pela Anfotericina B e Ciclosporina (Figura 14, A e B) em nenhuma das linhagens celulares estudadas. Assim, poderíamos pensar que a inibição da via PKA não afetaria a viabilidade nas células LLC-PK1 e MDCK tratadas com Anfotericina B e Ciclosporina.

Entretanto, quando foi realizada a mesma avaliação utilizando a Citometria de Fluxo, uma técnica mais sensível, novamente nas células LLC-PK1 a inibição da via PKA não alterou o perfil de morte celular provocado pela Anfotericina B e Ciclosporina (Figura 15, A). Porém, quando a mesma análise foi realizada nas células MDCK, a inibição da via diminuiu a morte celular provocada pela Anfotericina B e Ciclosporina. Assim, os resultados sugerem que os efeitos tóxicos da Anfotericina B e Ciclosporina podem estar relacionados com a ativação da via PKA.

6.4 Avaliação da recuperação celular

Como a Anfotericina B e Ciclosporina provocaram queda na viabilidade que pode estar relacionada com morte celular, nosso próximo passo foi avaliar se após a interrupção do tratamento com os fármacos as células renais remanescentes conseguiam se recuperar dos efeitos nefrotóxicos dos mesmos.

Ambas as linhagens celulares renais conseguiram se recuperar do efeito tóxico ocasionado pela Anfotericina B, porém a LLC-PK1 se recuperou após 48 horas da remoção do fármaco e a MDCK após 72 horas. Novamente ressaltamos a diferença de comportamento entre células de diferentes regiões do néfron. Outros estudos mostraram que osteoblastos e fibroblastos se

recuperaram três dias após a remoção da Anfotericina B (Harmsen et al., 2011). Estudos clínicos mostram que os efeitos adversos da Anfotericina B são reversíveis após a descontinuação da terapia (Varlam et al., 2001).

Estes resultados também demonstram como a Anfotericina B pode prejudicar a capacidade de proliferação celular, pois o tempo de duplicação (*doubling time*) das populações de células LLC-PK1 e MDCK é, em média, 24,95 horas e elas somente conseguiram se recuperar após 48 e 72 horas, respectivamente.

Em relação à Ciclosporina, as células LLC-PK1 e MDCK conseguiram se recuperar após 24 horas da interrupção do tratamento. Diante disso, a capacidade de recuperação das células LLC-PK1 e MDCK quando expostas à Ciclosporina, foi completamente distinta da capacidade de recuperação mostrada quando essas foram expostas à Anfotericina B. Com a Anfotericina B ambas as linhagens conseguiram se recuperar, mas apresentaram diferentes tempos para que isto ocorresse. Isso mostra que as linhagens renais LLC-PK1 e MDCK apresentam sensibilidade diferenciada a fármacos e a capacidade de recuperação celular depende diretamente do fármaco utilizado. Recuperação celular pode ser um fenômeno tecido específico *in vivo* (Combes, 1999).

As células respondem aos estresses fisiológicos e patológicos de diferentes maneiras, incluindo adaptação, reparo ou detendo o crescimento celular. Proliferação celular é um processo rigorosamente regulado que envolve uma sequência ordenada de eventos moleculares que asseguram que, antes da divisão, as células tenham uma completa replicação do DNA e segregação cromossômica. A proliferação das células tubulares renais possui um papel chave no reparo celular em consequência de lesão tóxica ou isquêmica e a interrupção do crescimento celular mediado por agentes nefrotóxicos pode ter implicações na regeneração das células tubulares.

Pesquisadores que avaliaram o efeito da Ciclosporina na proliferação celular de células renais *in vitro*, utilizando concentrações de 4,2 a 42 μM , concluíram que a Ciclosporina inibe a síntese de DNA de maneira tempo e

concentração-dependentes (Lally et al., 1999). Com a concentração utilizada em nossos estudos (5,0 μ M), as células remanescentes conseguiram se recuperar após 24 horas da retirada da Ciclosporina. Isso pode indicar que o DNA danificado é um evento inicial da nefrotoxicidade da Ciclosporina e um indicador sensível da lesão causada pela Ciclosporina em células epiteliais renais.

Atualmente, acredita-se que a reparação das células epiteliais em resposta a lesões renais é conseguida principalmente por diferenciação, migração e proliferação de células tubulares, com restauração final da integridade do tecido sobrevivente (Cantaluppi et al., 2008; Humphreys et al., 2008). Permanece incerto se todas as células tubulares sobreviventes mantêm a capacidade de repovoar o túbulo ou se regeneração é realizada por uma subpopulação de células ainda não totalmente caracterizadas (Al-Awqati & Oliver, 2006). Também permanecem indefinido quais são os fatores que estimulam o reparo epitelial.

Administração de fatores de crescimento exógenos, como os membros da família dos fatores de crescimento como o fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) aceleram recuperação (Harris, 1997) e expressão renal desses fatores aumentam em resposta a lesões renais (Harris, 1997; Zeng et al., 2009). Células renais são capazes de produzir fatores de sobrevivência intrínsecos como IGF-1, prostaglandinas derivadas da ciclooxigenase-2 e eicosanoides, os quais facilitam recuperação (ou evitam lesão tóxica). É consensual que diferentes tipos celulares requerem diferentes mediadores para sofrer apoptose ou sobreviver a lesões tóxicas (Varlam et al., 2001).

Também existe um consenso sobre a relevância científica de avaliar a recuperação em culturas celulares e como os resultados podem ser interpretados com respeito ao que ocorre *in vivo*. Assim, a recuperação pode ser um parâmetro importante para ser avaliado *in vitro*, em razão de fornecer

informações úteis adicionais para avaliação de eficácia e segurança (Combes, 1999).

Diante disso, como os experimentos anteriores sugeriram o envolvimento da via PKA na nefrotoxicidade dos fármacos, resolvemos avaliar se a inibição da via PKA poderia afetar a capacidade de recuperação celular. Nossos resultados mostraram que a inibição da via PKA não prejudicou a capacidade de recuperação celular após tratamento com Anfotericina B e Ciclosporina.

Células tubulares epiteliais possuem uma grande capacidade de recuperação através da proliferação e diferenciação das células epiteliais sobreviventes, o que envolve a regulação de numerosos sinais celulares intrínsecos temporariamente expressos (Bonventre et al., 2003). Estudos recentes mostraram que a via de sinalização ERK está diretamente envolvida na capacidade de recuperação celular, pois o bloqueio da ativação da ERK usando um inibidor específico (U0126) prejudicou a recuperação de células epiteliais tubulares (Jang et al., 2013).

6.5 Influência da via PKA na produção de IL-6 e TNF- α

Outro ponto avaliado foi a produção de citocinas pró-inflamatórias, devido ao fato destas estarem envolvidas nos processos inflamatórios decorrentes da nefrotoxicidade. Como sabemos que as citocinas IL-6 e TNF- α estão envolvidas em doenças renais, decidimos avaliar se a Anfotericina B e Ciclosporina induzem a produção dessas citocinas e se a inibição da via PKA altera a produção das mesmas nas células renais. A Anfotericina B estimulou a produção de IL-6 em ambas linhagens celulares e a inibição da via PKA diminuiu a produção de IL-6 quando as células foram tratadas com Anfotericina B (Figura 22, A). Estes resultados estão de acordo com outros estudos que também mostraram que a inibição da via PKA com H89 diminuiu a produção de IL-6 (Kiriya et al., 1997). Segundo Stein e Sutherland (1998), a produção de

IL-6 é aumentada por uma variedade de estímulos, incluindo forskolina, um ativador direto da PKA.

Implicação da via PKA na regulação da produção de IL-6 e TNF- α tem sido previamente demonstrada em vários tipos celulares (Grandjean-Laquerriere et al., 2003). O segundo mensageiro AMPc induz a produção de IL-6 (Kiryama et al., 1997) e a expressão do gene da IL-6 é regulado pelo elemento responsivo ao AMPc (CRE). O CRE é regulado pela proteína de ligação ao CRE (CREB) a qual é ativada por PKA (Gonzalez & Montminy, 1989). Assim, Anfotericina B pode estimular a PKA a induzir a produção de IL-6 nas células LLC-PK1 e MDCK. IL-6 possui um papel central na resposta imune e em reações de fase aguda (Kiryama et al., 1997).

Esses resultados sugerem que a inibição da via PKA pode ajudar a reduzir a nefrotoxicidade da Anfotericina B, pois a citocina pro-inflamatória IL-6 tem sido associada com a patofisiologia da nefrotoxicidade (Streetz et al., 2001). Outros autores também mostraram que a Anfotericina B estimula a transcrição e a produção de citocinas pro-inflamatórias como IL-6 (Chai et al. 2013). O bloqueio da sinalização da IL-6 é efetivo no controle dos sintomas da artrite reumatoide e na prevenção da destruição das articulações. É possível que outras condições inflamatórias sistêmicas possam se beneficiar dessa estratégia terapêutica (Fonseca et al., 2009).

A inflamação possui um papel central na patogenia de fármacos e induz lesão renal. Ela é mediada através da expressão de citocinas após ativação de receptores do tipo Toll (TLRs) localizados no parênquima renal e células tubulointerciliais (Chai et al., 2013). A resposta pró-inflamatória à Anfotericina B é mediada por um mecanismo dependente de TLR e esta habilidade para ativar TLRs pode ser relacionada ao fato da Anfotericina B ser um produto da fermentação de *Streptomyces nodosus* (Razonable et al., 2005).

O desenvolvimento de fármacos induzindo nefrotoxicidade tem sido descrito como iniciado imunologicamente através de receptor do tipo Toll- 4 (TLR4) e a via de sinalização TLR4 já foi associada com a patogenia da

cisplatina induzindo nefrotoxicidade (Chai et al., 2013). A síntese de TLR4 é responsável pela ativação das vias ERK1/2, PI3K/Akt e PKA. Estas vias fosforilam a subunidade p65 do NF- κ B, o que leva a ativação do NF- κ B. A ligação da subunidade ativada p65 NF- κ B ao gene promotor IL-6 induz a síntese de IL-6 em condrócitos humanos T/C28a2 (Wamg et al., 2011). Assim, podemos sugerir que a inibição da via PKA provocou diminuição na produção de IL-6 nas células renais estimuladas com Anfotericina B devido à ausência de ativação do NF- κ B.

O NF- κ B possui um papel chave na regulação das respostas inflamatórias. Sobre condições fisiológicas, NF- κ B é inativado pela I κ B- α . Em resposta a vários sinais, as subunidades p50 e p65 se dissociam do I κ B- α , translocam dentro do núcleo e se ligam a sequências específicas na região promotora de genes associados com inflamação, como os genes das citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a via de sinalização Janus cinase (JAK) – STAT é uma cascata pró-inflamatória vital que medeia as respostas imune. Estudos prévios tem sugerido que STAT participa em vias de sinalização pro-inflamatórias induzidas por LPS e outros estímulos pro-inflamatórios (Liljeroos et al., 2008). A via JAK é ativada pela ligação do ligante ao receptor e induz fosforilação do domínio citoplasmático do receptor para recrutar subtipos específicos das STATs, as quais são fosforiladas. STATs fosforiladas são liberadas do complexo com o receptor e formam homodímeros ou heterodímeros que então translocam dentro do núcleo para modular a expressão gênica de genes que codificam mediadores pró-inflamatórios (Hu et al., 2007).

Quando avaliamos a produção de IL-6 pela Ciclosporina, percebemos que a mesma não induziu a produção de IL-6 nas células renais (Figura 23, A), o que pode ser devido à concentração utilizada (5,0 μ M) e/ou ao tempo de exposição que não foi suficiente (24 horas).

Em relação ao TNF- α , a produção foi independente da via PKA nas duas linhagens (Figuras 22 e 23, B). A Anfotericina B estimulou a produção de TNF-

α apenas nas células MDCK (Figura 22, B), enquanto a Ciclosporina causou aumento da produção do mesmo nas duas linhagens (Figura 23, B).

Ratos tratados com Ciclosporina exibiram um aumento significativo na expressão renal de TNF- α que pode ser devido á isquemia renal e à vasoconstrição que estão frequentemente associados com administração de Ciclosporina. Muitos pesquisadores relataram que a isquemia renal leva a aumentos nos níveis de TNF- α (Donnahoo et al., 2000; Gabr et al., 2011). Além disso, estresse oxidativo e produtos da peroxidação lipídica possivelmente servem como ativadores de fatores de transcrição, levando a indução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e liberação de muitas citocinas inflamatórias incluindo TNF- α (Mariappan et al., 2007). Assim, podemos dizer que os dois fármacos nefrotóxicos apresentaram perfis distintos de produção de citocinas pró-inflamatórias, pois a Anfotericina B estimulou a produção da IL-6, enquanto que a Ciclosporina provocou um aumento na produção do TNF- α , nas duas linhagens renais.

6.6 Influência da via PKA na produção de óxido nítrico

Diante da relação conhecida entre os mecanismos de nefrotoxicidade com vasoconstrição renal, a próxima etapa do nosso trabalho foi verificar a participação do óxido nítrico na nefrotoxicidade ocasionada pela Anfotericina B e Ciclosporina e o envolvimento da PKA nesse contexto. Em ambas as linhagens renais a inibição da via PKA com H89 aumentou a produção de óxido nítrico, o que mostra que esta produção é dependente de PKA (Figuras 24 e 25). A Anfotericina B provocou uma diminuição na produção de NO apenas nas células MDCK e a Ciclosporina provocou uma diminuição nas duas linhagens. Entretanto, quando as células estavam com a via PKA inibida e posteriormente foram tratadas com Anfotericina B e Ciclosporina, houve um aumento significativo na produção do NO. A via PKA é citada na literatura como participante na fosforilação da óxido nítrico sintase (Genestra et al., 2001) e dependendo da isoforma da NOS, a forma fosforilada é inativa.

O óxido nítrico é um mediador pro-inflamatório (Park et al., 2013) e possui efeitos diretos nos processos vascular, inflamatórios e celulares (Hegarty et al., 2002). O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina pela ação da óxido nítrico sintase. A suplementação com L-arginina tem mostrado efeito na proteção dos rins obstruídos e as ações vasodilatadoras do NO provavelmente estão envolvidas (Hegarty et al., 2002). A vasoconstrição renal é atribuída ao desequilíbrio na liberação de substâncias vasoativas incluindo redução de fatores vasodilatadores em particular óxido nítrico (Shihab et al., 2000; Yoon & Yang, 2009). Após a sua liberação, o óxido nítrico interage com o grupo heme da Guanilato Ciclase (GC), levando a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e ao relaxamento das células lisas vasculares (Oga et al, 2003).

Em relação à Ciclosporina, os níveis de NO diminuíram significativamente após o tratamento. Esta descoberta está de acordo com estudos prévios (Chander et al., 2005; Chander & Chopra, 2005). A redução do NO associado com a nefrototoxicidade ocasionada pela Ciclosporina pode ser atribuída à habilidade da Ciclosporina em evitar a defosforilação da NOS e sua ativação subsequente (Dawson et al., 1993). A vasoconstrição da Ciclosporina é dependente da NOS, revertida pela suplementação com L-arginina e envolve “down regulation” da NOSe (Zhu et al., 2012). A Anfotericina B provocou uma diminuição na produção de NO e estudos prévios propuseram que a toxicidade tubular renal e a vasoconstrição arteriolar aferente como possíveis fatores fisiológicos causados pela Anfotericina B (Chai et al., 2013).

Como em ambas as linhagens estudadas a produção de óxido nítrico aumentou quando as células foram incubadas com H89 e, posteriormente, com Anfotericina B e Ciclosporina (quando comparado com a produção quando as células foram tratadas apenas com as fármacos), podemos sugerir que a inibição da via PKA possui um efeito benéfico na prevenção/diminuição da nefrotoxicidade causada por essas, pois pode favorecer a produção do NO, e conseqüentemente, um efeito vasodilatador.

6.7 Anfotericina B e Ciclosporina induzem a ativação da via PKA

Perante os resultados mostrados anteriormente, os quais demonstraram que os dois fármacos diminuíram a viabilidade celular, causaram morte e promoveram a produção de citocinas pro-inflamatórias e prejuízo na produção de óxido nítrico, com influência da via PKA em todos esses processos, decidimos confirmar se a PKA realmente é ativada pela Anfotericina B e Ciclosporina. Em ambas as linhagens celulares, o grupo de células tratados com Forscolina (Controle positivo - ativador PKA – Burgos et al., 2004) e os grupos tratados com Anfotericina (Figura 26) e Ciclosporina (Figura 27) apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo (células não tratadas), mostrando que os fármacos induzem a ativação da PKA. Outra evidência da indução da ativação da via PKA foi obtida quando percebemos uma diferença significativa comparando os grupos tratados com os fármacos associados com H89 com os grupos tratados apenas com os fármacos. O H89 é um inibidor altamente seletivo da via PKA (Bracken et al., 2006).

Assim, de acordo com os resultados do Western Blot, confirmamos que a Anfotericina B e a Ciclosporina induzem a ativação da PKA, o que já havia sido sugerido pelos nossos ensaios anteriores. O anticorpo primário utilizado, denominado anti-PKA α detecta níveis endógenos da proteína PKA α total, ou seja, da subunidade catalítica α , responsável pelas fosforilações de substratos que podem estar relacionados ao efeito nefrotóxico do fármaco. Em linfócitos B, a ativação da PKA causou uma reduzida expressão da proteína anti-apoptótica Mcl-1 (Myklebust et al., 1999).

Portanto, podemos sugerir que a indução da ativação da PKA pela Anfotericina B e Ciclosporina provoque também uma diminuição na expressão dessa proteína anti-apoptótica e isso pode ser uma possível explicação para a diminuição da fragmentação do DNA (morte celular) quando a via PKA estava inibida, nas células MDCK. Os efeitos da PKA na apoptose são susceptíveis de serem dependentes do tipo de células e dos mecanismos que induzem a apoptose (Franklin & McCubrey, 2000).

Podemos sugerir também que a Anfotericina B e a Ciclosporina provocam um aumento na liberação do AMPc a partir da ligação dos fármacos a proteína G, ativação da Adenilato Ciclase com consequente liberação de AMPc e consequentemente ativação da PKA. Aumento de AMPc pode promover apoptose (Franklin & McCubrey, 2000) e a indução de apoptose pelo AMPc é mediada pela inibição da via Ras/Ref/MEK (Hafner et al., 1994; Marshall, 1995). A Ciclosporina reduz a expressão de fosfodiesterases e pode aumentar os níveis de AMPc, o que leva a ativação de PKA (Edemir et al., 2008).

Além disso, alguns autores mostraram que a ativação da PKA pode provocar um aumento da morte celular e a atividade da PKA tipo II está relacionada com os efeitos pró-apoptóticos (Cross et al., 2000). Em células de ratos com leucemia (Vintermyr et al., 1993) e em células precursoras de linfócitos B (Myklebust et al., 1999) o tratamento com a subunidade catalítica da PKA ou ativação da via de sinalização PKA, respectivamente, provocou um aumento da morte celular. No caso das células B, a ativação da PKA está relacionada com redução da expressão da proteína antiapoptótica Mcl-1, da família Bcl-2 (Myklebust et al., 1999). As expressões de Bax e do fator indutor da apoptose (AIF) são reguladas pela via de sinalização PKA (Park et al., 2006).

Outra sugestão é que, como a Anfotericina B provoca um aumento do influxo de sódio, este pode causar uma ativação da PKA independente do AMPc. O sódio ativa a dissociação da PKAc e esta ativa a translocação do NF- κ B do núcleo e dessa forma ocorre a liberação de citocinas inflamatórias, o que provoca nefrotoxicidade.

Diferentes vias de sinalização podem convergir para os mesmos substratos e fosforilar idênticos ou diferentes sítios. Isto pode afetar a atividade de substratos mediados por ambas às vias (Gerits et al., 2008). Conhecer como as vias de sinalização são interconectadas não somente aumenta nosso conhecimento das funções celulares, mas também nos ajuda a desenhar e desenvolver terapias mais efetivas para condições clínicas com alterações nas

vias de transdução de sinais. O câncer é um exemplo típico de doença com alteração nas vias de transdução e muitos inibidores específicos de proteínas cinases estão sendo usados na clínica ou estão começando a serem testados em triagem clínica com aspectos promissores (Mikalsen et al., 2006). Como distúrbios na ação de uma proteína cinase pode afetar outras proteínas cinases através de relações cruzadas, pode haver várias vantagens de tratar pacientes com um coquetel de inibidores de proteínas cinases.

Neste contexto, as células dos mamíferos possuem numerosas vias de transdução de sinais que podem agir sozinhas ou interconectadas, um fenômeno referido como “cross-talk”. Isto permite a regulação da distribuição, duração, intensidade e especificidade da resposta celular.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no nosso trabalho, podemos sugerir que a inibição da via PKA pode auxiliar na diminuição da nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B e Ciclosporina, pois ocorreu uma queda na fragmentação do DNA quando a via PKA estava inibida, diminuição da produção de mediadores inflamatórios (citocinas IL-6 e TNF- α), aumento na produção de NO e a inibição da via PKA não prejudicou a capacidade de recuperação das células renais.

Dessa forma, esses estudos *in vitro* podem auxiliar no desenvolvimento de novas formulações de Anfotericina B e Ciclosporina, em que o fármaco seja conjugado com um inibidor específico da via PKA para tentar amenizar/prevenir a nefrotoxicidade ocasionado pelos mesmos.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Utilizar inibidores específicos das isoformas da NOS para verificar qual delas está envolvida com a nefrotoxicidade e com as ações da PKA;
- ✓ Avaliar a expressão de TGF- β nas linhagens LLC-PK1 e MDCK após exposição à Anfotericina B e Ciclosporina e se a inibição via PKA altera esse processo;
- ✓ Avaliar se a Anfotericina B e Ciclosporina induzem a ativação das vias p38 MAPK e ERK utilizando as linhagens LLC-PK1 e MDCK.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-AWQATI, Q.; OLIVER, J.A. The kidney papilla is a stem cells niche. **Stem Cell Rev**, v.3, p.181-184.2006.
- AMORE, A.; EMANCIPATOR, S.N.; CIRINA, P. Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells. **Kidney Int**, v. 57, p. 1549–1559.2000.
- AUBRY, J.P.; BLAECHE, A.; LECOANET-HENCHOZ, S.; JEANNIN. P.; HERBAULT, N.; CARON, G.; MOINE, V.; BONNEFOY, J.Y. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. **Cytometry**, v. 37, p.197–204.1999.
- BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. **Appl Environ Microb**, v.57, n.7, p. 2101-2103. July 1991.
- BALAKUMAR, P.; ROHILLAB, A.; THANGATHIRUPATHIA, A. Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? **Pharmacol Res**, v. 62, p.179–186. 2010.
- BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol**, v.11, p. 372–377.2001.
- BEKERSKY, I.; FIELDING, R.M.; DRESSLER, D.E.; LEE, J.W.; BUELL, D.N.; WALSH, T.J. Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.828–833.2002.
- BICHET, D.G. Lithium, Cyclic AMP Signaling, A-Kinase Anchoring Proteins, and Aquaporin-2. **J Am Soc Nephrol**, v.17, p. 920–922. 2006.
- BOBADILLA, N.A.; GAMBA, G.; TAPIA, E.; GARCIA-TORRES, R.; BOLIO, A.; LOPEZ-ZETINA, P.; HERRERA-ACOSTA J. Role of NO in cyclosporin nephrotoxicity: Effects of chronic NO inhibition and NO synthases gene expression. **Am J Physiol**, v. 274, p. 791–798.1998.
- BOBADILLA, N.A.; GAMBA, G. New insights into the pathophysiology of cyclosporine nephrotoxicity: a role of aldosterone. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 293, p. 2–9. 2007.
- BONVENTRE, J.V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. **J Am Soc Nephrol**, v.14, S55–61.2003.
- BOSSE, D.; KOLB, H.J.; WILMANN, W. Serum pharmacology of amphotericin B applied in lipid emulsions. **Antimicrob Agents Chemother**, 1997.

BRACKEN, N.; ELKADRI, M.; HART, G.; HUSSAIN, M. The role of constitutive PKA-mediated phosphorylation in the regulation of basal I(Ca) in isolated rat cardiac myocytes. *Br J Pharmacol.* v. 148, p.1108-15. 2006.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal Biochemistry*, v. 7, p. 248-254.1976.

BURGOS, P.V.; KLATTENHOFF, C.; FUENTE, E.; RIGOTTI, A.; GONZALEZ, A. Cholesterol depletion induces PKA-mediated basolateral-to-apical transcytosis of the scavenger receptor class B type I in MDCK cells. *PNAS*, v. 101, n. 11, p. 3845–3850. 2004.

CANTALUPPI, V.; BIANCONE, L.; ROMANAZZI, G.M.; FIGLIOLINI, F.; BELTRAMO, S. et al. Macrophage stimulating protein may promote tubular regeneration after acute injury. *J Am Soc Nephrol*, v.19, p. 1904–18.2008.

CHAI, L.Y.; NETEA, M.G.; TAI, B.C.; KHIN, L.W.; VONK, A.; TEO, B.W.; SCHLAMM, H.T.; HERBRECHT, R.; DONNELLY, J.P.; TROKE, P.F.; KULLBERG, B.J. An elevated pro-inflammatory cytokine response is linked to development of amphotericin B-induced nephrotoxicity. *J Antimicrob Chemother*, v.68, n.7, p.1655-9. 2013.

CHANDER, V.; CHOPRA, K. Role of nitric oxide in resveratrol-induced renal protective effects of ischemic preconditioning. *J Vasc Surg*, v. 42, n. 6, p. 1198-205. 2005.

CHANDER, V.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin protects against cyclosporine-induced nephrotoxicity through nitric oxide dependent mechanism. *Toxicology*, v. 210, p. 55–64.2005

CHAVES, M.M., et al., Role PKA and p38 MAPK on ROS production in neutrophil age-related: Lack of IL-10 effect in older subjects. *Mech Ageing Dev*, v.130, n. 9, p. 588-91. 2009.

CHUNG, N.S.; WASAN, K.M. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv Drug Deliver Rev*, v.56, n.9., p.1315-1334. 2004.

COHEN, B.E. Amphotericin B membrane action: role for two types of ion channels in eliciting cell survival and lethal effects. *J Membr Biol*, v. 238, p. 1–20.2010.

COMBES, RD. Summary of discussion: in vitro models for investigation of chronic toxicity and reversibility. *Toxicol In Vitro*, v.13, n.4-5, p. 853-7.1999.

CREAGH, E. M.; CONROY, H.; MARTIN, S. J. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*, v. 193, p. 10-21. 2003.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, v. 341, p. 233–249, 1999.

CROSS, T.G.; SCHEEL-TOELLNER, D.; HENRIQUEZ, N.V.; DEACON, E.; SALMON, M.; LORD, J.M. Serine/Threonine Protein Kinases and Apoptosis. **Exp Cell Res**, v. 256, p. 34–41. 2000.

DAWSON, T.M., STEINER, J.P., DAWSON, V.L., DINERMAN, J.L., UHL, G.R., SNYDER, S.H. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci**. v. 90, p. 9808–9812.1993.

DIVIANI, D.; SCOTT, J.D. AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. **J Cell Sci**, v. 114, p.1431-1437.2001.

DONNAHOO, K.K.; MELDRUM, D.R.; SHENKAR, R.; CHUNG, C.S.; ABRAHAM, E.; HARKEN, A.H. Early renal ischemia, with or without reperfusion, activates NFKappa B and increases TNF-alpha bioactivity in the kidney. **J Urol**, v. 163, p. 1328-1332. 2000.

EBENEZER, P.J.; MARIAPPAN, N.; ELKS, C.; HAQUE, M.; SOLTANI, Z.; REISIN, E., FRANCIS, J. Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on high-fat diet-induced metabolic and renal alterations in rats. **Life Sci**, v. 85, n. 9-10, p. 357–364.2009.

EDEMIR, B., REUTER, S., BORGULYA, R., SCHRÖTER, R., NEUGEBAUER, U., GABRIËLS, G., SCHLATTER, E. Acute Rejection Modulates Gene Expression in the Collecting Duct. **J Am Soc Nephrol**, v. 19, n. 3, p. 538–546. 2008.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods in vitro toxicology. **Food Chem Toxicol**, v. 40, n. 2-3, 193-236, 2002.

EL MOUEDDEN, M.; LAURENT, G.; MINGEOT-LECLERCQ, M.P.; TULKENS, P.M. Gentamicin-Induced Apoptosis in Renal Cell Lines and Embryonic Rat Fibroblasts. **Toxicol Sci**, v. 56, n. 1, p. 229-239, 2000.

FADILI, W.; ALLAH, M.H.; LAOUAD, I. Chronic Renal Allograft Dysfunction: Risk Factors, Immunology and Prevention. **Arab J Nephrol Transplant**, v.6, n.1, p. 45-50..2013.

FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochim Biophys Acta**, v. 1757, n. 9-10, p. 1371-1387. 2006.

FONSECA, J.E.; SANTOS, M.J.; CANHÃO, H.; CHOY, E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, p. 538–542. 2009.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, v.160, n. 2, p.171-177. 2006.

FRANK, S.; GAUME, B.; BERGMANN-LEITNER, E. S.; LEITNER, W. W.; ROBERT, E. G.; CATEZ, F.; SMITH, C. L. ; YOULE, R. J. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. **Dev Cell**, v. 1, n. 4, p. 515-525. 2001.

FRANKLIN, R.A.; MCCUBREY, J.A. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. **Leukemia**, v. 14, n.12, p. 2019-34. 2000.

FRUMAN, D.A.; MATHER, P.E.; BURAKOFF, S.J.; BIERER, B.E. Correlation of calcineurin phosphatase activity and programmed cell death in murine T cell hybridomas. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 10, p. 2513-7. 1992.

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. 2011.

FUKASAWA, M. Liposomal amphotericin B. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.46, n.4, p.229-231, 2005.

GABR, M.M.; HUSSEIN, A.M.; SHERIF, I.O.; ALI, S.I.; MOHAMED, H.E. Renal ischemia /reperfusion injury in type II DM: Possible role of proinflammatory cytokines, apoptosis, and nitric oxide. **J Physiol Pathophysiol**, v. 2, n. 1, p. 6-17.2011.

GAHR, S.; PETER, G.; WISSNIOWSKI, T. T.; HAHN, E. G.; HEROLD, C. ; OCKER, M. The histone-deacetylase inhibitor MS-275 and the CDK-inhibitor CYC-202 promote anti-tumor effects in hepatoma cell lines. **Oncol Rep**, v. 20, n. 5, p. 1249-1256. 2008.

GALLIS, H. A.; DREW, R.H.; PICKARD, W.W. Amphotericin B: 30 years of clinical experience. **Rev Infect Dis**, v. 12, p. 308–329.1990.

GATES, C.; PINNEY, R.J. Amphotericin B and its delivery by liposomal and lipid formulations. **J Clin Pharm Ther**, v. 18, p. 147–153.1993.

GEKLE, M. et al. Albumin endocytosis in OK cells: dependence on actin and microtubules and regulation by protein kinases. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 272, n. 5, p.668-677.1997.

GENESTRA, M.; ECHEVARRIA, A.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L.L. Protein kinase A of *Leishmania amazonensis* as a potential target for methoxyamidine. **Arzneimittel-Forsch**, v.51, n.11, p.920-3. 2001.

GERITS, N., KOSTENKO, S., SHIRYAEV, A., JOHANNESSEN, M., MOENS, U. Relations between the mitogen-activated protein kinase and the cAMP-dependent protein kinase pathways: Comradeship and hostility. **Cell Signal**, v. 20, p. 1592–1607. 2008.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. **Cell**, v.109, p.81–S96. 2002.

GIL, E.S.; CUNHA, L.C.; PAULA, J.R.; BEZERRA, J.C.B.; AGUIAR, F.A. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. **Vita et Sanitas**, v. 1, n. 1. 2007.

GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem Sci**, v. 32, n. 1, p. 37-43. 2007.

GONZALEZ, G.A.; MONTMINY, M.R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. **Cell**, v. 17, n. 59, p. 675-80.1989.

GOPING, I.S.; GROSS, A.; LAVOIE, J.N.; NGUYEN, M.; JEMMERSON, R.; ROTH, K.; et al., Regulated targeting of BAX to mitochondria. **J Cell Biol**, v.143, p.207–215.1998.

GRANDJEAN-LAQUERRIERE, A.; LE NAOUR, R.; GANGLOFF, S.C.; GUENOUNOU, M. Differential regulation of TNF-alpha, IL-6 and IL-10 in UVB-irradiated human keratinocytes via cyclic AMP/protein kinase A pathway. **Cytokine**, v.7, p.138–149. 2003.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, v.126, p. 131-138. 1982.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ZANONI, C.; CORREA, L.P.; JOTZ,G.P.; HENRIQUES, J.A.; SCHWARTSMANN, G.;DA ROCHA, A.B. Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines. **Int J Colorectal Dis.** v.22, n.10, p.1201-1208. 2007.

GROSS, E.; HAWKINS, K.; PUSHKIN, A.; SASSANI, P.; DUKKIPATI, R.; ABULADZE, N.; HOPFER, U.; KURTZ, I. Phosphorylation of Ser982 in the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 shifts the HCO₃: Na⁺stoichiometry from 3 : 1 to 2 : 1 in murine proximal tubule cells. **J Physiol**, v.537, n. 3, p.659–665. 2001.

GSTRAUNTHALER, G.; PFALLER, W.; KOTANKO, P. Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK). **Renal Physiol**, v. 248, n. 4, p.536-544.1985.

GUZIK, T.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. **J Physiol and Pharmacol**, v. 54, n.4, p.469-487. 2003.

HAN, S.Y.; CHANG, E.J.; CHOI, H.J. Apoptosis by cyclosporine in mesangial cells. **Transplant Proc**, v. 38, p. 2244–2246. 2006.

HANNEDOUCHE, T. et al. Effects of blood pressure and antihypertensive treatment on progression of advanced chronic renal failure. **Am J Kidney Dis.** 1993

HARMSSEN, S.; MCLAREN, A.C.; PAUKEN, C.; MCLEMORE, R. Amphotericin B Is Cytotoxic at Locally Delivered Concentrations. **Clin Orthop Relat R**, v. 469, n. 11, p.3016-3021. 2011.

HARRIS, R.C. Growth factors and cytokines in acute renal failure. *Adv Ren Replace Ther.* v. 4, n. 2, p.43-53. Review.1997.

HAUSER, I.A.; KOZIOLEK, M.; HOPFER, U.; THEVENOD, F. Therapeutic concentrations of cyclosporine A, but not FK506, increase P-glycoprotein expression in endothelial and renal tubule cells. **Kidney Int**, v.54, p. 1139–1149.1998.

HAUSER, I.A.; SCHAEFFELER, E.; GAUER, S.; SCHEUERMANN, E.H.; WEGNER, B.; GOSSMANN, J.; ACKERMANN, H.; SEIDL, C.; HOCHER, B.; ZANGER, U.M.; GEIGER, H.; EICHELBAUM, M.; SCHWAB, M. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. **J Am Soc Nephrol**, v.16, p.1501–1511.2005.

HEGARTY, J.N.; WATSON, R.W.G.; YOUNG, L.S.; O'NEILL, A.J.; BRADY, H.R.; FITZPATRICK, J.M. Cytoprotective effects of nitrates in a cellular model of hydronephrosis. **Kidney Int**, v. 62, p. 70–77. 2002.

HEINEMANN, V.; KAHNY, B.; JEHN, U.; MUHLBAYER, D.; DEBUS, A.; WACHHOLZ, K.; HENDRIKSEN, C.F. Refinement, reduction and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. **Institute of Laboratory Animal Resources**, v.43, p.43-48. 2002.

HOFFMANN, D.; FUCHS, T. C.; HENZLER, T.; MATHEIS, K.A.; HERGET, T.; DEKANT, W.; HEWITT, P.; MALLY, A. Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. **Toxicology**, v. 277, p.49–58. 2010.

HU, W.; RANAIVO, R. H.; ROY, S.M.; BEHANNA, H.A.; WING, L.K.; MUNOZ, L.; GUO, L.; VAN ELDIK, L.J.; WATTERSON, DM. Development of a novel therapeutic suppressor of brain pro-inflammatory cytokine up-regulation that attenuates synaptic dysfunction and behavioral deficits. **Bioorg Med Chem Lett**, v.17, p.414–418.2007.

HUMPHREYS, B.D.; VALERIUS, M.T.; KOBAYASHI, A.; MUGFORD, J.W.; SOEUNG, S. ET AL. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. **Cell Stem Cell**, v. 2, p. 284–291. 2008.

IMAN, M.; HUANG, Z.; SZOKA, J.R.; JAAFARI, M. R. Characterization of the colloidal properties, in vitro antifungal activity, antileishmanial activity and toxicity in mice of a distigmasterylhemisuccinoyl-glycero-phosphocholine liposome-intercalated amphotericin B. **Int J Phar**, v.408, n.1. p.163-172. 2011.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION – ISO. Biological evaluation of medical devices. Part 5. Test for cytotoxicity: in vitro methods. 10993-5. 2009.

ITOH, N., NAGATA, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. **J Biol Chem**, v. 268, p. 10932–10937. 1993.

JENNINGS, P.; AYDIN, S.; BENNETT, J.; MCBRIDE, R.; WEILAND, C.; TUIE, N.; GRUBER, L.N.; PERCO, P.; GAORA, P.O.; ELLINGER-ZIEGELBAUER, H.; AHR, H.J.; VAN KOOTEN, C.; DAHA, M.R.; PRIETO, P.; RYAN, M.P.; PFALLER, W.; MCMORROW, T. Inter-laboratory comparison of human renal proximal tubule (HK-2) transcriptome alterations due to Cyclosporine A exposure and medium exhaustion. **Toxicol in Vitro**, v. 23, p.486–499, 2009.

JEON, S.H.; PIAO, Y.J.; CHOI, K.J.; HONG, F.; BACK, H.W.; KANG, I.; HA, J.; KIM, S.S.; CHANG, S.G. Prednisolone suppresses cyclosporine A induced apoptosis but not cell cycle arrest in MDCK cells. **Arch Biochem Biophys**, v.435, n.2, p.382-392. 2005.

JIANG, T.; ACOSTA, D. An in vitro model of cyclosporine-induced nephrotoxicity. **Fundam Appl Toxicol**, v. 20, n.4, p.486-95.1993.

JUNG, S.H.; LIM, D.H.; LEE, J.E.; JEONG, K.S.; SEONG, H.; SHIN, B.C. Amphotericin B entrapping lipid nanoparticles and their in vitro and in vivo characteristics. **Eur J Pharm Sci**, v.37, p. 313-320. 2009.

JUSTO, P.; LORZ, C.; SANZ, A.; EGIDO, J.; ORTIZ, A. Intracellular mechanisms of cyclosporin A-induced tubular cell apoptosis. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. 3072–3080.2003.

KAHAN, B.D. Cyclosporine. **N Engl J Med.**, v. 321, n. 25, p. 1725-38. 1989.

KATSURA, T.; GUSTAFSON, C.E.; AUSIELLO, D.A.; BROWN, D. Protein kinase A phosphorylation is involved in regulated exocytosis of aquaporin-2 in transfected LLC-PK1 cells. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.272, n. 6, p816-822.1997.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-257. 1972.

KIRIYAMA, Y.; MURAYAMA, T.; TOKUMITSU, Y.; NOMURA, Y. Protein kinase A dependent IL-6 production induced by calcitonin in human glioblastoma A172 cells. **J Neuroimmunol**, v.76, p.139–144.1997.

KISHIMOTO T. The biology of interleukin-6. **Blood**, 1–10.1989.

KÖHLER, K.; LOUVARD, D.; ZAHRAOUI, A. Rab13 regulates PKA signaling during tight junction assembly. **J Cell Biol**, v. 165, n. 2, p. 175-180. 2004.

KONINCKX , R.; DANIELS, A.; WINDMOLDERS, S.; CARLOTTI, F.; MEES, U.; STEELS, P.; RUMMENS, J.; HENDRIKX, M.; HENSEN, K. Mesenchymal stem cells or cardiac progenitors for cardiac repair? A comparative study. **Cell Mol Life Sci**, v.68, p. 2141–2156.2011.

KONOPKA, K.; PRETZER, E.; FELGNER, P.L.; DUZQUNES, N. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection increases the sensitivity of macrophages and THP-1 cells to cytotoxicity by cationic liposomes. **Biochim Biophys Acta**, v.1312, n.3, p.186-196. 1996.

KOPPERUD, R.; KRAKSTAD, C.; SELHEIM, F.; DOSKELAND,S.O. cAMP effector mechanisms. Novel twists for an 'old' signaling system. **FEBS Letters**, v.546, n.1, p. 121-126, july, 2003.

KOVARIK, J.M., HOYER, P.F., ETTENGER, R., PUNCH, J., SOERTEL, M. Cyclosporine absorption profiles in pediatric kidney and liver transplant patients. **Pediatr Nephrol**, v.18, p. 1275–1279. 2003.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Adaptação, dano e morte celular. In: Bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. Cap. 1, p. 3-48. 2005.

LAHERA, V.; SALOM, M. G.; MIRANDA-GUARDIOLA, F.; MONCADA, S. ;RoMERO, J. C. Effects of N0-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. **Am Journal Physiol**, v. 261, p.1033-1037.1991.

LALLY, C.; HEALY, E.; RYAN, M.P. Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. **Kidney Int**, v. 56, p. 1254–1257, 1999.

LANE, J. D.; LUCOCQ, J.; PRYDE, J.; BARR, F. A.; WOODMAN, P. G.; ALLAN, V. J. ; LOWE, M. Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. **J Cell Biol**, v. 156, n. 3, p. 495-509. 2002.

LANOTTE, M.; MARTIN-THOUVENIN, V.; NAJMAN, S.; BALERINI, P.; VALENSI, F.; BERGER, R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). **Blood**, v.77: p.1080-1086.1991.

LECOEUR, H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. **Exp Cell Res**, v. 277, n. 1, p. 1-14. 2002.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Appl Microbiol Biot**, v.68, n.2, p.151-162. 2005.

LEON, C.; TAYLOR, R.; BARTLETT, K.H.; WASAN, K.M. Effect of heat-treatment and the role of Endoplasmic Reticulum Stress in the Rat Kidneys. **Toxicol Sci**, v. 99, n.1, p. 346–353. 2007.

LILJEROOS, M.; VUOLTEENAHO, R. Bacterial ligand of TLR2 signals Stat activation via induction of IRF1/2 and interferon-alpha production. **Cell Signal**, v. 20, n.10, p.1873-81. 2008.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; CARMONA-RIBEIRO, A.M. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 5, p. 727-734. 2005.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J Neurochem**, v. 69, p. 581-593.1997.

LIU, X.; WALL, Q.; TAYLOR, L.; CURTHOYS, N.P. C/EBP β contributes to cAMP-activated transcription of phosphoenolpyruvate carboxykinase in LLC-PK1-F1 cells. **Am J Physiol-Renal**, v. 281, n. 4, p.649-57.2001.

MARIAPPAN, N.; SOORAPPAN, R.N.; HAQUE, M.; SRIRAMULA, S.; FRANCIS, J. TNF-alpha-induced mitochondrial oxidative stress and cardiac dysfunction: restoration by superoxide dismutase mimetic Tempol. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 5, p. 2726-37. 2007.

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, p. 1–113, 2006.

McCONKEY, J.D.; ORRENIUS, S. Signal transduction pathways in apoptosis. **Stem Cells**, v.14, n.6, p.619-631. 1996.

MCNEILL-BLUE, C.; WETMORE, B. A.; SANCHEZ, J. F.; FREED, W. J. ; MERRICK, B. A. Apoptosis mediated by p53 in rat neural AF5 cells following treatment with hydrogen peroxide and staurosporine. **Brain Res**, v. 1112, n. 1, p. 1-15. 2006.

MELO, Patrícia da Silva. Derivados da desidrocrotonina: síntese, atividade antiulcerogênica e citotoxicidade. 116 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

MELO, Patrícia da Silva. Pigmentos obtidos *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*, propriedade tripanocida da prodigiosina e estudos

toxicológicos. 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

MIKALSEN, T.; GERITS, N.; MOENS, U. **Biotechnol. Annu**, v.12, p.153. 2006.

MILLER,R.P.; TADAGAVADI, R.K.; REEVES, W.B. Mechanisms of Cisplatin Nephrotoxicity. **Toxins**, v. 2, n. 11, p. 2490-2518. 2010.

MOLINARI, B.L.; TASAT, D.R.; PALMIERI, M.A.; CABRINI, R.L. Kinetics of MTT-formazan exocytosis in phagocytic and non-phagocytic cells. **Micron**, v.36, p. 177-83. 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol Methods**, v.6, n.5, p.55-63. 1983.

MUKHERJEE, A.K.; GUPTA, G.; BHATTACHARJEE, S.; GUHA, S.K.; MAJUMDER, S.; ADHIKARI, A.; BHATTACHRYA, P.; MAJUMDAR, S.B.; MAJUMDAR, S. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. **J Infect.** v.6, n.2, p.173-84. 2010.

MYKLEBUST, J. H.; JOSEFSEN, D.; BLOMHOFF, H. F.; LEVY, F. O.; NADERI, S.; REED, J. C.; SMELAND, E. B. Activation of the cAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1. **J Cell Physiol**, v.180, p. 71–80.1999.

NABEL, G.J. Genetics, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. **Nat Med**, v.10, n.2, p.135-141, 2004.

NASCIMENTO, C.R.; BRAGA, F.; CAPELLA L. S.; SANTOS, O.R.; LOPES, A.G.; CAPELLA, M.A. Comparative study on the effects of cyclosporin an in renal cells in culture. **Nephron Exp Nephrol**, v.99, n.3, p.77-86. 2005.

NICHOLSON, D. W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 11, p. 1028-1042. 1999.

NICOLETTI, I.; MIGLIORATI, G.; PAGLIACCI, M.C.; GRIGNANI, F.; RICCARDI ,C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v.139, p. 271–9.1991.

NIELSEN, R.; BIRN, H.; MOESTRUP, S.K.; NIELSEN, M.; VERROUST, P.; CHRISTENSEN, E. I. Characterization of Kidney Proximal Tubule Cell Line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. **J Am Soc Nephrol**, v.9, p.1767-1776. 1998.

NOGUEIRA-MACHADO, J.A., et al., Modulation of the production of reactive oxygen species (ROS) by cAMP-elevating agents in granulocytes from diabetic

patients: an Akt/PKB-dependent phenomenon. **Diabetes Metab**, v.32, n.4, p. 331-5. 2006.

OANCEA, M.; MAZUMDER, S.; CROSBY, M.E. et al. Apoptosis assays. **Methods Mol Med**, v.129, p. 279–290. 2006.

OECD.Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. Number 129. 2010.

OGA, S., CAMARGO, M.M.A., BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3º Edição. 2008. Atheneu Editora, São Paulo.

ORTIZ, A.; LORZ, C.; JUSTO, P.; CATALAN, M.P.; EGIDO, J. Contribution of apoptotic cell death to renal injury. **J Cell Mol Med**, v. 5, p.18–32. 2001.

PADANILAM, B.J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.284, p. 608-627. 2003.

PAN, L.; BLACK, T.A.; SHI, Q.; JONES, C.A.; PETROVIC, N.; LOUDON, J.; KANE, C.; SIGMUND, C.D.; GROSS, K.W. Critical Roles of a Cyclic AMP Responsive Element and an E-box in Regulation of Mouse Renin Gene Expression. **J Biol Chem**, v. 276, p.45530-45538. 2001.

PARK, KH. Trimetazidine effects on restoring endothelial function. **Heart & Metabolism**, v. 59, p. 25–28.2013.

PARK, R.; BAINES, J. D. Herpes Simplex Virus Type 1 Infection Induces Activation and Recruitment of Protein Kinase C to the Nuclear Membrane and Increased Phosphorylation of Lamin B. **J Virol**, v. 80, n. 1, p. 494-504. 2006.

PEROPADRE, A.; FERNÁNDEZ FREIRE, P.; HERRERO, O.; PÉREZ MARTÍN, J.M.; HAZEN, M.J. Cellular responses associated with dibucaine-induced phospholipidosis. **Chem Res Toxicol**, v. 18, p. 185-92. 2011.

PEYROU, M.; HANNA, P.E.; CRIBB, A.E. Cisplatin, Gentamicin, and p-Aminophenol Induce Markers of phospholipases on Fungizone®-induced cytotoxicity within human kidney proximal tubular (HK-2) cells and *Aspergillus fumigatus*. **Int J Pharm**, v. 298, p. 211–218. 2005.

PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Nephrotoxicity testing in vitro-what we know and what we need to know. **Environ Health Persp**, v.106, n. 2, p. 559-569, 1998.

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. 378-84. 2004.

RAMAKRISHNAN, G.; LO MUZIO, L.; ELINOS-BAEZ, C. M.; JAGAN, S.; AUGUSTINE, T. A.; KAMARAJ, S.; ANANDAKUMAR, P. ; DEVAKI, T. Silymarin inhibited proliferation and induced apoptosis in hepatic cancer cells. **Cell Prolif**, v. 42, n. 2, p.229-240. 2009.

RAMSEYER, V.D.; GARVIN, J.L. Tumor necrosis factor- α : regulation of renal function and blood pressure. **Am J Physiol Renal Physiol**. v. 304, n. 10, p. 1231-42. 2013.

RAO, M.; WONG, C.; KANETSKY, P.; GIRNDT, M.; STENVINKEL, P.; REILLY, M.; et al. Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases. **Kidney Int** , v.72, p. 549-56.2007.

RAYCHOWDHURY, M. K.; IBARRALL, C.; DAMIANO, A.; JACKSON JR G.R.; SMITH, P.R.; MARGARET MCLAUGHLIN, M.; , PRAT, A.G.; , AUSIELLO, D.A.; , LADER, A.S.; CANTIELLO, H.F. Characterization of Na⁺-permeable Cation Channels in LLC-PK1 Renal Epithelial Cells. **J Biol Chem**, v. 279, p. 20137-20146. 2004.

RAZONABLE RR, HENAULT M, LEE LN, LAETHEM C, JOHNSTON PA, WATSON HL, PAYA CV. Secretion of proinflammatory cytokines and chemokines during amphotericin B exposure is mediated by coactivation of toll-like receptors 1 and 2. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 4, 1617-21. 2005.

REZZANI, R.; ANGOSCINI, P.; BORSANI, E.; RODELLA, L.; BIANCHI, R. Cyclosporine A-induced toxicity in two renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK). **Histochemical J**, v. 34, n.1-2, p.27-33. 2002.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc**, v. 1, n.3, p.1458-61. 2006.

ROBERTSON, A. M.; BIRD, C. C.; WADDELL, A. W. ; CURRIE, A. R. Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. **J Pathol**, v. 126, n. 3, p. 181-187. 1978.

RODRIGUEZ-ENRIQUEZ, S.; HE, L.; LEMASTERS, J.J. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, v.36, n.12, p.2463-72. 2004.

ROMERO, J.C.; LAHEJA, V.; SALOM, M.G.; BIONDI, M.L. Role of the endothelium-dependent relaxing factor nitric oxide on renal function. **J Am Soc Nephrol**, v. 2, p. 1371:1387.1992.

SAITO, Y.; OKAMURA, M.; NAKAJIMA, S.; HAYAKAWA, K.; HUANG, T.; YAO, J.; KITAMURA, M. Suppression of nephrin expression by TNF- α via

interfering with the cAMP-retinoic acid receptor pathway. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 298, n. 6, p.1436-44. 2010.

SÁNCHEZ-POZOS, K.; LEE-MONTIEL, F.; PÉREZ-VILLALVA, R.; URIBE, N.; GAMBA, G.; BAZAN-PERKINS, B.; BOBADILLA, N. A. Polymerized type I collagen reduces chronic cyclosporine nephrotoxicity. **Nephrol Dial Transpl**, v.25, n.7, p. 2150-2158. 2010.

SANGALLI-LEITE, F.; SCORZONI, L.; MESA-ARANGO, A. C.; CASAS, C.; HERRERO, E.; SOARES MENDES GIANINNI, M. J., ZARAGOZA, O. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes Infect**, v.13, n.5, p.457-467. 2011.

SAVILL, J.; FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 784-788. 2000.

SCHOIER, J.; OLLINGER, K.; KVARNSTROM, M.; SODERLUND, G. ; KIHLLSTROM, E. Chlamydia trachomatis-induced apoptosis occurs in uninfected McCoy cells late in the developmental cycle and is regulated by the intracellular redox state. **Microb Pathog**, v. 31, n. 4, p. 173-184. 2001.

SERVAIS, H.; VAN DER SMISSEN, P.; THIRION, G.; VAN DER ESSEN, G.; VAN BAMBEKE, F.; TULKENS, P. M.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK₁ cells: involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicol Appl Pharm**, v. 206, p. 321-333, 2006.

SHAHBAZI, F.; DASHTI-KHAVIDAKI, S.; KHALILI, H.; LESSAN-PEZESHKI, M. Potential renoprotective effects of silymarin against nephrotoxic drugs: A review of literature. **J Pharm Pharmacol**, v.1, p.112–123. 2012.

SHIHAB, F.S.; YI, H.; BENNETT, W.M.; ANDOH, T.F. Effect of nitric oxide modulation on TGF-beta1 and matrix proteins in chronic cyclosporine nephrotoxicity. **Kidney Int**. v. 58, n. 3, p. 1174-85. 2000.

SHIN, H.J.; LEE, C.H.; PARK, S.J.; SHIN, J.G.; SONG, I.S. 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. 2010.

SILVA, B.V.; HORTA, B.A.C.; ALENCASTRO, R.B.; PINTO, A.C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quim Nova**, Vol. 32, No. 2, p. 453-462. 2009.

SKALHEGG, B.T.K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation and subcellular localization of subunits of PKA. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 331-342. 1997.

SHRIKANT, A.S; LALIT, D.K.; UDAY, S.A; REKHA, S.S. Cyclosporin A – a review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. **Biotechnol Adv**, v.29, n.4. 2011.

SOVCIKOVA, A.; TULINSKA, J.; KUBOVA, J.; LSKOVA, A.; SYROVA, D.; HORAKOVA, K. Effect of cyclosporin A in Lewis rats in vivo and HeLa cells in vitro. **J Appl Toxicol**.v. 22, n. 3, p.153-60.2002.

SPIELMANN, H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M.; SEILER, A.; VOGEL, R. 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. 225-233. 2008.

STAR, R.A. Intrarenal localization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase. **Clin Exp Pharmacol P**, v. 24, n. 8, p. 607-610. 1997.

Stein, B.; Sutherland, M.S.K. IL-6 as a drug discovery target. **Drug Discov Today**, v.3, p. 202–213.1998.

TAN, K. S.; NACKLEY, A.G.; SATTERFIELD, K.; MAIXNER, W.; DIATCHENKO, L.; FLOOD, P.M. β 2 adrenergic receptor activation stimulates pro-inflammatory cytokine production in macrophages via PKA- and NF- κ B-independent mechanisms. **Cell Signal**, v.19, p.251–260.2007.

TARZE, A.; DENIAUD, A.; BRAS, L.M.; et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. **Oncogene**, v. 26, p.2606–2620. 2007.

TASKEN, L.; AANDAHL, E. M. Localized Effects of cAMP Mediated by Distinct Routes of Protein Kinase A. **Physiol Rev**, v. 84, p. 137–167. 2004.

TERMAN, A.; GUSTAFSSON, B.; BRUNK, U.T. The lysosomal-mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death. *Chem Biol Interact*, v. 27, n.163(1-2), p. 29-37.2006.

TOKALOV, S. V.; PIECK, S. ; GUTZEIT, H. O. Varying responses of human cells with discrepant p53 activity to ionizing radiation and heat shock exposure. **Cell Prolif**, v. 40, n. 1, p. 24-37. 2007.

VAN DE WATER, B.; GRAAUW, M.; LE D'EV'EDEC, S.; ALDERLIESTEN. M. Cellular stress responses and molecular mechanisms of nephrotoxicity. **Toxicol Lett**, v. 162, p. 83–93. 2006.

VAN DER HARST, M.R.; BULL, S.; LAFFONT, C. M.; KLEIN, W.R. Gentamicin nephrotoxicity – a comparison of in vitro findings with in vivo experiments in equines. **Vet Res Commun**, v.29, n.3, p.247-261. 2005.

VARLAM, D.E.; SIDDIQ, M. M.; PARTON, L.A.; RUSSMANN, H. Apoptosis Contributes to Amphotericin B Induced Nephrotoxicity. **Antimicrobial Agents Chemother**, 679–685. 2001.

VERTUT-DOI, A.; OHNISHI, S.; BOLARD, J. The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic Amphotericin B. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.38, n.10, p.2373-2379.1994.

VIANNA, H.R.; SOARES, C.M.B.M.; TAVARES, M.S.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA, A.C.S. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **J. Bras. Nefrol**, v.33, n.3, p.351-364.2011.

VINCIGUERRA, M.; DESCHENES,G.; HASLER, U.; MORDASINI, D.; ROUSSELOT, M.; DOUCET, A.; VANDEWALLE, A.; MARTIN,P.; FERAILLE, E. Intracellular Na Controls Cell Surface Expression of Na,K-ATPase via a cAMP-independent PKA Pathway in Mammalian Kidney Collecting Duct Cells. **Mol Biol Cell**, v. 14, p.2677–2688. 2003.

VINTERMYR, O. K.; GJERTSEN, B. T.; LANOTTE, M.; DOSKELAND, S. O. Microinjected catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase induces apoptosis in myeloid leukemia (IPC-81) cells. **Exp Cell Res**, v.206, p.157–161.1993.

WALKER, R.J., ENDRE, Z.H. Cellular Mechanisms of Drug Nephrotoxicity. **The Kidney**, chapter 87, 2507-2535. 2008.

WANG, P.; ZHU, F.; KONSTANTOPOULOS, K. Interleukin-6 Synthesis in Human Chondrocytes Is Regulated via the Antagonistic Actions of Prostaglandin (PG)E2 and 15-deoxy-D12,14-PGJ2. **PLoSone**, v.6, n.11. 2011.

WASAN, K.M. Modifications in plasma lipoprotein concentration and lipid composition regulate the biological activity of hydrophobic drugs. **J Pharmacol Toxicol**, v.36, n.1, p. 1-11, sept.1996.

WEIL, B.R.; MANUKYAN, M.C.; HERRMANN, J.L.; WANG, Y.; ABARBANELL, A.M.; POYNTER, J.A.; MELDRUM, D.R. Mesenchymal stem cells attenuate myocardial functional depression and reduce systemic and myocardial inflammation during endotoxemia. **Surgery**, v. 148, n. 2, p. 444-52. 2010.

WEN, A.Y.; SAKAMOTO, K.M.; MILLER, L.S. The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function. **J Immunol**, v. 185, n. 11, p.6413-6419. 2010.

WILMES, A.; CREAN, D.; AYDIN, S.; PFALLER,W.; JENNINGS, P.; LEONARD, M.O. Identification and dissection of the Nrf2 mediated oxidative stress pathway in human renal proximal tubule toxicity. **Toxicol in Vitro**, v. 25, p. 613–622. 2011.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. ; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v. 68, n., p. 251-306. 1980.

YANO, T.; ITOHM Y.; KAWAMURA,E.; MAEDA, A.; EGASHIRA,N.; NISHIDA, M.; KUROSE, H.; OISHI, R. 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. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 53, n. 4, p.1420–1426. 2009.

YOON, H.E.; YANG, C.W. Established and newly proposed mechanisms of chronic cyclosporine nephropathy. **Korean J Intern Med**, v.24, n. 2, p. 81-92. 2009.

YUAN, Z.X.; LI, J.J.; ZHU, D.; SUN, X.; GONG, T.; ZHANG, Z.R. Enhanced accumulation of low-molecular-weight chitosan in kidneys: a study on the influence of N-acetylation of chitosan on the renal targeting. **J Drug Target**, v.19, n. 7, p. 540-51. 2011.

YVAN-CHARVET, L.; MASSIÉRA, F.; LAMANDÉ, N.; AILHAUD, G.; TEBOUL, M.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; GASC, J.M.; QUIGNARD-BOULANGÉ, A. Deficiency of angiotensin type 2 receptor rescues obesity but not hypertension induced by overexpression of angiotensinogen in adipose tissue. **Endocrinology**, v.150, n. 3, p. 1421-8. 2009.

ZANINI, M.; LACAZ, E.; NEVES, S.R.C.; PASCHOAL, H.C. Clinical use of Cyclosporine in Dermatology. **An Bras Dermatol**, v. 76, n. 4, p.361-378, jul/ago. 2001.

ZHANG, C.; LI, X.; HAO, H.; YU, W.; HE, Z.; et al. The correlation between size of renal cell carcinoma and its histopathological characteristics: a single center study of 1867 renal cell carcinoma cases. **BJU Int**, v.110, n. 11b, p.481-485. 2012.

ZENG, H.; LI, X.; YAO, J.; ZHU, Y.; LIU, J.; YANG, Y.; QIANG, W. Multifocal brain metastases in clear cell renal cell carcinoma with complete response to sunitinib. **Urol Int**, v.83, n.4, p.482-5. 2009.

ZHANG, R.; KANG, K. A.; PIAO, M. J.; KO, D. O.; WANG, Z. H.; LEE, I. K.; KIM, B. J.; JEONG, I. Y.; SHIN, T.; PARK, J. W.; LEE, N. H.; HYUN, J. W. Eckol protects V79-4 lung fibroblast cells against gamma-ray radiation-induced apoptosis via the scavenging of reactive oxygen species and inhibiting of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway. **Eur J Pharmacol**, v. 591, n. 1-3, p. 114-123. 2008.

ZHAO, M.; ANTUNES, F.; EATON, J.W.; BRUNK, U.T. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. **Eur J Biochem**, v. 270, n.18, p. 3778-3786. 2003.

ZHU, S., WANG, Y., CHEN, M., JIN, J., QIU, Y., HUANG, M., HUANG, Z. Protective effect of schisandrin B against cyclosporine A-induced nephrotoxicity in vitro and in vivo. **Am J Chin Med**, v. 40, n. 3, p. 551-66. 2012.

ANEXO – Artigos científicos decorrentes deste trabalho