

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO BIOFARMACÊUTICA

SARAH CRISTINA TEIXEIRA SILVA

**Estudo *in vitro* de potenciais biomarcadores de
nefrotoxicidade por expressão gênica diferencial
usando gentamicina**

Belo Horizonte

2014

SARAH CRISTINA TEIXEIRA SILVA

Estudo *in vitro* de potenciais biomarcadores de nefrotoxicidade por expressão gênica diferencial usando gentamicina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Inovação Biofarmacêutica.

Área de concentração: Ensaio Pré-Clínicos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Anete Maria Santana Valente.

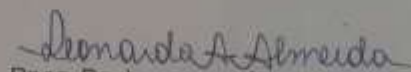
Belo Horizonte

2014

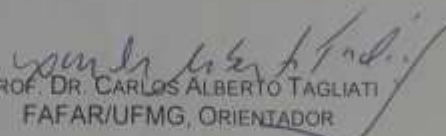
**"ESTUDO IN VITRO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE
NEFROTOXICIDADE POR EXPRESSÃO GÊNICA USANDO
GENTAMICINA"**

SARAH CRISTINA TEIXEIRA SILVA

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia 21 de novembro de 2014, pela
Banca Examinadora constituída pelos seguintes membros:


PROF. DR. LEONARDO AUGUSTO DE ALMEIDA
UNIFAL


PROF. DR. VASCO ARISTON DE CARVALHO AZEVEDO
ICB/UFMG


PROF. DR. CARLOS ALBERTO TAGLIATI
FAFAR/UFMG, ORIENTADOR

Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 21 de novembro de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Toxicologia *in vitro*, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Dr. Carlos Alberto Tagliati e co-orientação da Dra. Anete Maria Santana Valente.

Apoio Financeiro:

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

Colaborador:

- Dr. Leonardo Augusto de Almeida

Agradeço,

À Deus, por me tornar capaz e iluminar meu caminho.

À minha mãe por ser meu exemplo de força e perseverança e por me incentivar sempre.

À minha irmã Deborah pelo auxílio e toda minha família pelo apoio.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Alberto Tagliati por toda confiança, ensinamentos e profissionalismo. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Dra. Maria Anete Santana Valete pelo acompanhamento.

Ao Dr. Leonardo Augusto de Almeida pela imensa colaboração e dedicação ao trabalho.

Às colegas de mestrado, Stellamaris e Marina que pela agradável companhia tornaram mais suaves os momentos difíceis.

Às colegas do laboratório de Toxicologia *in vitro*: Fernanda, Isabelle, Mariana, Anacláudia e Augusta.

Ao CNPq, INCT-INOVAR, CAPES e FAPEMIG pelo apoio concedido.

À Universidade Federal de Minas Gerais, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica pela oportunidade.

RESUMO

A nefrotoxicidade induzida por drogas é um dos efeitos mais frequentemente observados em farmacoterapias a longo prazo e na fase pre-clínica de desenvolvimento de drogas. O desenvolvimento de moléculas bioativas mais específicas para uso terapêutico tem sido dificultado devido à incidência de reações adversas. Os efeitos da nefrotoxicidade são tardiamente descobertos devido à falta de sensibilidade dos métodos *in vivo* para avaliação desse efeito. Por esse motivo, tem-se buscado o desenvolvimento de métodos alternativos *in vitro* para a identificação precoce de toxicidade. A identificação de alterações genéticas induzidas por drogas é de essencial importância para a elucidação de mecanismos moleculares e detecção de dano renal. A gentamicina, por exemplo, é um antibiótico aminoglicosídico amplamente utilizado que provoca nefrotoxicidade. No presente estudo, células LLC-PK1 foram expostas por 24 h à concentrações de gentamicina de 4 (baixa), 8 (média) e 12 (alta) mM, de acordo com o teste MTT, para avaliação da expressão gênica diferencial. Uma pesquisa bibliográfica foi realizada para identificar genes associados ao desenvolvimento de nefrotoxicidade. Um grupo de genes foi selecionado baseado-se na alterações da expressão gênica em vários estudos de nefrotoxicidade. Devido à escassa base de estudo para o modelo celular em estudo, a busca pelas sequências de mRNAs codificadores das proteínas previamente associadas aos danos renais foi realizada nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI (USA). Os iniciadores foram obtidos utilizando o programa *Primer BLAST* (NCBI), baseado nas sequências dos transcritos escolhidos. O RNA total foi extraído das células, e RT-PCR foi usado para avaliar os perfis de expressão dos genes selecionados. Entre os genes analisados, quatro deles demonstraram ser diferencialmente induzidos em células expostas ao nefrotoxicante: HAVcr-1 (vírus da hepatite A receptor celular 1), CASP3 (caspase 3), ICAM-1 (molécula de adesão intracelular 1) e EXOC3 (complexo exocítico componente 3). De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que esses genes podem ser utilizados como precoces biomarcadores *in vitro* para a identificação de nefrotoxicidade. O estabelecimento de marcadores genômicos é uma ferramenta promissora na avaliação de nefrotoxicidade e serão úteis no desenvolvimento de drogas mais seguras.

ABSTRACT

Drug-induced nephrotoxicity is one of the most frequently observed effects in long-term pharmacotherapy and in the early preclinical phase of drug development. The development of more specific bioactive molecules for therapeutic use has been difficult due to the incidence of adverse reactions. The effects of nephrotoxicity are commonly discovered later due to lack of sensitivity of *in vivo* methods to evaluate this effect. Therefore, researchers have tried to develop *in vitro* alternative methods for early identification of toxicity. Identification of drug-induced gene changes is critical to provide insights into molecular mechanisms and to detecting renal damage. Gentamicin, for example, is a widely used aminoglycoside antibiotic that causes nephrotoxicity. In the present study, LLC-PK1 cells were exposed for 24 h to gentamicin concentrations of 4 (low), 8 (medium), and 12 (high) mM, according to MTT tests, to evaluate differential gene expression. A literature survey was conducted to identify genes associated with the development of nephrotoxicity. A panel of genes was selected based on genes expression changes in multiple published studies. Due to limited base of study for the cellular model in this work, the search for sequences of mRNAs encoding proteins that had been previously associated with kidney damage was researched in the databases of the National Center for Biotechnology Information - NCBI (USA). The primers were obtained using the Primer BLAST (NCBI) program, based on the sequences of selected transcripts. RNA was extracted from the cells, and RT-PCR was performed to evaluate expression profiles of the selected genes. Among the analyzed genes, four genes proved to be highly differential up-regulated in cells exposed to the nephrotoxin: HAVcr-1 (hepatitis A virus cellular receptor 1), CASP3 (caspase1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) and *EXOC3* (exocyst complex component 3). According to the obtained results, it can be suggested that these genes can be used as early *in vitro* biomarkers for the identification of nephrotoxicity. The establishment of genomic markers is a promising tool for evaluating nephrotoxicity and will be useful in the development of safer drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases de desenvolvimento de medicamento	17
Figura 2. Níveis de alteração da toxicidade de uma substância	20
Figura 3. Estrutura molecular da gentamicina	22
Figura 4. Nefrotoxicantes comuns: Local e mecanismo de lesão	24
Figura 5. Avaliação da metabolização de MTT	37
Figura 6. Avaliação da reversibilidade dos efeitos tóxicos pela metabolização de MTT	38
Figura 7. Avaliação da expressão gênica	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência dos iniciadores utilizados nos ensaio de PCR em tempo real	34
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg = Micrograma

μL = Microlitro

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BraCVAM = Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos

CASP3 = caspase 3

cDNA = ácido desoxirribonucléico complementar

CEUA = Comissão de Ética no Uso de Animais

Concea = Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DEPC = dietilpirocarbonato

DMSO = dimetilsulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucléico

ECVAM = *European Centre for the Validation of Alternative Methods*

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

EPA = *Environmental Protection Agency*

EXOC3 = *Exocyst complex component 3*

FDA = *Food and Drug Administration*

Fiocruz = Fundação Oswaldo Cruz

HAVcr-1 = *Hepatitis A virus cellular receptor 1*

ICAM-1 = *Intracellular adhesion molecule 1*

ICCVAM = *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative*

INCQS = Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

JaCVAM = *Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*

KCl = cloreto de potássio

KH_2PO_4 = fosfato monopotássico

KIM-1 = *Kidney injury molecule 1*

LLC-PK1 = *porcine kidney cell line*

MEM = meio mínimo essencial

MDCK = *Madin-Darby canine kidney*

mM = Milimolar

mRNA = ácido ribonucléico mensageiro

MTT = *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

N = Normal

Na_2HPO_4 = fosfato de sódio dibásico

NaCl = cloreto do sódio

NaOH = hidróxido de sódio

NCBI = *National Center for Biotechnology Information*

NCGC = *National Institute of Health Center Chemical Genomics*

NRC = *National Research Council*

NTP = *National Toxicology Program*

OECD = *Organization for Economic Cooperation and Development*

P&D = Pesquisa e Desenvolvimento

PBS = solução de salina tamponada sem cálcio e sem magnésio

rpm = Rotações por minuto

RT-PCR = reação em cadeia da polimerase em tempo real

SFB = soro fetal bovino

TBE = Toxicologia Baseada em Evidências

ZEBET = *National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Nefrotoxicidade e gentamicina	22
1.2. Perfil de expressão gênica / Toxicogenômica	25
2. OBJETIVO	27
2.1. Objetivo geral	27
2.1. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Reagentes	28
3.2. Soluções	28
3.3. Cultivo celular	30
3.4. Contagem celular utilizando azul de Trypan	31
3.5. Ensaio de viabilidade celular – MTT	31
3.5.1. <i>Reversibilidade</i>	32
3.6. Análise de expressão gênica por PCR em tempo real	33
3.6.1. <i>Extração de RNA</i>	33
3.6.2. <i>PCR em tempo real</i>	34
3.7. Análise estatística	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1. Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT	37
4.2 Avaliação da reversibilidade da toxicidade utilizando MTT	39
4.3 Efeito do tratamento na expressão gênica	40
5. CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO A – Artigo	57

1 INTRODUÇÃO

A toxicologia utiliza testes para avaliar a possibilidade de risco que um determinado composto químico possa provocar quando em contato com um organismo vivo. Tradicionalmente, são usados testes em animais para esse tipo de estudo toxicológico, tornando-o, assim, com um custo muito elevado tanto em termos de animais utilizados quanto ao tempo, trabalho e síntese de compostos; além de não apresentar adequada reprodutibilidade em humanos. Dessa forma, há a necessidade de uma melhora constante nas estratégias dos testes pré-clínicos de segurança (Chen *et al.*, 2012).

Os testes pré-clínicos (*in vitro* e em animais) e clínicos (seres humanos) devem ser obrigatoriamente realizados no desenvolvimento de um produto potencialmente terapêutico para avaliação dos parâmetros de segurança (Spindler *et al.*, 2000).

Para fins de regulamentação, os testes com animais seguem protocolos preestabelecidos por órgãos oficiais (ex.: *Food and Drug Administration* – FDA e *Organization for Economic Cooperation and Development* – OECD). Essas organizações internacionais determinam um acordo sobre as diretrizes para análise de produtos químicos nos blocos econômicos. No Brasil, o órgão responsável pela regulamentação dessas normas é a ANVISA, mas como um país observador da OECD, quando se vai estudar uma nova molécula, adota-se os métodos preconizados, também conhecidos como *guidelines*, pelos referidos órgãos (FDA, OECD, 2013).

Segundo a Declaração de Helsinque, um produto potencialmente terapêutico deve ser intensamente avaliado antes de ser submetido às pesquisas clínicas, exigindo-se assim, a realização dos testes pré-clínicos (Spindler *et al.*, 2000).

A observação dos efeitos adversos inerentes a determinado agente químico é feita pela avaliação da segurança, também conhecidos como testes de toxicidade. Para regulamentação de um novo produto, são normalmente requeridos os seguintes testes toxicológicos: toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, toxicocinética,

efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (Spielmann, 2002).

Entretanto, o dispendioso uso de animais neste tipo de estudo toxicológico tem levantado discussões mundiais. O caráter ético é questionado frente ao grande número de animais utilizados em estudo e ao sofrimento causado durante alguns tipos de experimento. Porém, o maior problema envolvido nesse processo é o baixo valor preditivo dos animais. A reavaliação da utilização de animais em experimentação fez com que as organizações internacionais objetivassem desenvolver e validar novos métodos alternativos como também regulamentar a implementação dos mesmos em diversos países (Cazarin *et al.*, 2004)

Para estabelecer procedimentos para o uso científico de animais, a Lei nº 11.794, publicada no dia 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), regulamenta a criação e a utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa científica em todo Brasil. Segundo essa lei, são atividades de pesquisa científica todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio. É permitido o uso de animais em experimentos que testam a segurança e eficácia de fármacos desenvolvidos para o tratamento de doenças. A Lei Arouca cria o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea), entidade credenciadora das instituições interessadas na criação e utilização de animais para fins científicos, formulando normas para o uso dos animais. As instituições e laboratórios devem se credenciar ao Concea além de terem seus protocolos de pesquisas aprovados por uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Mesmo com essa regulamentação, os movimentos de proteção animal sustentam que não se pode justificar eticamente o uso de animais vivos em experimentos dolorosos e letais. Favoráveis à abolição do uso do modelo animal para a pesquisa da cura das doenças humanas, em 2013 representantes desses movimentos invadiram a sede do laboratório do Instituto Royal, em São Roque (SP), acusando a empresa de maus-tratos a cães utilizados em pesquisas (Alves, 2013).

A comunidade científica atentou-se inicialmente à essas questões desde 1959, em que Russell e Burch publicaram o livro “Princípios da Técnica Experimental Humana”, em que descreveram o conceito de 3R’s (*Reduction, refinement and replacement* - Reduzir, refinar e substituir) com o objetivo de racionalizar o uso de animais em experimentação. Dessa forma, desde a década de 1980, esses princípios foram considerados essenciais na utilização de animais em pesquisas e influenciou a nova legislação para controlar o uso de animais em experimentação (Kroeger, 2006).

Para promover a implementação de alternativas aos testes de segurança em animais e passar pelo processo de validação e conseqüentemente ganhar aceitação das diferentes agências reguladoras, vários Estados estabeleceram centros para procedimentos de validação. Em 1989, na Alemanha, foi criado o ZEBET (*Zentralstelle zur Erfassung Bewertung von Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch – National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments*); em 1993, a comunidade europeia estabeleceu o ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*); em 1997, as agencias governamentais dos Estados Unidos formaram o ICCVAM (*Inter-agency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods*) e no Japão em 2005 foi criado o JaCVAM (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*) (Kroeger, 2006).

No Brasil, foi criado em 2011 o BraCVAM (Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos) a partir de um acordo de cooperação assinado entre o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). (ANVISA, 2011).

Em 2007, o *National Research Council* (NRC) publicou o relatório “*Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy*” para desenvolver uma visão a longo prazo para testes de toxicidade bem como traçar um plano estratégico para realizá-los. Essa abordagem para testes de toxicidade pedia uma demanda com menos estudos em animais e um foco maior em métodos *in vitro* para a avaliação de

risco que os produtos químicos podem oferecer aos sistemas biológicos. (Schmidt; 2009).

No ano seguinte à publicação do relatório, ocorreu uma parceria entre o *National Toxicology Program* (NTP), o *National Institute of Health Center Chemical Genomics* (NCGC) e o *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) para firmar o programa Tox21 com o objetivo de promover o avanço dos testes de toxicidade. O Tox21 propõe o mapeamento de um conjunto completo de vias bioquímicas envolvidas nas respostas biológicas. Dessa maneira, com a identificação do comprometimento das vias de toxicidade, pode-se inferir sobre o potencial de dano humano a partir de produtos químicos, ou seja, o efeito adverso ou doença que viria a afetar o organismo humano exposto a substâncias tóxicas (Collins *et al.*, 2008).

Tendo em vista que o desenvolvimento de métodos alternativos de otimização pré-clínica facilitam os estudos de eficácia e segurança, os mesmos se tornaram muito importantes no processo de seleção de drogas candidatas a desenvolvimento clínico (Hendriksen, 2002).

Existem várias vantagens em se utilizar modelos *in vitro* para prever a toxicidade *in vivo*. Nos modelos *in vitro* pode-se ter melhor controle sobre as condições experimentais permitindo, assim, que os resultados possam ser melhores reproduzidos e repetidos de forma simples e rápida. O material necessário e o espaço para experimentos *in vitro* são reduzidos e também é limitada a quantidade de resíduos tóxicos produzidos. É possível que se faça uma triagem a despeito da diversidade de compostos a serem testados, conduzindo a pesquisa de forma a otimizar tempo, recursos, bem como a redução do número de animais a serem utilizados no experimento (Ryan *et al.*, 2008).

No contexto de segurança de medicamentos, novas tecnologias e abordagens moleculares vêm sendo aplicadas. Os novos métodos moleculares, chamados tecnologias genômicas, tem a premissa de detectar alterações específicas teciduais com o aumento da sensibilidade (Kroeger, 2006).

A abordagem toxicogenômica, criada como um campo de investigação pré-clínica vem sendo amplamente aplicada na indústria farmacêutica para caracterizar

mecanismos de ação tóxica ou prever a toxicidade de um candidato a droga em desenvolvimento clínico (Burczynski, 2009). O envolvimento da genômica no início do processo de descoberta de drogas permite à toxicologia ser parte integrante a respeito das conclusões sobre a Relação Estrutura- Atividade (Ryan *et al.*, 2008).

As substâncias tóxicas provocam alterações do padrão característico da expressão gênica que é dependente do mecanismo de ação. Estes perfis de expressão gênica específicos e suas alterações podem ser usados como base para a toxicologia preditiva do mecanismo (Daston & Naciff, 2010).

Para se ter uma ideia da dificuldade no desenvolvimento de um medicamento, atualmente, cerca de 15 mil moléculas sintetizadas, apenas uma chega como medicamento ao mercado, sendo que o período de aprovação pode chegar a 20 anos e, de cada três produtos comercializados, somente um gera lucro (informações pessoais obtidas com um ex-pesquisador da Pfizer). Conseqüentemente, isso tem sobrecarregado significativamente o gasto público e privado com a compra desses medicamentos.

O lançamento de um novo medicamento no mercado é um processo lento e oneroso, pode levar de 10 a 15 anos com valores calculados em torno de 1 bilhão de dólares (PHRMA, 2011). Como esse processo é muito complexo, a indústria farmacêutica vem cada vez mais adotando o conceito de inovação aberta. O modelo de inovação aberta permite à empresa procurar, em universidades e centros de pesquisa, conhecimento que possa ser convertido em inovação. Dentro desse contexto, a transferência de tecnologia se torna um elemento essencial para o sucesso da inovação.

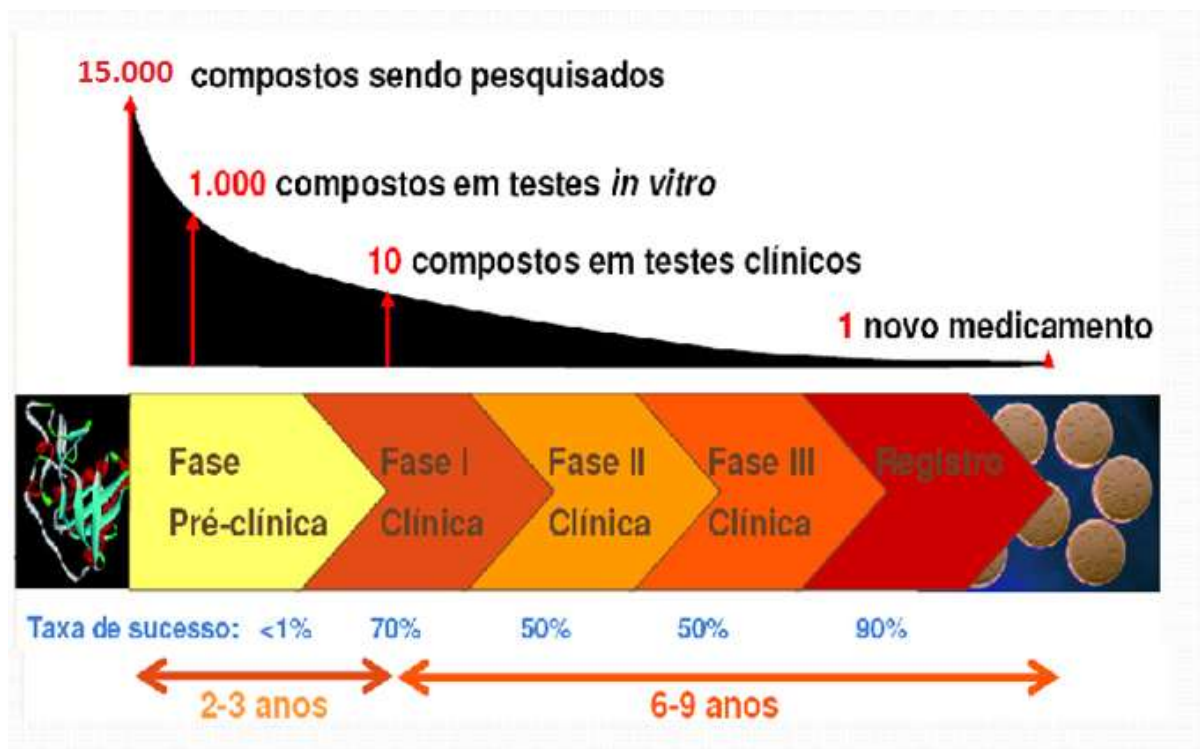


Figura 1: Fases de desenvolvimento de um medicamento.

A figura mostra as diversas fases para o desenvolvimento de um medicamento desde sua pesquisa, as fases compreendem a pesquisa pré-clínica, as fases da pesquisa clínica e finalmente o registro. Esse período tem duração de vários anos e entre cerca de 15 mil moléculas com potencial farmacêutico, apenas uma chega ao mercado.

Em um mercado cada vez mais competitivo, a inovação agrega valor aos produtos de uma empresa, conferindo a ela uma posição de vantagem em relação às demais. Para a indústria farmacêutica, a inovação possui um papel importante não só para a sustentabilidade da empresa, mas também para a saúde da sociedade. Processos inovadores na área farmacêutica podem gerar novos medicamentos, bem como aumentar a segurança dos já existentes (Takahasi & Sacomano, 2002).

Para que se possa reduzir o tempo gasto pela empresa para transformar esse conhecimento em inovação, o conhecimento acadêmico precisa ter qualidade nas publicações e mais patentes geradas. É preciso também que a indústria tenha habilidade para reconhecer o valor de um novo conhecimento, assimilá-lo e ser capaz de aplicá-lo para fins comerciais, processo esse chamado de capacidade de absorção, importante para garantir o sucesso da transferência de tecnologia. Nesse ponto, se faz diferencial para a empresa a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) com

profissionais qualificados (mestres e doutores) capazes de contribuir para o estoque de conhecimento da empresa. Na indústria farmacêutica, além de lhe conferir uma maior competitividade, a inovação também pode resultar em promoção de saúde (Takahasi, 2005).

O Brasil, apesar de não ser um dos melhores mercados na área de medicamentos, é considerado um “farmaemergente”, o que tem despertado grande interesse das *big pharma*. Tal fato tem sido comprovado com as recentes aquisições de farmacêuticas nacionais realizadas por multinacionais do setor. Dados de 2009 demonstram que o país responde por um mercado de US\$ 17 bilhões aproximadamente, e um crescimento comparado a 2008 de aproximadamente 13% no valor total gerado, enquanto os dados de 2005 representavam na época quase 50% do valor correspondente ao ano de 2009. Ou seja, em quatro anos o país quase dobrou o volume financeiro nas vendas de medicamentos (*IMS HEALTH*, 2010).

Estudo mais recente que analisou o cenário global e nacional do setor, estipulou-se que, apesar de ocupar, atualmente, o décimo lugar no mercado farmacêutico mundial, em 2015, onde a previsão é de um mercado nacional de R\$ 110 bilhões, o Brasil aparece na sexta colocação em relação ao consumo mundial, atrás somente das potências Estados Unidos, Japão, Alemanha, França e China. A referida projeção deve-se ao envelhecimento da população em nosso país e também ao aumento do poder aquisitivo do brasileiro (*IMS HEALTH*, 2010). Esse ano, a IMSHealth apontou China e Brasil como os maiores mercados farmacêuticos emergentes, sendo que o Brasil tem uma significativa melhor contribuição nas vendas globais de produtos de cuidado primário.

Na busca pela validação de novos processos que possam auxiliar na melhoria do valor preditivo, urgem, então, os biomarcadores, indicadores de dano celular utilizados na avaliação de compostos nas fases iniciais de desenvolvimento, e que melhoram a seleção de candidatos à fase clínica. Porém, no contexto atual, cuidados relacionados à interpretação de resultados são diferenciais. Assim, torna-se necessária e importante a busca por novos modelos de estudo (Eisenbrand et al., 2002; Descotes, 2003; Bernauer et al., 2005).

Uma nova abordagem para estudo da toxicologia é a chamada Toxicologia Baseada em Evidências (TBE). Este tipo de estudo procura aplicar as melhores evidências científicas para avaliar o desempenho das ferramentas de análises e os resultados gerados por essas ferramentas. As conclusões são avaliadas de forma a gerar decisões confiáveis sobre a segurança de um produto e seus potenciais riscos para o homem e o meio ambiente. A TBE inclui práticas já existentes em toxicologia como a validação de métodos e suas evoluções durante os últimos anos. Também são de grande utilidade as ferramentas da garantia da qualidade tais como Boas Práticas de Laboratório e Boas Práticas em Cultura de Células. Considerada como uma solução emergente, a TBE não se restringe somente à validação de métodos alternativos, mas também revisões sistemáticas e meta-análises terão maior aplicabilidade em toxicologia (Hartung, 2010).

A toxicidade de uma substância se expressa inicialmente provocando danos profundos ao nível celular nos seres vivos. O estudo de prováveis alterações geradas pela exposição das células a produtos terapêuticos pode ser primeiramente detectado em nível molecular, contribuindo para a compreensão das vias de toxicidade e precedendo informações de possíveis alterações histopatológicas e clínicas. Essas, por sua vez, permitem uma maior compreensão sobre o modo de ação da substância com a resposta individual. Por fim, podem-se observar as vias de efeitos adversos com exposição da população a essa nova droga. Esse esquema está representado na **Figura 2**. Dessa forma, aumentar o conhecimento sobre as perturbações biológicas a nível celular se faz essencial, visto que esses processos geralmente têm relação direta com os efeitos de toxicidade (Van der Water *et al.*, 2006).

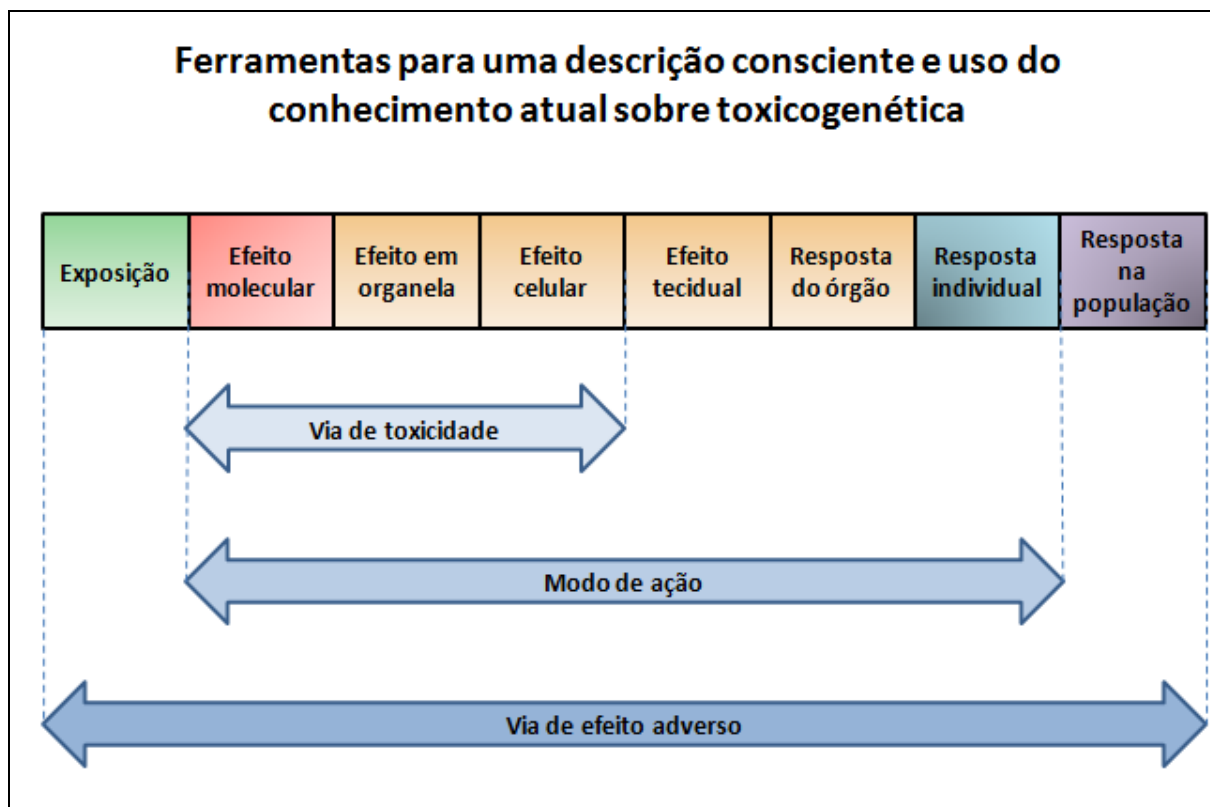


Figura 2: Níveis de alteração da toxicidade de uma substância.

Além disso, as informações sobre as vias que levam a efeitos tóxicos - o mecanismo molecular - podem ser obtidos a partir de perfis de expressão de genes e/ou proteínas e metabólitos padrão. Considerando que a instalação de uma patologia é antecedida por esses efeitos, o entendimento dos mesmos a níveis moleculares contribuem para a avaliação da toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kroeger, 2006).

Devido à crescente demanda por diferentes maneiras de refinar os estudos realizados em animais, as técnicas de cultura de células vêm se mostrando como uma importante ferramenta para estudos *in vitro* de nefrotoxicidade. Ocorreram melhorias nas metodologias para o cultivo de culturas homogêneas de células renais, o que permite a análise de fenômenos metabólicos de maneira uniforme. Essa estratégia experimental permitiu o acesso a linhagens específicas de porções diferentes ao longo do néfron, o que se torna difícil quando se utilizam células de cultivo primário (Blauboer *et al.*, 2012).

Usualmente, linhagens celulares são empregadas para estudos de nefrotoxicidade. As linhagens celulares renais, LLC-PK1 e MDCK, correspondentes a diferentes trechos do néfron, a unidade funcional do rim, já foram validadas internacionalmente. A linhagem celular LLC-PK1 (*porcine kidney cell line*) representa células de rim de porco que possui características do túbulo proximal. A linhagem proveniente de cão, *Madin-Darby canine kidney*, a MDCK, representa células dos túbulos distais.

1.1 Nefrotoxicidade e gentamicina

Um dos principais órgãos responsáveis pela manutenção da hemodinâmica do organismo são os rins, sendo responsáveis inclusive pela eliminação de xenobióticos. Devido serem altamente vascularizados, os rins estão expostos a quantidades muito mais elevadas de substâncias tóxicas do que outros órgãos. O fluxo de sangue elevado em comparação com o peso do órgão e a capacidade das células tubulares para concentrar toxinas dentro deles são dois fatores responsáveis pela vulnerabilidade do rim a um grande número de substâncias tóxicas. Considerando-se que os danos nos rins podem ser uma ameaça para todo o organismo, é evidente que os testes de nefrotoxicidade são um passo essencial para o desenvolvimento de novas drogas (L'Eplattenier *et al.*, 1990).

A nefrotoxicidade está entre um dos maiores efeitos tóxicos promovidos pelos produtos terapêuticos que acometem os pacientes, o que pode até mesmo levar ao abandono da terapia submetida. Dessa forma, deve-se considerar o risco/benefício na prescrição de uma droga nefrotóxica (Schetz *et al.*, 2005).

A toxicidade renal induzida por fármacos é uma reação adversa freqüente e com conseqüências graves para a saúde dos pacientes. De 100 fármacos usados nas unidades de terapia intensiva, 25 apresentam potencial nefrotóxico (Peyrou *et al.*, 2007). Das internações hospitalares devido a lesões renais agudas, 20% são decorrentes da nefrotoxicidade induzida por fármacos (Shahbazi *et al.*, 2012).

Na indústria farmacêutica, um dos órgãos mais avaliados durante as avaliações de segurança pré-clínica são os rins. 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).

Dentre os agentes terapêuticos que mais acometem o sistema renal, podemos citar a gentamicina, que apesar de sua comprovada eficácia para o tratamento de doenças infecciosas, esse fármaco tem como seu principal fator limitante a nefrotoxicidade.

A gentamicina é um antibiótico natural da classe dos aminoglicosídeos, que foi descoberta em 1963, produzido como um produto da bactéria da espécie *Micromonospora purpurea*. Este antibiótico tem um amplo espectro de ação, sendo comumente utilizado para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas (1967).

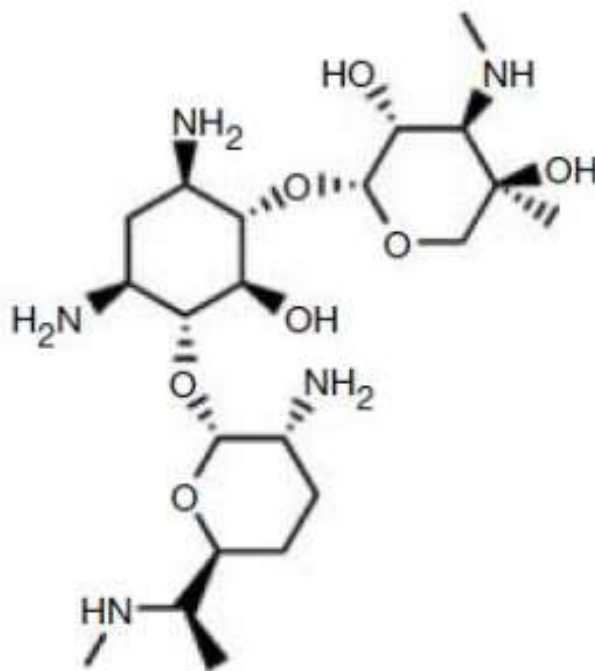


Figura 3: Estrutura molecular da gentamicina. (Maurice *et al*, 2008).

A gentamicina atua através da ligação à subunidade 30S do ribossoma bacteriano, impedindo a correta leitura do RNA mensageiro e consequente erro na síntese proteica da bactéria. A administração desse fármaco não ocorre tipicamente por via oral, devido à fraca absorção a partir do trato digestivo, é comumente administrado por vias intravenosa, intramuscular ou por via tópica para o tratamento de infecções bacterianas. As concentrações séricas de gentamicina devem ser cuidadosamente monitorizadas, pois seus efeitos ototóxicos e nefrotóxicos são bem conhecidos. Overdoses podem resultar em dano permanente ao equilíbrio e componentes de orientação do ouvido interno, bem como efeitos nefrotóxicos que podem resultar em insuficiência renal aguda (Grote *et al.*, 2012).

Em algumas situações, os efeitos secundários à nefrotoxicidade são tão graves que a utilização deste fármaco tem de ser interrompida. Estimou-se que até 30% dos pacientes em uso de gentamicina (80 mg/Kg) na rotina terapêutica por mais de 7 dias mostram alguns sinais de nefrotoxicidade (Manikandan *et al.*, 2011).

Os mecanismos moleculares relacionados à nefrotoxicidade de aminoglicosídeos ainda permanecem pouco conhecidos, sabe-se que causam insuficiência renal aguda em pacientes devido à associação com os sinais histológicos e funcionais de toxicidade nos túbulos contorcidos proximais. Os aminoglicosídeos entram nas células tubulares proximais por pinocitose no pólo luminal e se acumulam nos lisossomos onde provocam uma fosfolipidose notável. As alterações morfológicas provocadas pelo acúmulo de gentamicina nas células epiteliais do túbulo proximal é um evento observado tanto em humanos como em modelos experimentais, as alterações morfológicas são similares em ambos. É observado que os túbulos proximais de animais tratados com gentamicina mostram sinais evidentes de apoptose. O efeito apoptótico da gentamicina em conjunto com as alterações lisossomais podem ser reproduzidos *in vitro* com células renais e não renais. Um modelo aceito de células tubulares renais proximais para estudo de toxicidade com aminoglicosídeos são as células LLC-PK1 (Servais *et al.*, 2006).

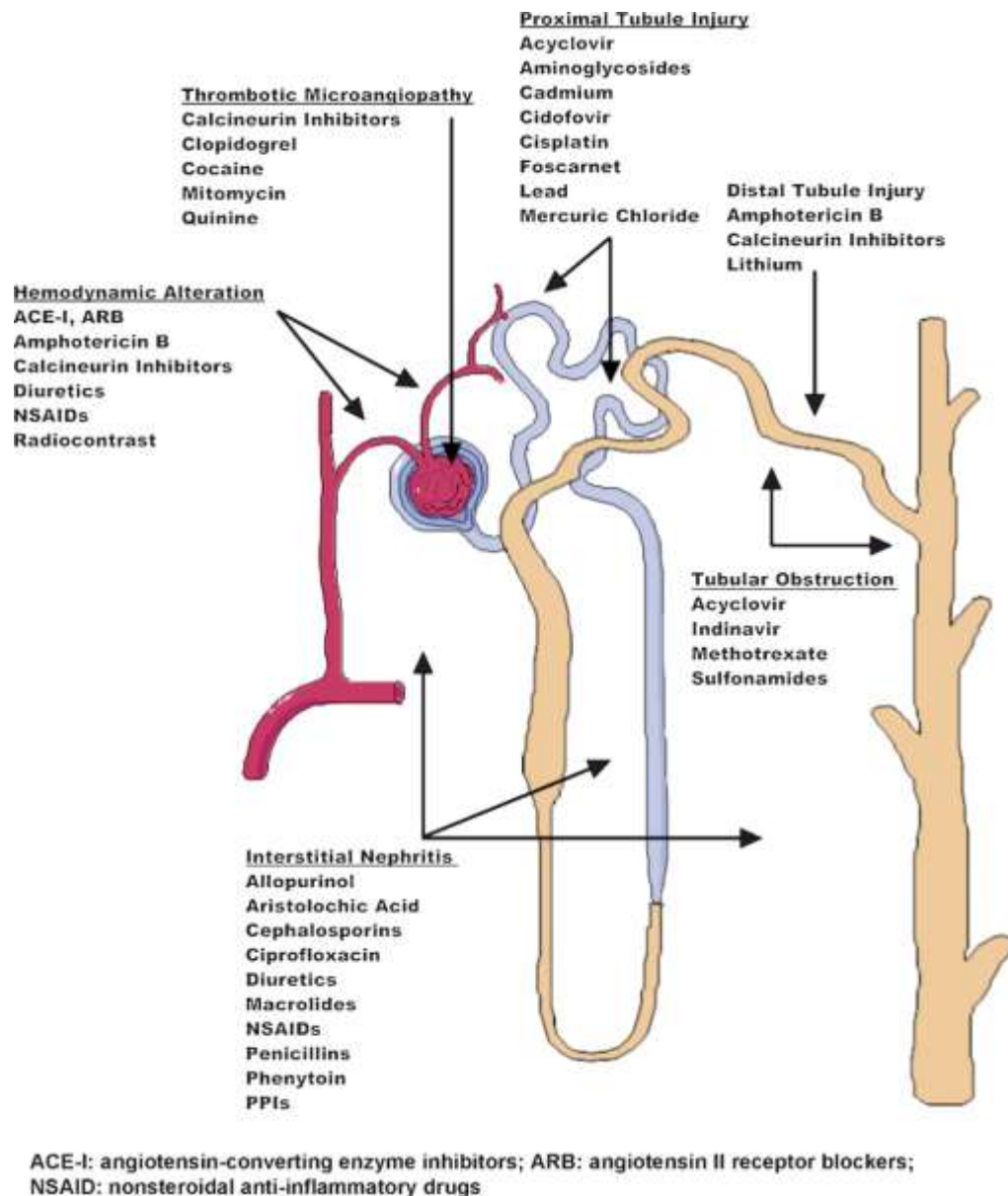


Figura 4: Nefrotóxicos comuns: Local e mecanismo de lesão.

A figura representa o néfron, a unidade funcional do rim. Em vermelho estão representados os vasos sanguíneos aferentes e eferentes que passam pelo glomérulo. Em azul a cápsula de Bowman seguida pelos túbulos proximais. Por último, em nude, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor. (Ferguson *et al.*, 2007)

1.2 Perfil de expressão gênica / Toxicogenômica

O perfil da expressão gênica de células ou animais expostos a drogas ou xenobióticos está se tornando uma análise padrão em toxicologia, e tem potencial para assumir um papel fundamental em todas as etapas da avaliação de segurança de medicamentos, incluindo estudos pré-clínicos e clínicos (Lord *et al.*, 2006).

A toxicogenômica baseia-se no fato de que os efeitos toxicológicos mais relevantes de um composto afetam diretamente ou indiretamente a expressão gênica. É uma tecnologia emergente que utiliza as modernas tecnologias genômicas para investigar efeitos adversos de novas moléculas (Fabian *et al.*, 2011).

A aplicação dessas tecnologias num projeto de triagem de médio rendimento exige trabalho e materiais dispendiosos em que a geração de dados é extenuante e baixo valor preditivo sobre os efeitos colaterais tóxicos. Dessa forma, faz-se necessário e possível identificar um número menor de genes, que podem servir como marcadores seletivos para rastreamento de marcadores toxicogenômicos precoces. Diversos estudos permanecem utilizando o RT-PCR como padrão ouro na determinação precisa de mudanças na expressão gênica (Wang *et al.*, 2008)

A identificação e avaliação de novos biomarcadores de toxicidade para órgãos-alvo tem sido uma das principais aplicações das tecnologias genômicas. A utilização de cDNA tem se tornado uma abordagem comum na literatura para a classificação de xenobióticos com base em seus perfis de expressão gênica. Esse método tem sido aplicado largamente na nefrotoxicidade induzida por drogas, principalmente em animais (Uehara *et al.*, 2013; Fabian *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008; Davis II *et al.*, 2004). Pouco, porém, se tem estudado a indução de nefrotoxicidade em modelos *in vitro*, mesmo diante da grande preocupação atual que visa diminuir o uso de animais em experimentação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica diferencial na nefrotoxicidade ocasionada pela gentamicina utilizando método alternativo *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito citotóxico da gentamicina nas linhagens celulares LLC-PK1 e MDCK;
- ✓ Analisar em células nefrotóxicas, a expressão de genes associados à nefrotoxicidade.
- ✓ Identificar possíveis biomarcadores de nefrotoxicidade

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

1. Azul de Trypan - Vetec
2. Bicarbonato de sódio - Vetec
3. Clorofórmio (P.A.) - Fmaia
4. Cloreto de sódio - Fmaia
5. Cloreto de potássio - Fmaia
6. Dimetilsulfóxido - Vetec
7. EDTA (dissódico. 2 H₂O) – Química Moderna
8. Etanol – Química moderna
9. Fosfato dissódico 7 H₂O - Isofar
10. Fosfato monopotássico - Vetec
11. Gentamicina - Brainfarma
12. Isopropanol - JTBacker
13. MEM - Meio Mínimo Essencial – GIBCO
14. MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) – AMRESCO
15. Solução de antibiótico e antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina B) - Sigma
16. Soro Fetal Bovino – GIBCO
17. SYBR®Green Master Mix - AppliedBiosystems
18. Tripsina – GIBCO
19. Trizol – Invitrogen

3.2. Soluções

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

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais: Na₂HPO₄ (1,15 g), KH₂PO₄ (0,20 g), NaCl (8,0 g), KCl (0,20 g), sendo o volume final completado para 1 litro com água MILLI-Q. O pH da solução (7,3) foi acertado utilizando-se

HCl 1N ou NaOH 1N. A solução final foi filtrada em membrana de porosidade 0,22 μm (MILLIPORE).

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

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

3. Meio de Cultura MEM

Um envelope de MEM (9,5 g) foi diluído em 900 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 2,2 g de bicarbonato de sódio e 10 mL de solução de antibiótico e antimicótico (SIGMA). O pH do meio foi ajustado para 6,9 – 7,0 utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N. O volume final foi ajustado para 1000 mL e a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 μm (MILLIPORE) e conservada a - 20 °C.

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

5. 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 e sob refrigeração de 2 a 8 °C.

6. Solução de Gentamicina

A matéria-prima de sulfato de gentamicina foi gentilmente doado pela Brainfarma (Anápolis, GO) e as concentrações avaliadas (2, 4, 8, 10, 12, 15 e 20 mM) foram baseadas no trabalho de Tagliati e colaboradores, 2012. Uma massa de 0,584 g de gentamicina foram solubilizadas em 5 mL de PBS em balão volumétrico. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 μm (MILLIPORE). A partir desta solução estoque (200 mM)

foram obtidas as concentrações avaliadas no experimento. Diferentes volumes da solução estoque foram adicionados ao meio de cultura MEM e completados com PBS estéril para obtenção de volumes finais iguais.

7. Solução de etanol 75% em água DEPC

3.3. Cultivo celular

Duas linhagens celulares de origem renal foram cultivadas. A linhagem LLC-PK1, composta por células dos túbulos proximais do néfron, de origem suína - *porcine kidney cell line*. E as células MDCK provenientes de células dos túbulos distais de cão – *Madin-Darby canine kidney*.

As linhagens celulares foram cultivadas em frascos de 75 cm² de polietileno (SARDEST) próprio para crescimento de células, em meio de cultura MEM, com 5% de soro fetal bovino, em estufa a 37°C, umidificada com 5% de CO₂ (Forma Scientific CO₂ Jacketed Incubator). Durante o crescimento celular, o meio foi substituído a cada dois ou três dias, de acordo com a confluência da monocamada celular e os subcultivos (passagens) realizados.

Ao se atingir 80% ou mais de confluência das células na superfície da garrafa, o meio de cultura era descartado e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS) estéril que era descartada em seguida. A seguir, para o descolamento da monocamada, eram adicionados 5 mL da solução estéril da enzima tripsina a 0,20% e EDTA 0,02%. A garrafa era então incubada em estufa a 37°C, umidificada com 5% de CO₂ por 5 minutos. Dessa forma, a enzima tripsina hidroliza as ligações peptídicas entre aminoácidos de caráter positivo, que são responsáveis pela manutenção das células aderidas à garrafa de cultivo e ligadas umas às outras. Uma vez que as ligações peptídicas são desfeitas, há, então, perda da função dessas proteínas de adesão, o que libera as células para o sobrenadante.

Prosseguia-se, então, para a contagem das células com azul de trypan 0,3% na câmara de Neubauer.

3.4. Contagem celular utilizando azul de Trypan

Antes da realização dos experimentos, era realizada a contagem de células viáveis com o uso do corante azul de trypan a 0,3%. O método baseia-se na observação de que as células viáveis se tornam impermeáveis ao corante, ao contrário das células não viáveis que apresentam permeabilidade devido à formação de poros na membrana. O corante penetra nas células não viáveis conferindo-lhes coloração azul após o tratamento, dessa forma prossegue-se a contagem apenas das células viáveis sem coloração (Konopka et al., 1996).

Os 5 mL da suspensão de células em tripsina eram transferidos para tubo plástico cônico graduado de 15 mL de volume e, em seguida, centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm.

O sobrenadante era descartado e o pellet resultante ressuspendido em 1 mL de meio de cultura MEM. A seguir, 10 µL dessa suspensão eram adicionados a 90 µL da solução de azul de trypan a 0,3% e então prosseguia-se a contagem das células com o auxílio de câmara espelhada de Neubauer e microscópio óptico.

3.5 Ensaio de viabilidade celular – MTT

O ensaio de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*) é uma técnica utilizada para verificação de viabilidade celular baseado nos estudos de Mosmann (1983). O MTT é convertido pelas desidrogenases mitocondriais de células vivas em um produto de coloração roxa, o formazan.

Para realização do teste, as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^3$ células/poço. A cada poço foi adicionado 180 μL de meio de cultura MEM e mais 20 μL de diferentes concentrações de gentamicina, células não expostas ao fármaco foram utilizadas como controle. Em seguida, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C umidificada com 5% de CO_2 .

Transcorrido o tempo de incubação, o sobrenadante dos poços das placas foi descartado e substituído por 200 μL /poço de uma solução contendo 5,0 mg/mL de MTT em MEM e procedeu-se a nova incubação por quatro horas em estufa a 37 °C umidificada com 5% de CO_2 .

Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e então adicionou-se 100 μL de solução padrão analítico de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. Procedeu-se leitura das amostras, em espectrofotômetro (Molecular Devices S/N MNR06867 SPECTRA max PLUS 384) a 570 nm. As diferenças na metabolização do MTT foram analisadas por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Turkey ($p < 0,05$).

3.5.1 Reversibilidade

Para avaliação da possível reversibilidade do efeito tóxico da gentamicina sobre as células, foi realizado o ensaio de reversibilidade celular (França, 2013). Esse ensaio segue a metodologia do ensaio MTT. A linhagem LLC-PK1 foi plaqueada em placas de 96 poços nas quantidades de $5,0 \times 10^3$ células/poço, com 180 μL de meio MEM e mais 20 μL de gentamicina nas concentrações de 4, 8 e 12 mM.

Transcorridas as 24 h de exposição ao fármaco, foi realizada a primeira leitura das placas, o meio contendo fármaco foi substituído por 200 μL /poço de uma solução contendo 5,0 mg/mL de MTT em MEM e procedeu-se a nova incubação por quatro horas em estufa a 37 °C umidificada com 5% de CO_2 . Adicionou-se 100 μL de solução padrão analítico de dimetilsulfóxido (DMSO) e

a leitura foi feita em espectrofotômetro (Molecular Devices S/N MNR06867 SPECTRA max PLUS 384) a 570 nm.

Para fins de avaliação da reversibilidade, houve a continuidade do experimento. Em demais placas, o meio contendo fármaco foi substituído por meio MEM e as placas foram incubadas por mais 24 e 48 h. Semelhante ao realizado no ensaio de MTT, as respectivas leituras foram realizadas para observação da reversibilidade do efeito tóxico do fármaco sobre as células em relação às diferenças de metabolização do MTT. As diferenças foram analisadas por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Turkey ($p < 0,05$).

3.6 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

3.6.1 *Extração de RNA*

A avaliação quantitativa de RNA mensageiro transcrito para marcadores de nefrotoxicidade nas células LLC-PK1 e MDCK foi realizada por PCR em tempo real.

As linhagens celulares LLC-PK1 e MDCK foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^3$ células/poço. A cada poço adicionou-se 180 μ L de meio de cultura MEM acrescidos de 20 μ L de gentamicina nas concentrações de 4, 8 e 12 mM. Células não expostas foram utilizadas como controle do experimento.

O RNA total das células foi extraído após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Para isso, as células foram homogeneizadas em TRizol (Invitrogen), 200 μ L de clorofórmio foi adicionado à mistura que foi centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. A mistura foi separada em uma fase contendo TRizol e clorofórmio, uma fase intermediária rica em proteínas e uma fase aquosa superior contendo o RNA. Esta fase aquosa foi coletada e, após adição de isopropanol e centrifugação a 12000 rpm por 20

minutos, houve a precipitação do RNA total. O precipitado resultante foi então lavado com etanol 75%, centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O precipitado obtido foi ressuspendido em água livre de RNAses e quantificado em NanoDrop 2000c. Um micrograma de RNA total foi utilizado para a síntese do cDNA fita simples de acordo com os dados do fabricante utilizando o kit Illustra®Ready-to-Go®RT-PCRBeads (GE Healthcare).

3.6.2. PCR em tempo real

Foram selecionados 11 pares de oligonucleotídeos para a análise de expressão diferencial de genes. A escolha dos oligonucleotídeos foi baseada em levantamento bibliográfico, onde os transcritos alvos dos iniciadores foram demonstrados ser diferencialmente expressos durante processos indutores de nefrotoxicidade em diversos modelos de estudo *in vivo* e *in vitro*. Como os dados bibliográficos não possuem como base de estudo os tipos celulares escolhidos neste trabalho, foi necessária a busca pelas sequências de mRNAs codificadores das proteínas previamente associadas aos danos renais nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information – NCBI (USA). A busca foi iniciada a partir das sequências provenientes dos transcritos de LLC-PK1. Os iniciadores foram obtidos utilizando o programa *Primer BLAST* (NCBI), baseado nas sequências dos transcritos escolhidos. O tamanho dos amplificadores foram restritos ao intervalo de 100 a 200 nucleotídeos. Ademais, os iniciadores *forward/reverse* foram escolhidos de acordo com suas posições nos genes codificador do transcrito uma vez que foram escolhidos os pares que não se encontravam no mesmo éxon. Tal escolha permitiu utilizá-los nos experimentos seguintes com uma confiança maior, pois se houvesse contaminação de DNA genômico nas amostras seria possível detectá-lo durante a etapa referente à curva de dissociação no PCR em tempo real. Os alvos, oligonucleotídeos iniciadores e o número de acesso dos transcritos e o tamanho esperado do amplificado estão na tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados nos ensaio de PCR em tempo real

Primer	Nome do gene	Acesso	Sequencia foward	Sequencia reverse
<i>β-actine</i>	Actin, beta	AJ312193.1	GCTCTGTCTGGCCTCTCAG	ATGTCCACGTCGCACTTCAT
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_001206359.1	GAAGGTCGGAGTGAACGGA	GCCAGAGTTAAAAGCAGCCC
<i>Fosf C</i>	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	XM_005664322.1	TAGGGCTGGTTGCAGCATC	TCTTTGAGGAACTTGGCGCT
<i>HAVcr-1</i> (<i>Kim-1</i>)	Hepatitis A virus cellular receptor 1 (kidney injury molecule 1)	GQ421749.1	TTGCTCCAACAACCTGGTGTCT	GCAGCACCTGTATGGACAGT
<i>ICAM-1</i>	Intracellular adhesion molecule-1	NM_213816.1	ACTTATGTCCTGCCAGCCAC	GTTACAGAAACGGGTGTGC
<i>SSP1</i>	Secreted phosphoprotein 1	NM_214023.1	GATCCGAAGCCCAGCAGC	TGTCCAAGTCAGAAGCCACG
<i>CASP 3</i>	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_214131.1	GACGGACAGTGGGACTGAAG	TGGATGAACCAGGATCCGTC
<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein	XM_003127290.3	GGGAGCAACCCAGAGGC	CCTGGATGAAACCCTGAAGC
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	XM_003121700.3	GACTGAGTACCTGAACCGGC	CCTGGATGAAACCCTGAAGC
<i>EXOC3</i>	Exocyst complex component 3	XM_003361565.3	TCGAAAAGCAACCCCTCCCA	AGCTCCGGTGTAGTGACTCT
<i>ARF 6</i>	ADP-Ribosylation factor 6	NM_001078677.1	TCTGGCGGCATTACTACACC	TCCCTCATCTCCCGGTCATT
<i>Myo1G</i>	Myosin IG	XM_005673338.1	TCAGTGTCTTGGACAGCGAC	TGTTTCCCAGGTGCAGGATG
<i>PAFAH1B1</i>	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1	NM_214250.1	GATGGGAGTGAAGGACGGAA	AGTAAGGTTTCATTCCACCGGA

As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (AppliedBiosystems) utilizando SYBR®Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. O volume das reações foi de 10 µL, contendo 5 µL de SYBR®Green Master Mix (AppliedBiosystems), 200 nM de cada oligonucleotídeo e 3 µL da solução dez vezes diluída das amostras de cDNA. A amostra de cDNA de células não tratadas também foram analisados na mesma placa de reação. Medições de PCR foram realizadas em triplicata. As condições de amplificação utilizadas consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Um estágio, chamado de curva de

dissociação, foi adicionado à reação para controlar quantos alvos foram amplificados. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação da PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60°C a 95°C. Caso ocorra a amplificação de mais de um produto, diferentes temperaturas de dissociação são detectadas. Somente as reações que apresentaram um pico na curva de dissociação e que compreenderam a faixa de 95%-105% de eficiência foram utilizadas para as análises posteriores.

O método comparativo do ciclo limiar foi utilizado para análise dos dados, de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification getting started guide for the 7300/7500 System e UserBulletin#2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). Todos os dados são apresentados como unidades de expressão relativa, após a normalização para o gene GAPDH. As diferenças na expressão relativa dos genes foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Turkey ($p < 0,05$).

3.7. Análise estatística

Todos os dados apresentados representam três experimentos independentes e foram expressos pela média \pm desvio padrão da média (DP). Os dados obtidos através dos ensaios de MTT e PCR em tempo real analisados usando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc), através do teste one-way ANOVA com pós-teste de Turkey, sendo considerado significativas as análises com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT

Para avaliar o efeito da gentamicina sobre a viabilidade das células, utilizou-se o método MTT. Esse método avalia a toxicidade de uma substância sobre a mitocôndria, organela imprescindível para a sobrevivência celular. Nos testes do tipo curva concentração-resposta verifica-se que ambas as linhagens são sensíveis à toxicidade do fármaco de maneira concentração-dependente de acordo com o método empregado (Figura 5). Para a linhagem LLC-PK1 há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as respostas das células dessa linhagem quando expostas por 24 h com o fármaco em concentrações ≥ 4 mM. As células MDCK apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na viabilidade celular quando expostas sob concentrações ≥ 2 mM por 24 h.

Com esses resultados, verifica-se que a gentamicina é citotóxica a ambas as linhagens celulares. Devido às diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) encontradas entre as concentrações empregadas em cada linhagem, foram determinadas que as concentrações 4, 8 e 12 mM fossem utilizadas nos estudos de expressão gênica.

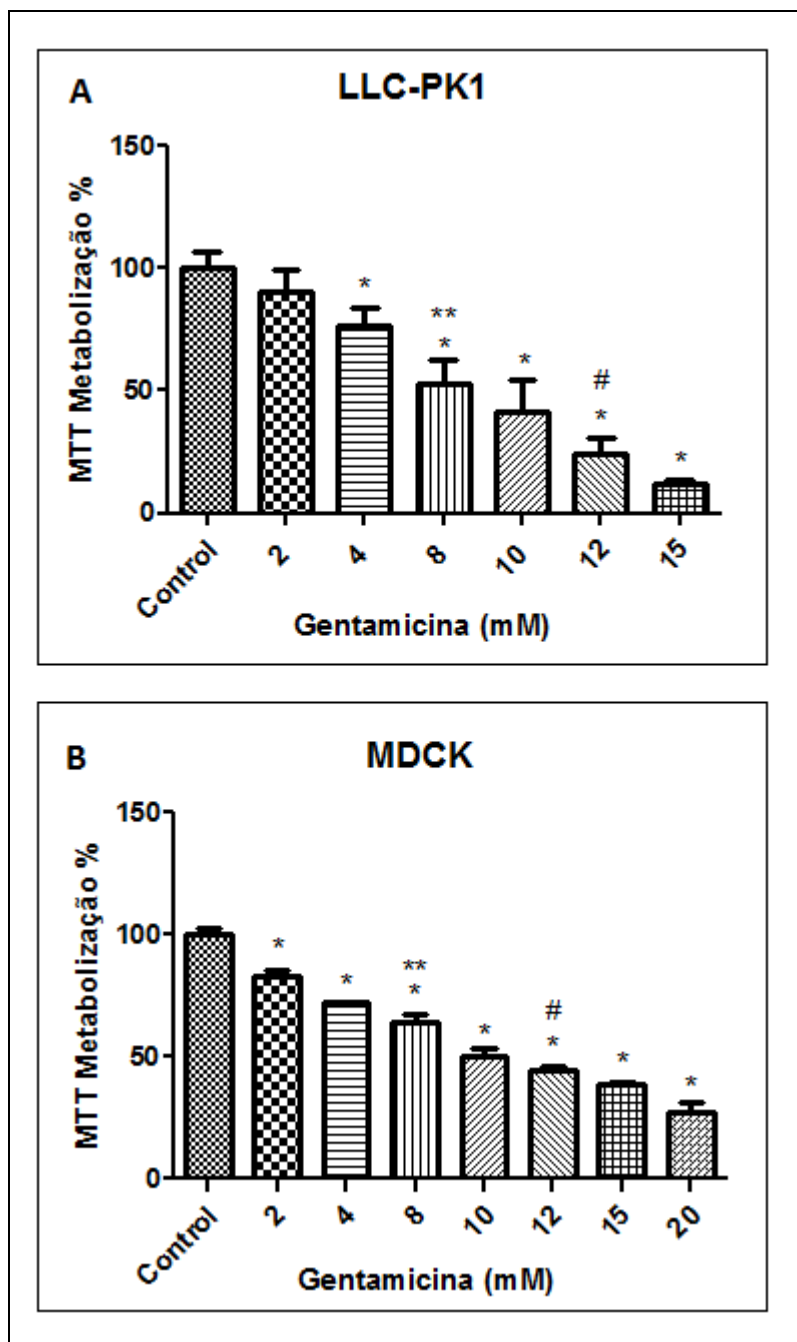


Figura 5. Avaliação da metabolização de MTT.

Curva concentração-resposta das linhagens celulares renais LLC-PK1 (painel A) e MDCK (painel B). As células foram expostas a concentrações crescentes de Gentamicina por 24 horas. Concentrações em mM. Ensaio realizado em sextuplicata, sendo que para cada linhagem foi realizado um controle (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular. (* $p < 0,05$ valores significativamente diferentes dos grupos controle, ** $p < 0,05$ para valores significativamente diferentes da concentração de 4 mM, # $p < 0,05$ para valores significativamente diferentes da concentração de 8 mM).

4.2 Avaliação da reversibilidade da toxicidade utilizando MTT

Para avaliar se as células conseguiram reverter o efeito tóxico da gentamicina, utilizou-se o método MTT. Pela curva concentração-resposta, verifica-se que há reversibilidade dos efeitos tóxicos na concentração de 4 mM em 24 e 48 h de recuperação. Na concentração de 8 mM, observa-se uma tendência à recuperação, em 24 e 48 h progressivamente. A concentração de 8 mM é considerada mediana, portanto a recuperação do efeito tóxico pode ser dependente de condições externas à cultura e também da responsividade da linhagem em estudo, analogamente às condições clínicas de um paciente. Por ora, na concentração de 8 mM pode ser possível pelas células reverter os efeitos tóxicos provocados pela gentamicina. Em células expostas a 12 mM de gentamicina, não se observa a recuperação celular, visto que há diferença significativa em relação às células não expostas ao fármaco.

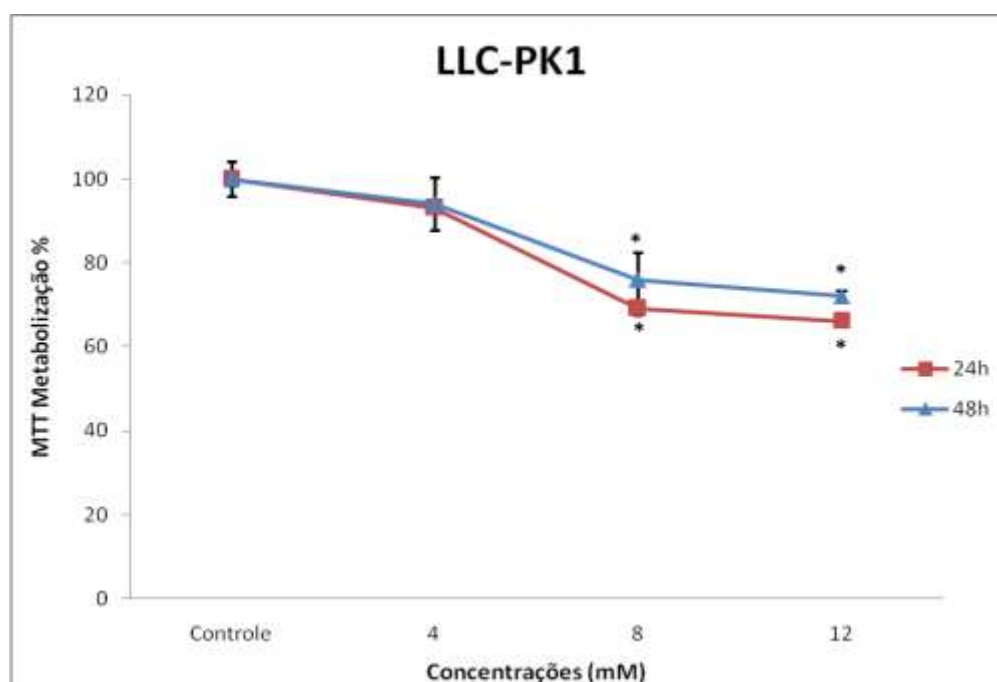


Figura 6: Avaliação da reversibilidade dos efeitos tóxicos pela metabolização de MTT.

Curva concentração-resposta da linhagem renal LLC-PK1. As células foram expostas a concentrações crescentes de Gentamicina por 24 horas, seguida de recuperação celular por mais 24 e 48 h. Concentrações em mM. Ensaio realizado em sextuplicata, sendo que para cada experimento foi realizado um controle (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular. (* $p < 0,05$ valores significativamente diferentes dos grupos controle).

4.3 Efeito do tratamento na expressão gênica diferencial

Uma vez que observamos que a gentamicina reduz a viabilidade celular, determinamos as concentrações 4, 8 e 12 mM para estudo diferencial de expressão gênica. A cultura de células LLC-PK1 foi exposta às concentrações de gentamicina por 24 horas.

Uma pesquisa bibliográfica foi realizada para identificar potenciais candidatos a biomarcadores de nefrotoxicidade a serem avaliados neste estudo. A pesquisa identificou muitos potenciais candidatos para análise diferencial de expressão com base em diversos modelos *in vivo* e *in vitro*. Esses alvos podem ser grosseiramente classificados em categorias, de acordo com suas funções principais: nefrotoxicidade, morte celular e genes associados a vias de secreção e movimento de vesículas.

Após a exposição das células ao fármaco, seguiu-se a extração do mRNA e posterior síntese de cDNA. O nível relativo de expressão gênica nas células LLC-PK1 foi mensurada por PCR em tempo real e as alterações foram representadas em relação às células não expostas à gentamicina. Dentre os 11 alvos analisados, predominou a observação nas alterações de expressão de 4 genes (Figura 7). Os demais alvos foram desconsiderados na análise pela não amplificação ou pela não especificidade nas curvas de amplificação ou pela baixa eficiência de amplificação durante o PCR em tempo real.

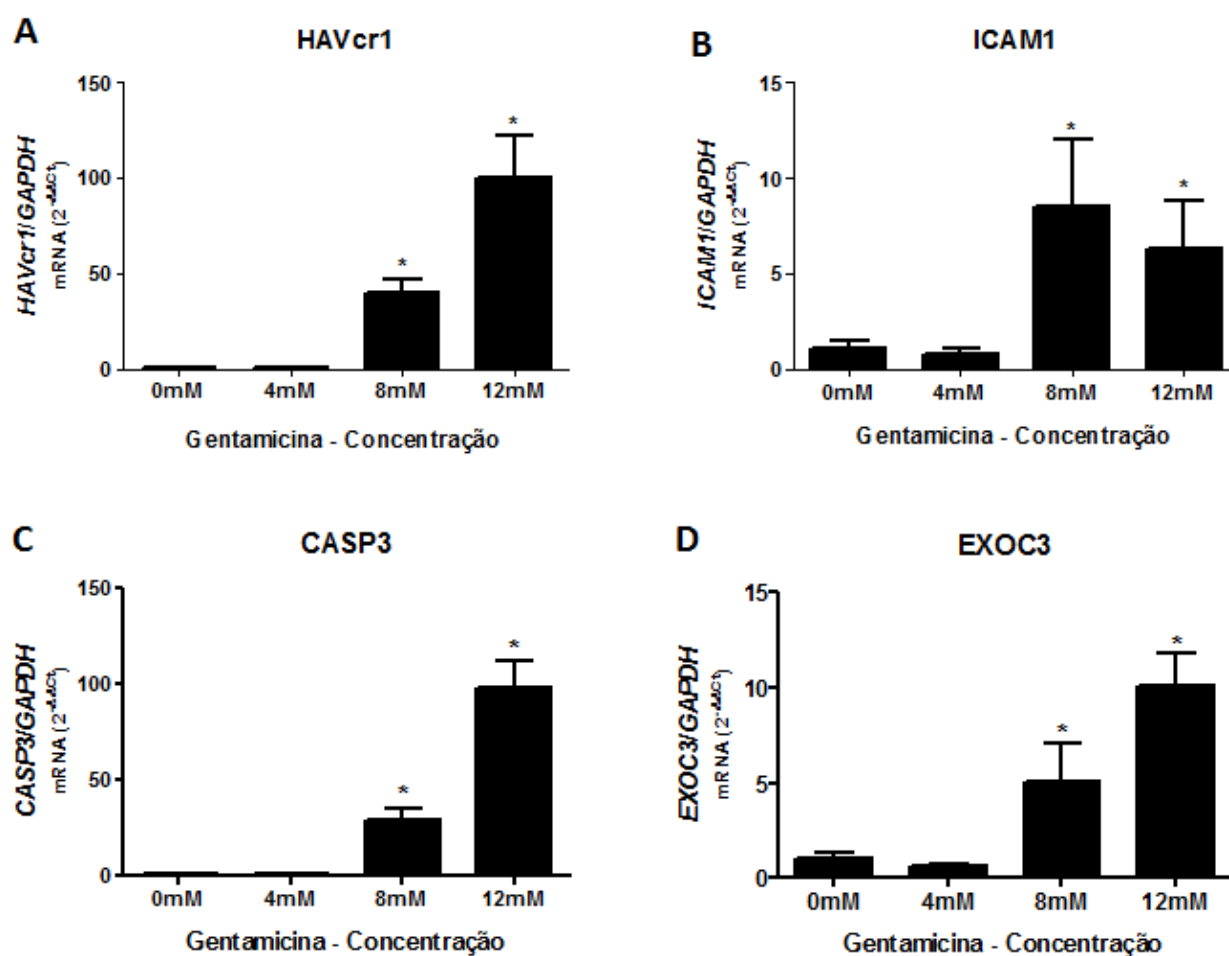


Figura 7: Avaliação da expressão gênica.

Gentamicina induz o aumento de expressão gênica em células LLC-PK1 de HAVcr1, ICAM1, CASP3 e EXOC3. Expressão dos genes: HAVcr-1 (A), ICAM1 (B), caspase3 (C) e EXOC3 (D). Ensaios realizados em triplicata, sendo que células não expostas ao fármaco (0 mM) foram utilizadas como controle. (* $p < 0,05$ valores significativamente diferentes dos grupos controle).

A análise da expressão gênica demonstrou que houve aumento relativo dos alvos HAVcr-1, ICAM-1, CASP3 e EXOC3 quando comparados com o nível de expressão dos transcritos desses genes nas células não expostas ao fármaco. Foi observado que a partir da concentração 8 mM ocorreu significativo aumento da expressão dos quatro alvos analisados. Essa concentração é considerada como intermediária de exposição das células com gentamicina. Para a concentração de 12

mM, os genes HAVcr-1, CASP3 e EXOC3 apresentaram-se mais proeminente elevados em relação às células não expostas. Para o gene ICAM-1, não houve diferença significativa entre as concentrações 8 e 12 mM. Os genes HAVcr-1 e CASP3 demonstram serem os genes com maior aumento nos níveis de expressão dentre os analisados.

O gene *HAVcr-1* foi originalmente clonado do genoma de macacos verdes africanos (African green monkeys) e caracterizado como codificador de um receptor para o vírus causador da doença hepatite A, e subsequentemente identificado como homólogo do gene humano *KIM-1* (kidney injury molecule-1) (Kaplan *et al.*, 1996; Ichimura *et al.*, 1998). *KIM-1* é uma proteína transmembranar com um domínio de imunoglobulina e de mucina, membro de uma grande família que pode funcionar como sensor ou receptor extracelular para adesão ou sinalização nos processos que envolvem a célula-célula ou as interações das células com organismos patogênicos (Bailly *et al.*, 2002; Han e Bonventre, 2004; Ichimura *et al.*, 2004, 2008). O biomarcador codificado por esse gene é altamente sensível e específico para lesão renal, indetectável no tecido renal de humanos e roedores em condições fisiológicas, sua expressão é regulada positivamente no túbulo proximal após isquemia ou injúria tóxica (Ichimura *et al.*, 1998). Esse gene é conservado em várias espécies incluindo peixe-zebra, roedores, cães, primatas e humanos. (Bonventre, 2014). Nossos resultados mostraram que a expressão do gene *KIM-1* está aumentada nas células LLC-PK1 após a exposição à gentamicina. Utilizando MTT para analisar a viabilidade celular diante de diferentes concentrações de gentamicina, a curva de dose-resposta nos permitiu selecionar as concentrações 4 (baixa) , 8 (media) e 12 (alta) mM para analisar a expressão gênica. Na concentração de 8 mM houve aumento significativo da expressão de *KIM-1*. De acordo com nossos resultados, a concentração de 8 mM representa a concentração do antibiótico onde, apesar de gerar lesão renal, está relacionada com a recuperação celular após a exposição ao fármaco. Na concentração de 12 mM, houve aumento significativo da expressão de *KIM-1*, sendo a mesma considerada como tóxica para a célula devido ao fato de não ocorrer mais o processo de recuperação celular.

Nos estudos em humanos de Han *et al.* (2002), houve extensiva expressão de *KIM-1* em células tubulares proximais da biópsia renal de pacientes com confirmada necrose tubular aguda juntamente com níveis urinários elevados de *KIM-1* antes da alteração de outros parâmetros na urina. Em estudo em ratos, Valdyia *et al.* (2010) demonstraram que os níveis urinários de *KIM-1* superam os níveis séricos de uréia e creatinina como preditores de lesão renal e infere que *KIM-1* urinário pode auxiliar na predição de nefrotoxicidade humana.

Dessa maneira, os resultados realizados tanto em animais quanto em humanos mostram a eficiência de *KIM-1* como biomarcador para lesão renal. Tanto as instituições internacionais *Food and Drug Administration* (FDA) quanto a *European Medicines Agency* (EMA) consideram *KIM-1* como um biomarcador urinário altamente sensível e específico para monitorar lesões renais induzidas por drogas em estudos pré-clínicos e de forma caso a caso em ensaios clínicos (Vaidya *et al.*, 2009). Assim, nossos resultados estão condizentes com aqueles obtidos em estudos pre-clínicos em animais e clínicos e sugerem a possibilidade do uso desse gene em modelo de estudo de nefrotoxicidade *in vitro* para o desenvolvimento de fármacos. Nesse sentido, os resultados com células LLC-PK1 indicam que esse modelo pode ser usado como método precoce e alternativo de estudo para detecção de lesão renal.

Somado a isso, de acordo com Denamur *et al.* (2008), células LLC-PK1 incubadas com gentamicina tiveram aumento na porcentagem de células apoptóticas juntamente com um comprovado aumento na atividade da caspase-3. Quiros *et al.* (2013) mostraram que o tratamento de ratos com gentamicina e meio de contraste iodado desenvolveu aumento dos níveis urinários de *Kim-1* e da atividade da caspase-3 nas células tubulares. Nossos resultados estão de acordo com os referidos trabalhos, visto que foi possível observar essas alterações celulares descritas em um nível molecular. Observamos aumento da expressão do gene codificador da caspase-3, promotor de apoptose, nas células LLC-PK1 expostas a um composto nefrotóxico. Com a verificação desse aumento da expressão do gene da caspase-3 em nossos estudos, podemos sugerir a ocorrência das alterações celulares apoptóticas em um nível molecular antes que aconteçam os

efeitos histopatológicos, como observamos na exposição das células à gentamicina numa concentração capaz de reverter os efeitos tóxicos do antibiótico sobre as células. Foi possível observar que o aumento da expressão de *CASP3* pelas células LLC-PK1 ocorreu a partir da utilização de 8 mM de gentamicina, concentração esta em que ainda é possível observar a reversibilidade dos efeitos tóxicos sobre as células.

Além de *Kim-1* e *CASP3* serem associados à marcação de toxicidade de fármacos, Ozaki e colaboradores (2010) demonstraram através de uma investigação toxicogenômica feita em ratos tratados com gentamicina, que, além do gene *Kim-1* ter o mais proeminente aumento, houve também a expressão significativa de outros dois genes: *ICAM1* e *EXOC3*. Esse estudo demonstrou que as alterações histopatológicas renais foram mais proeminentes nos túbulos proximais (Ozaki et al., 2009). No presente trabalho, apresentamos resultados de expressão diferencial gênica de *ICAM-1* e *EXOC3*, similares ao trabalho citado, nas células LLC-PK1, quando tratadas com gentamicina, a partir da concentração de 8 mM. Assim, é possível sugerir mais dois biomarcadores moleculares no estudo da toxicidade renal de fármacos, já que nossos resultados demonstram aumento da expressão de *ICAM-1* e *EXOC3* em células de linhagem provenientes de túbulo proximal.

O gene *EXOC3* faz parte de um complexo que interpõe-se ao direcionamento de vesículas secretórias após o complexo de Golgi. Esse sistema assegura um ordenado tráfego de vesículas com destino à membrana plasmática ou para secreção (Barkefors et al., 2011; Wang e Hsu, 2006). O aumento da expressão de um gene relacionado ao movimento de vesículas pode ser considerado como um distúrbio reflexo na absorção de gentamicina. Servais et al. (2006) sugeriu que, inicialmente, os lisossomos são as fontes de acúmulo da gentamicina como uma forma de defesa das células. Além disso, Sandoval e Molitoris (2004) demonstraram que a gentamicina pode ter acesso direto à mitocôndria sem ruptura dos lisossomos devido ao transporte retrógrado através do complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, decorrente da translocação do citosol. Assim, o aumento da expressão de *EXOC3* observado no presente trabalho sugere uma alternativa celular de aumentar o processo secretório celular na tentativa de eliminar o excesso de

gentamicina intracelular e tentar reverter os efeitos tóxicos desta sobre as funções celulares normais. Da mesma forma, o aumento da expressão de *EXOC3* pode ser induzido devido aos elevados níveis de *KIM-1*, sendo essa uma proteína transmembranar que, inclusive, é altamente secretada na urina após injúria renal (Valdya *et al.* 2010).

O gene *ICAM-1* já foi demonstrado estar expresso diferencialmente em ratos tratados com gentamicina (Bledsoe *et al.* 2008). Foi observado que o nível de expressão de *ICAM-1* e a atividade de caspase-3 nos túbulos proximais estavam alterados após o tratamento. Além disso, foi demonstrado acúmulo de neutrófilos e monócitos/macrófagos nos rins. Durante um dano renal, a gentamicina pode estimular eventos inflamatórios pelo recrutamento dessas células para o local de dano. Para isso, moléculas de adesão como *ICAM-1* devem ser expressas na superfície das células renais para que leucócitos sejam atraídos para o local do dano (Segerer *et al.*, 2000). A presença de leucócitos inflamatórios no local do dano está relacionada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN-\gamma$. Estas moléculas com características inflamatórias participam da patogênese da insuficiência tubulointersticial (Bae *et al.*, 2013). Os níveis de expressão do gene codificador de molécula de adesão *ICAM-1* se apresentaram aumentados quando as células LLC-PK1 foram expostas à concentração de 8 mM de gentamicina. Esse resultado está de acordo com os estudos que demonstram os efeitos deletérios inflamatórios mediados pelo recrutamento de leucócitos aos túbulos proximais dos rins de animais tratados com gentamicina. Dessa forma, *ICAM-1* apresentou-se no presente trabalho como um possível candidato a biomarcador precoce da nefrotoxicidade mediada pela gentamicina.

A linhagem MDCK, proveniente de túbulo distal, também teve sua expressão gênica acessada para os mesmos alvos. Porém, não apresentou respostas satisfatórias de amplificação dos alvos por PCR em tempo real e não apresentaram diferença de expressão (dados não mostrados). Apesar de serem provenientes de espécies diferentes, a conservação das sequências alvo, no que diz respeito ao local de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores, são próximas. Além disso, a não

expressão dos genes em MDCK também pode estar relacionado à toxicidade da gentamicina ocorrer principalmente em células do túbulo proximal.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a análise de *KIM-1*, *caspase-3*, *ICAM1* e *EXOC3* em células LLC-PK1 representam um método alternativo de fundamental importância na avaliação da nefrotoxicidade. Tais genes podem ser considerados biomarcadores precoces de dano renal visto que alteração dos mesmos ocorreu em baixas concentrações de gentamicina. Assim, os resultados obtidos fornecem evidências de que os genes estudados podem ser biomarcadores inovadores para a detecção de lesão renal. Embora sejam necessários mais estudos para confirmar a robustez da previsibilidade acerca desses biomarcadores, nossos resultados indicam que esses podem ser promissores na avaliação de nefrotoxicidade e serão úteis no desenvolvimento de drogas mais seguras.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, M.; Ativistas resgatam cães de laboratório de testes em São Roque (SP). **Folha de São Paulo**. São Paulo, 18 de maio de 2013. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2013/10/1358477-ativistas-invadem-laboratorio-em-sao-roque.shtml>> Acesso: julho, 2014.

ANVISA. Anvisa aprova parceria com INCQS para excluir animais de pesquisas. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/anvisa+aprova+parceria+com+incqs+para+excluir+animais+de+pesquisas>> Acesso: julho, 2014.

BAE, E. H.; KIM, I. J.; JOO, S. Y.; KIM, E. Y.; CHOI, J. S.; KIM, C. S.; MA, S. K.; LEE, J.; KIM, S. W. Renoprotective effects of the direct renin inhibitor aliskiren on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, 0(0), p. 1-14, 2013.

BAILLY, V.; ZHANG, Z.; MEIER, W.; CATE, R.; SANICOLA, M.; BONVENTRE, J.V.; Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. **J. Biol. Chem.** v. 277, p.39739–39748. 2002.

BARKEFORS, I.; FUCHS, P. F.; HELDIN, J.; BERGSTROM, T.; FORSBERG-NILSSON, K.; KREUGER, J. Exocyst complex component 3-like 2 (EXOC3L2) associates with the exocyst complex and mediates directional migration of endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 24189-24199, 2011.

BERNAUER, U.; OBEREMM, A.; MADLE, S.; GUNDERT-REMY, U.; The use of *in vitro* data in risk assessment. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.** 96(3),176-181, 2005.

BLAAUBOER, B. J.; BOEKELHEIDE, K.; CLEWELL, H. J.; DANESHIAN, M.; DINGEMANS, M. M.; GOLDBERG, A. M.; HENEWEER, M.; JAWORSKA, J.; KRAMER, N. I.; LEIST, M.; SEIBERT, H.; TESTAI, E.; VANDEBRIEL, R. J.; YAGER, J. D.; ZURLO, J. The use of biomarkers of toxicity for integrating *in vitro* hazard estimates into risk assessment for humans. **ALTEX**, v. 29(4) p. 411-25, 2012.

BLESOE, G.; SHEN, B.; YAO, Y. Y., HAGIWARA, M.; MIZELL, B.; TEUTON, M.; GRASS, D.; CHAO, L.; CHAO, J. Role of tissue kallikrein in prevention and recovery of gentamicin-induced renal injury. **Toxicological Science**. v. 102, n. 2, p. 433-443, 2008.

BONVENTRE, J.V. Kidney Injury Molecule-1: A Translational Journey. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**. v. 125, p 293-299, 2014.

BRASIL. Lei nº 11.794 de 8 de Outubro de 2008. Estabelece procedimento para o uso científico de animais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 9 de Outubro de 2008. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em 10 de setembro de 2014.

BURCZYNSKI, M. E. Pharmacogenomic approaches in clinical studies to identify biomarkers of safety and efficacy. **Toxicology Letters**, v. 186, p. 18-21, 2009.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D.; Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 40, n. 3, 2004.

CHEN, M.; ZHANG, M.; BORLAK J.; TONG, W. A decade of toxicogenomic research and its contribution to toxicological science. **Toxicological Sciences**, v. 130(2), p. 217–228, 2012.

COLLINS, FRANCIS S.; GRAY, GEORGE M.; BUCHER, JOHN R. Transforming Environmental Health Protection. **Science**; v. 319; p. 906-907. Feb, 2008.

DASTON, G. P.; NACIFF, J. M.; Predicting Developmental Toxicity Through Toxicogenomics. **Birth Defects Research**, v. 90 C, p. 110-117, 2010.

DAVIS II, J. W.; GOODSID, F. M.; BRAL, C. M.; OBERT, L. A.; MANDAKAS, G.; GARNER II, C. E.; COLLINS, N. D.; SMITH, R. J.; ROSENBLUM, I. Y.; Quantitative gene expression in a primate model of antibiotic-induced nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.200, p. 16-26, 2004.

DENAMUR, S.; VAN BAMBEKE, F.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; TULKENS, P. M.; Apoptosis induced by aminoglycosides in LLC-PK1 cells: comparative study of neomycin, gentamicin, amikacin and isepamicin using electroporation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2236-2238, 2008.

DESCOTES, J.; From clinical to human toxicology: linking animal research and risk assessment in man. **Toxicology Letters**. v. 140, p. 3-10, 2003.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BLAAUBOER, B. J.; BOOBIS, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chem. Toxicol.** v. 40, p. 193-236, 2002.

FABIAN, G.; FARAGO, N.; FEHER, L. Z.; NAGY, L. I.; KULIN, S.; KITAJKA, K.; BITO, T.; TUBAK, V.; KATONA, R. L.; TISZLAVICZ, L.; PUSKAS, L. G.; High-Density Real-Time PCR-Based *in Vivo* Toxicogenomic Screen to Predict Organ-Specific Toxicity. **International Journal of Molecular Science**, v. 12, p. 6116-6134, 2011.

FDA. Guidance, Compliance, & Regulatory Information. **Food and Drug Administration**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/default.htm>> Acesso: julho, 2014.

FRANÇA, F. D. Avaliação do envolvimento da via de sinalização PKA na nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B e Ciclosporina utilizando linhagens celulares LLC-PK1 e MDCK. 2013. 114 f.. Tese (Doutorado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

FERGUSON, M. A.; VAIDYA, V. S.; BONVENTRE, J. V. Biomarkers of nephrotoxicity acute kidney injury. **Toxicology**, n. 245, p. 182-193, 2008.

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.

GROTE, J.; HIMMELSBACH, R.; JOHNSON, D.; Methodology for the rapid separation of gentamicin components and regiospecific synthesis of gentamicin conjugates. **Tetrahedron Letters**, v. 53, p. 6751–6754, 2012.

HAN, W. K.; BAILLY, V.; ABICHANDANI, R.; THADHANI, R.; BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney International**, v. 62, p. 237–244, 2002.

HAN, W.K.; BONVENTRE, J.V.; Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. **Curr. Opin. Crit. Care**. n.10, p.476–482, 2004.

HARTUNG, T.; From alternative methods to a new toxicology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. n. 77; p. 338-349; 2011.

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.

ICHIMURA, T.; BONVENTRE, J.V.; BAILLY, V.; WEI, H.; HEISSON, C. A.; CATE, R. L.; SANICOLA, M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 273, p. 4135–42, 1998.

ICHIMURA, T.; HUNG, C.C.; YANG, S.A.; STEVENS, J.L.; BONVENTRE, J.V. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** 286, F552–F563, 2004.

ICHIMURA, T.; ASSELDONK, E.J.; HUMPHREYS, B.D.; GUNARATNAM, L.; DUFFIELD, J.S.; BONVENTRE, J.V. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. **J. Clin. Invest.** 118, p. 1657–1668, 2008.

IMS HEALTH, IMS WorldReview, 2010. Disponível em <<http://www.imshealth.com>>. Acesso em mai. 2012.

KAPLAN, G.; TOTSUKA, A.; THOMPSON, P.; AKATSUKA, T.; MORITSUGU, Y.; FEINSTONE, S.M.; Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. **EMBO J.**, v. 15, p. 4282– 4296, 1996.

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

KROEGER, M.; How omics technologies can contribute to the '3R' principles by introducing new strategies in animal testing. **TRENDS in Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 343-346, 2006.

LAURENT, G., KISHORE, B. K., TULKENS, P. M. Aminoglycoside induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40, p. 2383–2392, 1990.

L'EPLATTENIER, H. F.; ZHAO, J.; PFANNKUCH, F.; SCHOLTYSIK, G.; WIITHRICH, A. Cell culture in nephrotoxicity testing. **Toxicology Letters**, v. 53, p. 227-229, 1990.

LORD, P.G.; NIE, A.; MCMILLIAN, M. Application of genomics in preclinical drug safety evaluation. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol**, v. 98, p. 537–546, 2006.

MANIKANDAN, R.; BEULAJA, M.; THIAGARAJAN, R.; PRIYADARSINI, A.; SARAVANAN, R.; ARUMUGAM, M. Ameliorative effects of curcumin against renal injuries mediated by inducible nitric oxide synthase and nuclear factor kappa B during gentamicin-induced toxicity in Wistar rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, p. 578–585, 2011.

MAURICE, F.; BROUTIN, I.; PODGLAJEN, I.; BENAS, P.; COLLATZ, E.; DARDEL, F. Enzyme structural plasticity and the emergence of broad-spectrum antibiotic resistance. **EMBO reports**, v. 9, p. 344-349, 2008.

MIYAZAKI, T., SAGAWA, R., HONMA, T., NOGUCHI, S., HARADA, T., KOMATSUDA, A., et al.. 73-kDa molecular chaperone HSP73 is a direct target of antibiotic gentamicin. **J Biochem**, v. 279, p. 17295–17300, 2004.

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.

OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. **Organisation for Economic Co-operation and Development**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>> Acesso: setembro, 2014.

OZAKI, N.; MATHEIS, K. A.; GAMBER, M.; FEIDL, T.; NOLTE, T.; KALKUHL, A.; DESCHL, U. Investigation of genes involved in gentamicin induced nephrotoxicity in rats – a toxicogenomic investigation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 555-566, 2010.

PEYROU, M.; HANNA, P.E.; CRIBB, A.E. Cisplatin, Gentamicin, and p-Aminophenol Induce Markers of Endoplasmic Reticulum Stress in the Rat Kidneys. **Toxicological Sciences**, v.99, p. 346-353. 2007.

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

PHARMA. Key Industry and PhRMA Facts. **Pharmaceutical Research and Manufacturers of America**, 2011. Disponível em <<http://www.phrma.org/news-media/related-resources/key-industry-factsabout-phrma>> Acesso em: 8 de Nov.2013.

QUIROS, Y.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, P. D.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J.; MORALES, A. I.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; Cardiostrophin-1 administration prevents the renal toxicity of iodinated contrast media in rats. **Toxicological Science**, v.32, n. 2, p. 493-501, 2013.

RYAN, T. P.; STEVENS, J. L.; THOMAS, C. E.; Strategic applications of toxicogenomics in early drug discovery. **Current Opinion in Toxicology**, v. 8, p. 654-660, 2008.

SANDOVAL, R. M., MOLITORIS, B. A.. Gentamicin traffics retrograde through the secretory pathway and is released in the cytosol via the endoplasmic reticulum. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, p. 617–624, 2004.

SEGERER, S.; NELSON, P. J.; SCHLONDORFF, D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic therapeutic studies. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 11, p. 152-176, 2000.

SERVAIS, H., VAN DER SMISSEN, P., THIRION, G., VAN DER ESSEN, G., VAN BAMBEKE, F., TULKENS, P. M., et al. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 206, p. 321–333, 2005.

SERVAIS, H.; JOSSIN, Y.; BAMBEKE, F. B.; TULKENS, P. M.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, n.4, p. 1213–1221, apr. 2006.

SCHETZ, M.; DASTA, J.; GOLDSTEIN, S.; GOLPER, T. Drug-induced acute kidney injury. **Current Opinion in Critical Care**, v.11, n.6, p.555-565, dec. 2005.

SCHMIDT, C. W.; TOX 21: New Dimensions of Toxicity Testing. **Environ Health Perspect**; v. 117, n. 8, p. A348-A353, 2009.

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.

SPIELMANN, H. Animal use in the safety evaluation of chemicals: harmonization and emerging needs. **ILAR Journal**, v. 43, supl., p.S11-S17, 2002.

SPINDLER, P.; SJOBERG, P.; KNUDSEN L. E. First Exposure in Man: Toxicological Considerations. **Pharmacology & Toxicology**, v.86, n.1, p.8-12, 2000.

TAGLIATI, C. A.; ROMERO, D.; DUTRA, E. C. R.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J.; A comparison of BGM and LLC-PK1 cells for the evaluation of nephrotoxicity. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 35, n. 3, p. 285-263, 2012.

TAKAHASI, V., SACOMANO, J. Proposta de um modelo conceitual para análise do sucesso de projetos de transferência de tecnologia: estudo em empresas farmacêuticas. **Gestão e Produção**, v. 9 n. 2, p. 181-200, 2002.

UEHARA, T.; KONDO, C.; MORIKAWA, Y.; HANAFUSA, H.; UEDA, S.; MINOWA, Y.; NAKATSU, N.; ONO, A.; MARUYAMA, T.; KATO, I.; YAMATE, J.; YAMADA, H.; OHNO, Y.; URUSHIDANI, T. Toxicogenomic biomarkers for renal papillary injury in rats. **Toxicology**, n. 303, p. 1-8, 2013.

VAIDYA, V. S.; FORD, G. M.; WAIKAR, S. S.; WANG, Y.; CLEMENT, M. B.; RAMIREZ, V.; GLAAB, W. E.; TROTH, S. P.; SISTARE, F. D.; PROZIALECK, W. C.; EDWARDS, J. R.; BOBADILLA, N.A.; MEFFERD, S. C.; BONVENTRE, J. V. A rapid urine test for early detection of kidney injury. **Kidney Int.**; v. 76, n. 1, p. 108–114, jul 2009.

VAIDYA, V. S.; OZER, J. S.; DIETERLE, F.; COLLINGS, F. B.; RAMIREZ, V.; TROTH, S.; MUNIAPPA, N.; THUDIUM, D.; GERHOLD, D.; HOLDER, D.; BOBADILLA, N. A.; MARRER, E.; PERENTES, E.; CORDIER, A.; VONDERSCHER, J.; MAURER, G.; GOERING, P. L.; SISTARE, F. D.; BONVENTRE, J. V. Kidney

injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 478-485, may 2010.

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.

WANG, S.; HSU, S. C.; The molecular mechanisms of the mammalian exocyst complex in exocytosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, p. 687-690, 2006.

WANG, E-J.; SNYDER, R. D.; FIELDEN, M. R.; SMITH, R. J.; GU, Y-Z. Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. **Toxicology**, v. 246, p. 91-100, 2008.

ANEXO A

Artigo

Estudo *in vitro* de supostos biomarcadores de nefrotoxicidade por expressão gênica diferencial usando gentamicina

Resumo

A nefrotoxicidade induzida por drogas é um dos efeitos mais frequentemente observados em farmacoterapias a longo prazo e na fase pre-clínica de desenvolvimento de drogas. O desenvolvimento de moléculas bioativas mais específicas para uso terapêutico tem sido dificultado devido à incidência de reações adversas. Os efeitos da nefrotoxicidade são tardiamente descobertos devido à falta de sensibilidade dos métodos *in vivo* para avaliação desse efeito. Por esse motivo, tem-se buscado o desenvolvimento de métodos alternativos *in vitro* para a identificação precoce de toxicidade. A identificação de alterações genéticas induzidas por drogas é de essencial importância para a elucidação de mecanismos moleculares e detecção de dano renal. A gentamicina, por exemplo, é um antibiótico aminoglicosídico amplamente utilizado que provoca nefrotoxicidade. No presente estudo, células LLC-PK1 foram expostas por 24 h à concentrações de gentamicina de 4 (baixa), 8 (média) e 12 (alta) mM, de acordo com o teste MTT, para avaliação da expressão gênica diferencial. Uma pesquisa bibliográfica foi realizada para identificar genes associados ao desenvolvimento de nefrotoxicidade. Um grupo de genes foi selecionado baseado-se na alterações da expressão gênica em vários estudos de nefrotoxicidade. Devido à escassa base de estudo para o modelo celular em estudo, a busca pelas sequências de mRNAs codificadores das proteínas previamente associadas aos danos renais foi realizada nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (USA). Os iniciadores foram obtidos utilizando o programa *Primer BLAST* (NCBI), baseado nas sequências dos transcritos escolhidos. O RNA total foi extraído das células, e RT-PCR foi usado para avaliar os perfis de expressão dos genes selecionados. Entre os genes analisados, quatro deles demonstraram ser diferencialmente induzidos em células expostas ao nefrotoxicante: HAVcr-1 (vírus da hepatite A receptor celular 1), CASP3 (caspase 3),

ICAM-1 (molécula de adesão intracelular 1) e EXOC3 (complexo exocítico componente 3). De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir que esses genes podem ser utilizados como precoces biomarcadores *in vitro* para a identificação de nefrotoxicidade. O estabelecimento de marcadores genômicos é uma ferramenta promissora na avaliação de nefrotoxicidade e serão úteis no desenvolvimento de drogas mais seguras.

Palavras-chave: Toxicogenômica; Biomarcadores; Nefrotoxicidade; Expressão gênica; LLC-PK1; RT-PCR

ABSTRACT

Drug-induced nephrotoxicity is one of the most frequently observed effects in long-term pharmacotherapy and in the early preclinical phase of drug development. The development of more specific bioactive molecules for therapeutic use has been difficult due to the incidence of adverse reactions. The effects of nephrotoxicity are commonly discovered later due to lack of sensitivity of *in vivo* methods to evaluate this effect. Therefore, researchers have tried to develop *in vitro* alternative methods for early identification of toxicity. Identification of drug-induced gene changes is critical to provide insights into molecular mechanisms and to detecting renal damage. Gentamicin, for example, is a widely used aminoglycoside antibiotic that causes nephrotoxicity. In the present study, LLC-PK1 cells were exposed for 24 h to gentamicin concentrations of 4 (low), 8 (medium), and 12 (high) mM, according to MTT tests, to evaluate differential gene expression. A literature survey was conducted to identify genes associated with the development of nephrotoxicity. A panel of genes was selected based on genes expression changes in multiple published studies. Due to limited base of study for the cellular model in this work, the search for sequences of mRNAs encoding proteins that had been previously associated with kidney damage was researched in the databases of the National Center for Biotechnology Information - NCBI (USA). The primers were obtained using the Primer BLAST (NCBI) program, based on the sequences of selected transcripts. RNA was extracted from the cells, and RT-PCR was performed to evaluate expression profiles of the selected genes. Among the analyzed genes, four genes proved to be highly differential up-regulated in cells exposed to the nephrotoxin: HAVcr-1 (hepatitis A virus cellular receptor 1), CASP3 (caspase1), ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) and EXOC3 (exocyst complex component 3). According to the obtained results, it can be suggested that these genes can be used as early *in vitro* biomarkers for the identification of nephrotoxicity. The establishment of genomic markers is a promising tool for evaluating nephrotoxicity and will be useful in the development of safer drugs.

1. Introdução

A nefrotoxicidade induzida por fármacos é um dos mais freqüentes efeitos observados nas farmacoterapias de longo prazo. Durante a fase de desenvolvimento, 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). Os rins, como sendo os principais órgãos responsáveis pela hemodinâmica do organismo, tornam-se expostos a quantidades muito mais elevadas de substâncias tóxicas do que outros órgãos. (L'Eplattenier *et al.*, 1990).

Devido à crescente demanda por diferentes maneiras de refinar os estudos realizados em animais, as técnicas de cultura de células vêm se mostrando como uma importante ferramenta para estudos *in vitro* de nefrotoxicidade. Ocorreram melhorias nas metodologias para o cultivo de culturas homogêneas de células renais, o que permite a análise de fenômenos metabólicos de maneira uniforme. Essa estratégia experimental também permite o acesso a linhagens específicas de porções diferentes ao longo do néfron, o que se torna difícil quando se utilizam células de cultivo primário (Blauboer *et al.*, 2012).

A identificação e avaliação de novos biomarcadores de toxicidade para órgãos-alvo tem sido uma das principais aplicações das tecnologias genômicas. A utilização de cDNA tem se tornado uma abordagem comum na literatura para a classificação de xenobióticos com base em seus perfis de expressão gênica. Esse método tem sido aplicado largamente na nefrotoxicidade induzida por drogas, principalmente em animais (Uehara *et al.*, 2013; Fabian *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2008; Davis II *et al.*, 2004). Por tal motivo, é fundamental o desenvolvimento de métodos *in vitro* para avaliação da nefrotoxicidade.

Para a determinação precisa das variações na expressão gênica, as avaliações por RT-PCR permanecem como padrão ouro. Com efeito, as alterações nos perfis de expressão gênica podem ocorrer antes da tradução de proteínas e

subseqüente início de danos histológicos. Dessa forma, os biomarcadores genômicos se tornam úteis como marcadores de danos histopatológicos e podem contribuir para a avaliação da toxicidade tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Kroeger, 2006; Van der Water *et al.*, 2006).

No presente estudo, foi realizada uma pesquisa bibliográfica para identificar genes com potencial para atenderem como biomarcadores de nefrotoxicidade. Um grupo de genes foi selecionado baseado nas alterações provocadas na expressão gênica de estudos *in vivo* de nefrotoxicidade. O objetivo desse estudo foi avaliar a sensibilidade e especificidade destes candidatos a biomarcadores de nefrotoxicidade. As mudanças no perfil de expressão foram analisadas por RT-PCR usando cDNA sintetizado a partir de células de linhagem renal expostas a gentamicina.

2. Materiais e Métodos

2.1 Células e tratamento

Células da linhagem renal LLC-PK1 foram cultivadas em meio de cultura MEM, com 5% de soro fetal bovino, em estufa a 37 °C, umidificada com 5% de CO₂ (Forma Scientific CO₂ Jacketed Incubator). A matéria-prima de sulfato de gentamicina foi adquirida pela Brainfarma (Anápolis, GO). A solução do fármaco foi previamente preparada em PBS e subsequentemente dissolvida no meio de cultura das células. Quando o crescimento da cultura de células atingiu cerca de 80% de confluência, houve a exposição às diferentes concentrações de gentamicina por 24 horas. As doses foram selecionadas baseadas no trabalho de Tagliati e colaboradores (2012).

2.2 Ensaio de viabilidade celular - MTT

A viabilidade celular pode ser avaliada utilizando o ensaio MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), uma técnica baseada nos

estudos de Mosmann (1983). O teste foi modificado varias vezes desde então (Hansen et al., 1989), e foi validado no laboratório no início deste estudo. Primeiramente, as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de $5,0 \times 10^3$ por poço (em sextuplicata). A cada poço foi adicionado 180 μL de meio de cultura MEM e 20 μL de diferentes concentrações de gentamicina (2, 4, 8, 10, 12, 15 mM), células não expostas ao fármaco foram utilizadas como controle. Então, as placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C umidificada com 5% de CO_2 (Forma Scientific CO_2 Jacketed Incubator). Então, o meio foi removido e uma solução de 20 μL MTT (AMRESCO) (5 mg/mL em MEM) foi adicionado em cada poço e incubado por 4 h. Após o tempo de incubação, as células foram lisadas com 100 μL DMSO (Vetec) por poço. Procedeu-se a detecção e quantificação dos cristais de formazan em espectrofotômetro (Molecular Devices S/N MNR06867 SPECTRA max PLUS 384) a 570 nm.

2.2.1 Reversibilidade celular

A metodologia do ensaio MTT foi utilizada para avaliar a reversibilidade do efeito tóxico da gentamicina sobre as células nas concentrações 4, 8 e 12 mM. Após exposição ao fármaco por 24 h, os poços foram lavados e deixados por mais 24 e 48 h com meio MEM para recuperação celular. Procedeu-se a leitura conforme ensaio MTT.

2.3 Extração de RNA

Decorrido o tempo de exposição ao fármaco, o RNA total das células foi extraído utilizando-se o reagente TRizol (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante. Após a extração, a qualidade e quantidade de RNA purificado foi avaliado usando NanoDrop 2000c. A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se um micrograma de RNA total e o kit Illustra®Ready-to-Go®RT-PCRBeads (GE Healthcare), segundo especificações do fabricante.

2.4 PCR em tempo real

As reações da PCR foram efetuadas no equipamento ABI 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) usando 1 µL de amostra cDNA e SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems) conforme recomendado pelo fabricante. Medições de PCR foram realizadas em triplicata. As condições de amplificação utilizadas consistiram de aquecimento a 50°C por dois minutos, 95°C por dez minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Um estágio, chamado de curva de dissociação, foi adicionado à reação para controlar quantos alvos foram amplificados. Primers foram desenhados após a busca pelas sequências de mRNAs codificadores das proteínas previamente associadas aos danos renais nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* – NCBI (USA). A busca foi iniciada a partir das sequências provenientes dos transcritos de LLC-PK1. Os iniciadores foram obtidos utilizando o programa *Primer BLAST* (NCBI), baseado nas sequências dos transcritos escolhidos. O tamanho dos amplificadores foram restritos ao intervalo de 100 a 200 nucleotídeos. Ademais, os iniciadores *forward/reverse* foram escolhidos de acordo com suas posições nos genes codificador do transcrito uma vez que foram escolhidos os pares que não se encontravam no mesmo éxon. Os alvos, oligonucleotídeos iniciadores e o número de acesso dos transcritos estão na Tabela 1. A especificidade dos primers foi confirmada pela curva de dissociação. O resultado do ciclo limiar (Ct) foi processado baseado no método comparativo, onde GAPDH foi usado como um gene endógeno de referência para normalizar os níveis de expressão dos genes alvo.

Primer	Nome do gene	Acesso	Sequencia foward	Sequencia reverse
<i>β-actine</i>	Actin, beta	AJ312193.1	GCTCTGTCGGCCTCTCAG	ATGTCCACGTCGCACTTCAT
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	NM_001206359.1	GAAGGTCGGAGTGAACGGA	GCCAGAGTTAAAAGCAGCCC
<i>Fosf C</i>	phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)	XM_005664322.1	TAGGGCTGGTTTGCAGCATC	TCTTTGAGGAACTTGGCGCT
<i>HAVcr-1</i> (<i>Kim-1</i>)	Hepatitis A virus cellular receptor 1 (kidney injury molecule 1)	GQ421749.1	TTGCTCCAACAACCTGGTGTCT	GCAGCACCTGTATGGACAGT
<i>ICAM-1</i>	Intracellular adhesion molecule-1	NM_213816.1	ACTTATGTCCTGCCAGCCAC	GTTACAGAAACGGGTGTGC
<i>SSP1</i>	Secreted phosphoprotein 1	NM_214023.1	GATCCGAAGCCCAGCAGC	TGTCCAAGTCAGAAGCCACG
<i>CASP 3</i>	caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase	NM_214131.1	GACGGACAGTGGGACTGAAG	TGGATGAACCAGGATCCGTC
<i>BAX</i>	BCL2-associated X protein	XM_003127290.3	GGGAGCAACCCAGAGGC	CCTGGATGAAACCCTGAAGC
<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2	XM_003121700.3	GACTGAGTACCTGAACCGGC	CCTGGATGAAACCCTGAAGC
<i>EXOC3</i>	Exocyst complex component 3	XM_003361565.3	TCGAAAAGCAACCCTTCCCA	AGCTCCGGTGTAGTGACTCT
<i>ARF 6</i>	ADP-Ribosylation factor 6	NM_001078677.1	TCTGGCGGCATTACTACACC	TCCCTCATCTCCCGGTCATT
<i>Myo1G</i>	Myosin IG	XM_005673338.1	TCAGTGTCTTGGACAGCGAC	TGTTTCCCAGGTGCAGGATG
<i>PAFAH1B1</i>	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, regulatory subunit 1	NM_214250.1	GATGGGAGTGAAGGACGGAA	AGTAAGGTTTCATTCCACCGGA

Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados nos ensaio de PCR em tempo real.

2.5 Análise estatística

O método comparativo do ciclo limiar foi utilizado para análise dos dados, de acordo com a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Relative Quantification guia para 7300/7500 System e UserBulletin#2: ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystem). Todos os dados são apresentados como unidades de expressão relativa, após a normalização para o gene GAPDH. As diferenças na expressão relativa dos genes, MTT e reversibilidade foram feitas usando o programa GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc), através do teste one-way ANOVA com pós-teste de Turkey, sendo considerado significativas as análises com $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Avaliação da viabilidade celular utilizando MTT

O método do ensaio de MTT foi utilizado para avaliar o efeito da gentamicina sobre a viabilidade das células. Esse método avalia a toxicidade de uma substância sobre a mitocôndria, organela imprescindível para a sobrevivência celular. Nos testes do tipo curva concentração-resposta verifica-se que a linhagem LLC-PK1 é sensível à toxicidade do fármaco de maneira concentração-dependente de acordo com o método empregado (Figura 1). Para a linhagem LLC-PK1 há diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as respostas das células dessa linhagem quando expostas por 24 h com o fármaco em concentrações ≥ 4 mM.

Com esses resultados, verifica-se que a gentamicina é citotóxica às células LLC-PK1. Devido às diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) encontradas entre as concentrações empregadas, foram determinadas que as concentrações 4, 8 e 12 mM fossem utilizadas nos estudos de expressão gênica.

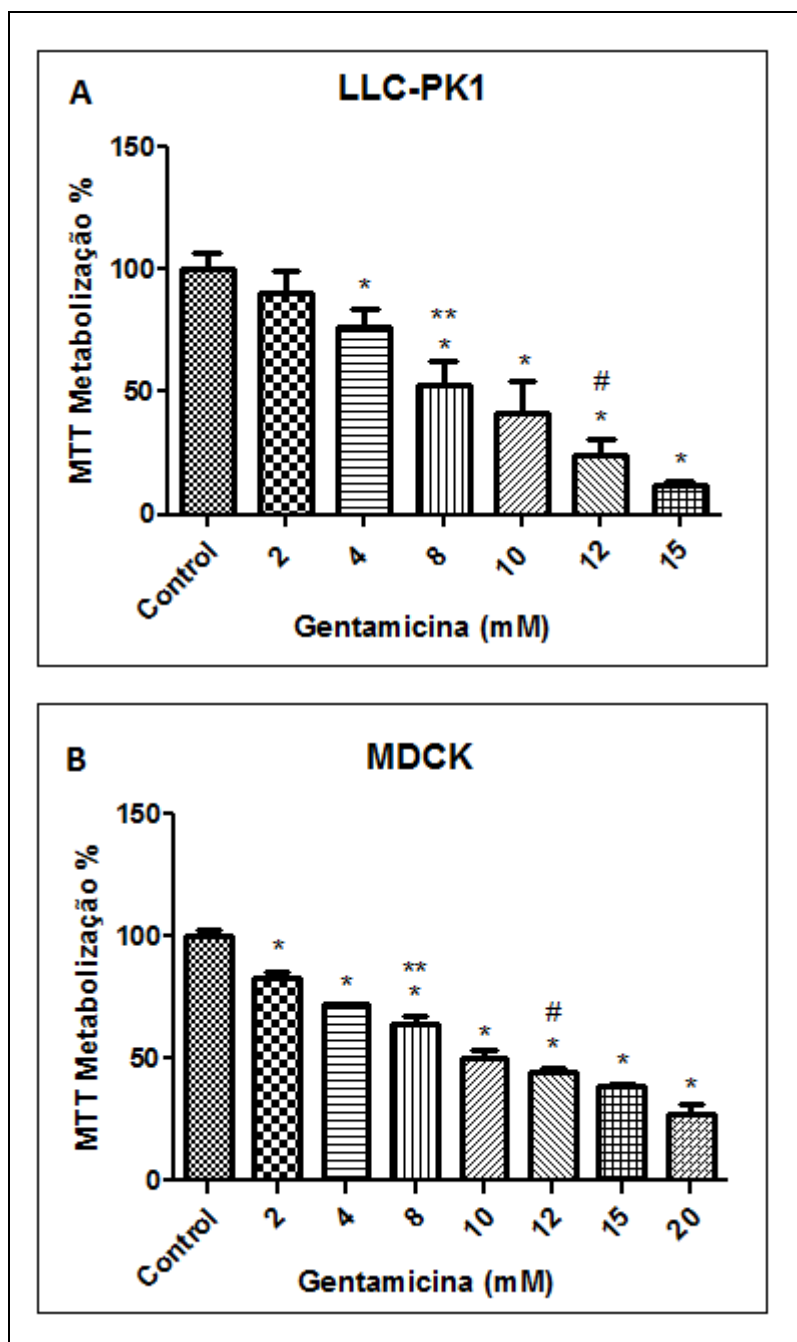


Figura 1. Avaliação da metabolização de MTT.

Curva concentração-resposta das linhagens celulares renais LLC-PK1 (painel A) e MDCK (painel B). As células foram expostas a concentrações crescentes de Gentamicina por 24 horas. Concentrações em mM. Ensaio realizado em sextuplicata, sendo que para cada linhagem foi realizado um controle (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular. (* $p < 0,05$ valores significativamente diferentes dos grupos controle, ** $p < 0,05$ para valores significativamente diferentes da concentração de 4 mM, # $p < 0,05$ para valores significativamente diferentes da concentração de 8 mM).

3.1.1 Avaliação da reversibilidade da toxicidade utilizando MTT

Para avaliar se as células conseguiam reverter o efeito tóxico da gentamicina, utilizou-se o método MTT. Pela curva concentração-resposta, verifica-se que há reversibilidade dos efeitos tóxicos na concentração de 4 mM em 24 e 48 h de recuperação. Na concentração de 8 mM, observa-se uma tendência à recuperação, em 24 e 48 h progressivamente. A concentração de 8 mM é considerada mediana, portanto a recuperação do efeito tóxico pode ser dependente da responsividade da linhagem em estudo, analogamente às condições clínicas de um paciente. Por ora, na concentração de 8 mM pode ser possível pelas células reverter os efeitos tóxicos provocados pela gentamicina. Em células expostas a 12 mM de gentamicina, não se observa a recuperação celular, visto que há diferença significativa em relação às células não expostas ao fármaco.

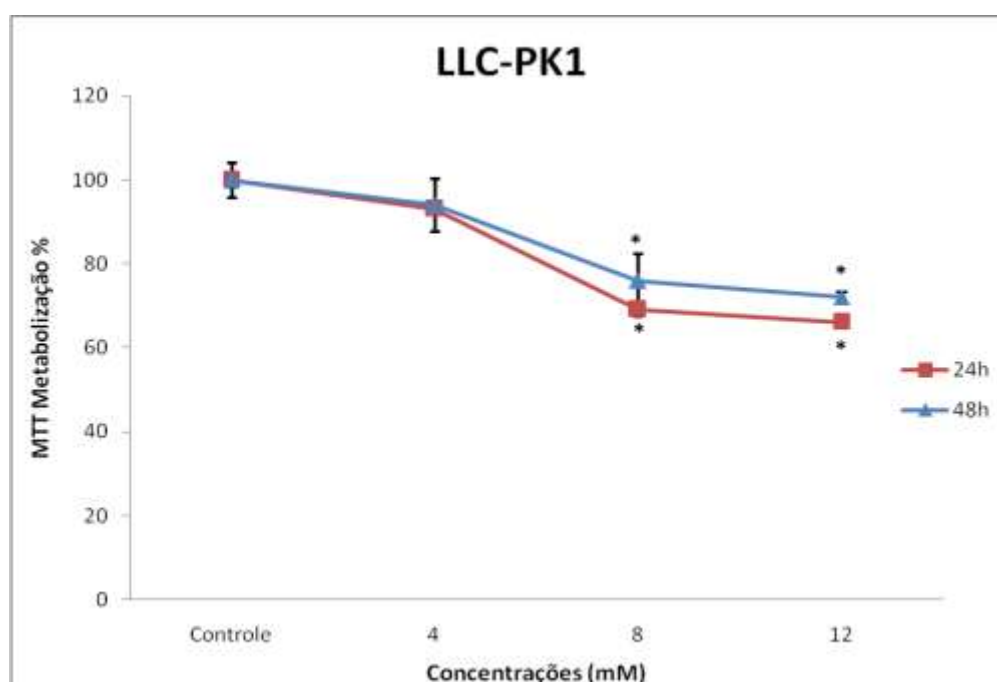


Figura 2: Avaliação da reversibilidade dos efeitos tóxicos pela metabolização de MTT.

Curva concentração-resposta da linhagem renal LLC-PK1. As células foram expostas a concentrações crescentes de Gentamicina por 24 horas, seguida de recuperação celular por mais 24 e 48 h. Concentrações em mM. Ensaios realizados em sextuplicata, sendo que para cada experimento foi realizado um controle (células não tratadas) e para este consideramos 100% de viabilidade celular. (* $p < 0,05$ valores significativamente diferentes dos grupos controle).

3.2 Efeito do tratamento na expressão gênica

Uma pesquisa bibliográfica foi realizada para identificar potenciais candidatos a biomarcadores de nefrotoxicidade a serem avaliados neste estudo. A pesquisa identificou muitos potenciais candidatos para análise diferencial de expressão com base em diversos modelos *in vivo* e *in vitro*.

O nível relativo da expressão gênica em células LLC-PK1 foi determinado por RT-PCR e as mudanças na expressão genica foram representadas em relação às células não expostas à gentamicina. Dentre os 11 alvos analisados, predominou a observação nas alterações de expressão de 4 genes (Figura 3). Os demais alvos foram desconsiderados na análise por apresentarem dois picos de amplificação na curva de dissociação durante o PCR em tempo real.

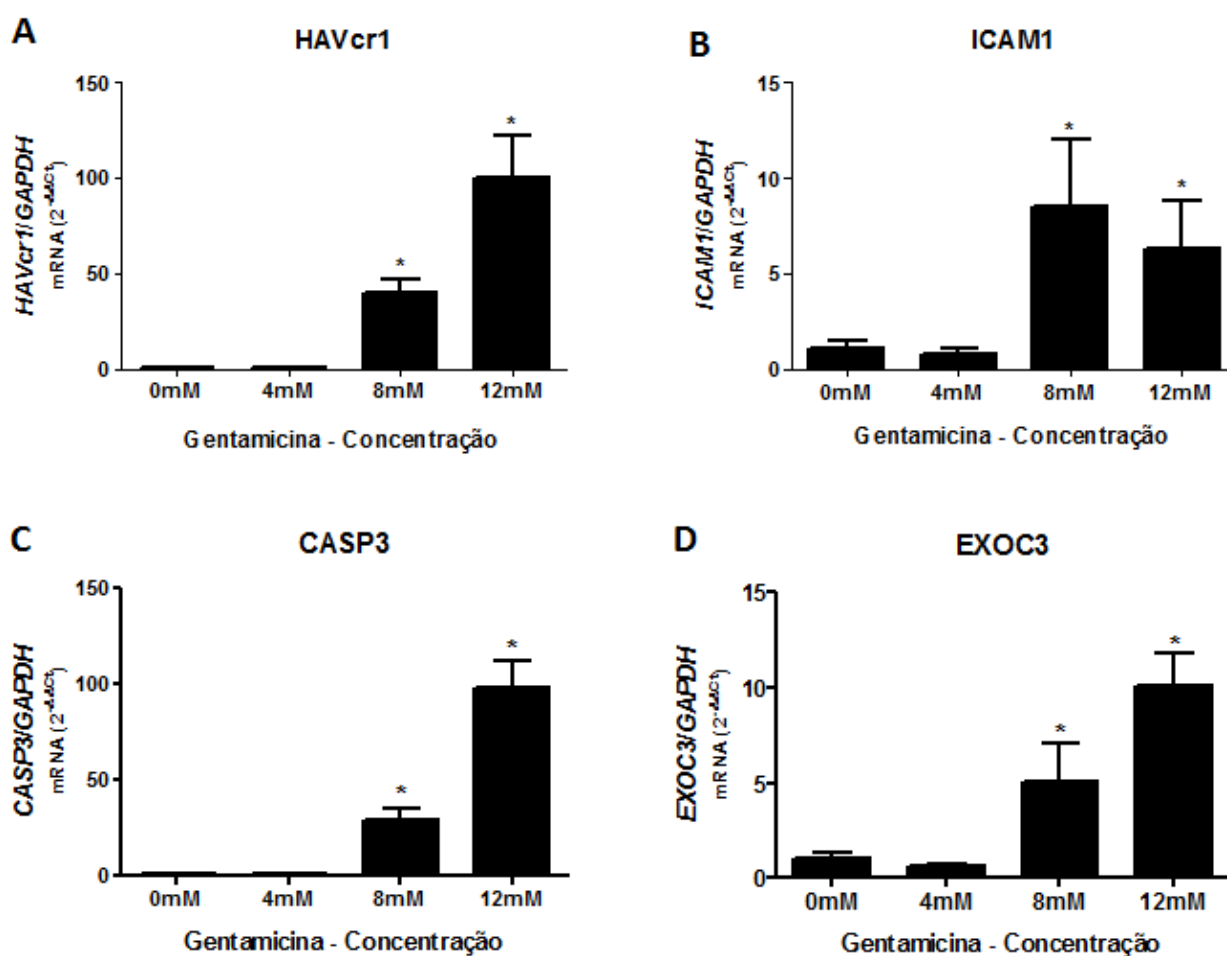


Figura 3: Avaliação da expressão gênica.

Gentamicina induz o aumento de expressão gênica em células LLC-PK1 de HAVcr1, ICAM1, CASP3 e EXOC3. Expressão dos genes: HAVcr-1 (A), ICAM-1 (B), caspase3 (C) e EXOC3 (D). Ensaios realizados em triplicata, sendo que células não expostas ao fármaco (0 mM) foram utilizadas como controle. (* $p < 0,05$ valores significativamente diferentes dos grupos controle).

A análise da expressão gênica demonstrou que houve aumento relativo dos alvos HAVcr-1, ICAM-1, CASP3 e EXOC3 quando comparados com o nível de expressão dos transcritos desses genes nas células não expostas ao fármaco. Foi observado que a partir da concentração 8 mM ocorreu significativo aumento da expressão dos quatro alvos analisados. Essa concentração é considerada como intermediária de exposição das células com gentamicina. Para a concentração de 12 mM, os genes HAVcr-1, CASP3 e EXOC3 apresentaram-se mais proeminente

elevados em relação às células não expostas. Para o gene ICAM-1, não houve diferença significativa entre as concentrações 8 e 12 mM. Os genes HAVcr-1 e CASP3 demonstram serem os genes com maior aumento nos níveis de expressão dentre os analisados.

4. Discussão

No presente estudo, foram validados 11 pares de genes por PCR em tempo real que foram indicados na literatura como desregulados no rim após lesão renal e pode ser bons marcadores de nefrotoxicidade. Os genes com maior variação incluem: HAVcr-1 (Kim-1), CASP3, *ICAM1* and *EXOC3*.

O gene *HAVcr-1* foi originalmente clonado do genoma de macacos verdes africanos (African green monkeys) e caracterizado como codificador de um receptor para o vírus causador da doença hepatite A, e subsequentemente identificado como homólogo do gene humano *KIM-1* (kidney injury molecule-1) (Kaplan *et al.*, 1996; Ichimura *et al.*, 1998). *KIM-1* é uma proteína transmembranar com um domínio de imunoglobulina e de mucina, membro de uma grande família que pode funcionar como sensor ou receptor extracelular para adesão ou sinalização nos processos que envolvem a célula-célula ou as interações das células com organismos patogênicos (Bailly *et al.*, 2002; Han e Bonventre, 2004; Ichimura *et al.*, 2004, 2008). O biomarcador codificado por esse gene é altamente sensível e específico para lesão renal, indetectável no tecido renal de humanos e roedores em condições fisiológicas, sua expressão é regulada positivamente no túbulo proximal após isquemia ou injúria tóxica (Ichimura *et al.*, 1998). Esse gene é conservado em várias espécies incluindo peixe-zebra, roedores, cães, primatas e humanos. (Bonventre, 2014). Nossos resultados mostraram que a expressão do gene *KIM-1* está aumentada nas células LLC-PK1 após a exposição à gentamicina. Utilizando MTT para analisar a viabilidade celular diante de diferentes concentrações de gentamicina, a curva de dose-resposta nos permitiu selecionar as concentrações 4 (baixa) , 8 (media) e 12 (alta) mM para analisar a expressão gênica. Na concentração de 8 mM houve

aumento significativo da expressão de *KIM-1*. De acordo com nossos resultados, a concentração de 8 mM representa a concentração do antibiótico onde, apesar de gerar lesão renal, está relacionada com a recuperação celular após a exposição ao fármaco. Na concentração de 12 mM, houve aumento significativo da expressão de *KIM-1*, sendo a mesma considerada como tóxica para a célula devido ao fato de não ocorrer mais o processo de recuperação celular.

Nos estudos em humanos de Han *et al.* (2002), houve extensiva expressão de *KIM-1* em células tubulares proximais da biópsia renal de pacientes com confirmada necrose tubular aguda juntamente com níveis urinários elevados de *KIM-1* antes da alteração de outros parâmetros na urina. Em estudo em ratos, Valdya *et al.* (2010) demonstraram que os níveis urinários de *KIM-1* superam os níveis séricos de uréia e creatinina como preditores de lesão renal e infere que *KIM-1* urinário pode auxiliar na predição de nefrotoxicidade humana.

Dessa maneira, os resultados realizados tanto em animais quanto em humanos mostram a eficiência de *KIM-1* como biomarcador para lesão renal. Tanto as instituições internacionais *Food and Drug Administration* (FDA) quanto a *European Medicines Agency* (EMA) consideram *KIM-1* como um biomarcador urinário altamente sensível e específico para monitorar lesões renais induzidas por drogas em estudos pré-clínicos e de forma caso a caso em ensaios clínicos (Vaidya *et al.*, 2009). Assim, nossos resultados estão condizentes com aqueles obtidos em estudos pre-clínicos em animais e clínicos e sugerem a possibilidade do uso desse gene em modelo de estudo de nefrotoxicidade *in vitro* para o desenvolvimento de fármacos. Nesse sentido, os resultados com células LLC-PK1 indicam que esse modelo pode ser usado como método precoce e alternativo de estudo para detecção de lesão renal.

Somado a isso, de acordo com Denamur *et al.* (2008), células LLC-PK1 incubadas com gentamicina tiveram aumento na porcentagem de células apoptóticas juntamente com um comprovado aumento na atividade da caspase-3. Quiros *et al.* (2013) mostraram que o tratamento de ratos com gentamicina e meio de contraste iodado desenvolveu aumento dos níveis urinários de *Kim-1* e da

atividade da caspase-3 nas células tubulares. Nossos resultados estão de acordo com os referidos trabalhos, visto que foi possível observar essas alterações celulares descritas em um nível molecular. Observamos aumento da expressão do gene codificador da caspase-3, promotor de apoptose, nas células LLC-PK1 expostas a um composto nefrotóxico. Com a verificação desse aumento da expressão do gene da caspase-3 em nossos estudos, podemos sugerir a ocorrência das alterações celulares apoptóticas em um nível molecular antes que aconteçam os efeitos histopatológicos, como observamos na exposição das células à gentamicina numa concentração capaz de reverter os efeitos tóxicos do antibiótico sobre as células. Foi possível observar que o aumento da expressão de *CASP3* pelas células LLC-PK1 ocorreu a partir da utilização de 8 mM de gentamicina, concentração esta em que ainda é possível observar a reversibilidade dos efeitos tóxicos sobre as células.

Além de *Kim-1* e *CASP3* serem associados à marcação de toxicidade de fármacos, Ozaki e colaboradores (2010) demonstraram através de uma investigação toxicogenômica feita em ratos tratados com gentamicina, que, além do gene *Kim-1* ter o mais proeminente aumento, houve também a expressão significativa de outros dois genes: *ICAM1* e *EXOC3*. Esse estudo demonstrou que as alterações histopatológicas renais foram mais proeminentes nos túbulos proximais (Ozaki et al., 2009). No presente trabalho, apresentamos resultados de expressão diferencial gênica de *ICAM-1* e *EXOC3*, similares ao trabalho citado, nas células LLC-PK1, quando tratadas com gentamicina, a partir da concentração de 8 mM. Assim, é possível sugerir mais dois biomarcadores moleculares no estudo da toxicidade renal de fármacos, já que nossos resultados demonstram aumento da expressão de *ICAM-1* e *EXOC3* em células de linhagem provenientes de túbulo proximal.

O gene *EXOC3* faz parte de um complexo que interpõe-se ao direcionamento de vesículas secretórias após o complexo de Golgi. Esse sistema assegura um ordenado tráfego de vesículas com destino à membrana plasmática ou para secreção (Barkefors et al., 2011; Wang e Hsu, 2006). O aumento da expressão de um gene relacionado ao movimento de vesículas pode ser considerado como um distúrbio reflexo na absorção de gentamicina. Servais et al. (2006) sugeriu que,

inicialmente, os lisossomos são as fontes de acúmulo da gentamicina como uma forma de defesa das células. Além disso, Sandoval e Molitoris (2004) demonstraram que a gentamicina pode ter acesso direto à mitocôndria sem ruptura dos lisossomos devido ao transporte retrógrado através do complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, decorrente da translocação do citosol. Assim, o aumento da expressão de *EXOC3* observado no presente trabalho sugere uma alternativa celular de aumentar o processo secretório celular na tentativa de eliminar o excesso de gentamicina intracelular e tentar reverter os efeitos tóxicos desta sobre as funções celulares normais. Da mesma forma, o aumento da expressão de *EXOC3* pode ser induzido devido aos elevados níveis de *KIM-1*, sendo essa uma proteína transmembranar que, inclusive, é altamente secretada na urina após injúria renal (Valdya *et al.* 2010).

O gene *ICAM-1* já foi demonstrado estar expresso diferencialmente em ratos tratados com gentamicina (Bledsoe *et al.* 2008). Foi observado que o nível de expressão de *ICAM-1* e a atividade de caspase-3 nos túbulos proximais estavam alterados após o tratamento. Além disso, foi demonstrado acúmulo de neutrófilos e monócitos/macrófagos nos rins. Durante um dano renal, a gentamicina pode estimular eventos inflamatórios pelo recrutamento dessas células para o local de dano. Para isso, moléculas de adesão como *ICAM-1* devem ser expressas na superfície das células renais para que leucócitos sejam atraídos para o local do dano (Segerer *et al.*, 2000). A presença de leucócitos inflamatórios no local do dano está relacionada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IFN-\gamma$. Estas moléculas com características inflamatórias participam da patogênese da insuficiência tubulointersticial (Bae *et al.*, 2013). Os níveis de expressão do gene codificador de molécula de adesão *ICAM-1* se apresentaram aumentados quando as células LLC-PK1 foram expostas à concentração de 8 mM de gentamicina. Esse resultado está de acordo com os estudos que demonstram os efeitos deletérios inflamatórios mediados pelo recrutamento de leucócitos aos túbulos proximais dos rins de animais tratados com gentamicina. Dessa forma, *ICAM-1* apresentou-se no presente trabalho como um possível candidato a biomarcador precoce da nefrotoxicidade mediada pela gentamicina.

A linhagem MDCK, proveniente de túbulo distal, também teve sua expressão gênica acessada para os mesmos alvos. Porém, não apresentou respostas satisfatórias de amplificação dos alvos por PCR em tempo real e não apresentaram diferença de expressão (dados não mostrados). Apesar de serem provenientes de espécies diferentes, a conservação das sequências alvo, no que diz respeito ao local de pareamento dos oligonucleotídeos iniciadores, são próximas. Além disso, a não expressão dos genes em MDCK também pode estar relacionado à toxicidade da gentamicina ocorrer principalmente em células do túbulo proximal.

Concluindo, os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a análise de *KIM-1*, *caspase-3*, *ICAM1* e *EXOC3* em células LLC-PK1 representam um método alternativo de fundamental importância na avaliação da nefrotoxicidade. Tais genes podem ser considerados biomarcadores precoces de dano renal visto que alteração dos mesmos ocorreu em baixas concentrações de gentamicina. Assim, os resultados obtidos fornecem evidências de que os genes estudados podem ser biomarcadores inovadores para a detecção de lesão renal. Embora sejam necessários mais estudos para confirmar a robustez da previsibilidade acerca desses biomarcadores, nossos resultados indicam que esses podem ser promissores na avaliação de nefrotoxicidade e serão úteis no desenvolvimento de drogas mais seguras.

Agradecimentos

CNPq (processo n. 473125/2012-9), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (processo n. INCT-INOVAR, #573.564/2008-6 and #E-26/170.020/2008), FAPEMIG e CAPES pelos subsídios de financiamento.

Referencias Bibliográficas

BAE, E. H.; KIM, I. J.; JOO, S. Y.; KIM, E. Y.; CHOI, J. S.; KIM, C. S.; MA, S. K.; LEE, J.; KIM, S. W. Renoprotective effects of the direct renin inhibitor aliskiren on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, 0(0), p. 1-14, 2013.

BAILLY, V.; ZHANG, Z.; MEIER, W.; CATE, R.; SANICOLA, M.; BONVENTRE, J.V.; Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. **J. Biol. Chem.** v. 277, p.39739–39748. 2002.

BARKEFORS, I.; FUCHS, P. F.; HELDIN, J.; BERGSTROM, T.; FORSBERG-NILSSON, K.; KREUGER, J. Exocyst complex component 3-like 2 (EXOC3L2) associates with the exocyst complex and mediates directional migration of endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 24189-24199, 2011.

BLAAUBOER, B. J.; BOEKELHEIDE, K.; CLEWELL, H. J.; DANESHIAN, M.; DINGEMANS, M. M.; GOLDBERG, A. M.; HENEWEER, M.; JAWORSKA, J.; KRAMER, N. I.; LEIST, M.; SEIBERT, H.; TESTAI, E.; VANDEBRIEL, R. J.; YAGER, J. D.; ZURLO, J. The use of biomarkers of toxicity for integrating in vitro hazard estimates into risk assessment for humans. **ALTEX**, 29(4), 411-25, 2012.

BLESOE, G.; SHEN, B.; YAO, Y. Y., HAGIWARA, M.; MIZELL, B.; TEUTON, M.; GRASS, D.; CHAO, L.; CHAO, J. Role of tissue kallikrein in prevention and recovery of gentamicin-induced renal injury. **Toxicological Science**. v. 102, n. 2, p. 433-443, 2008.

BONVENTRE, J.V. Kidney Injury Molecule-1: A Translational Journey. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**. v. 125, p 293-299, 2014.

DAVIS II, J. W.; GOODSID, F. M.; BRAL, C. M.; OBERT, L. A.; MANDAKAS, G.; GARNER II, C. E.; COLLINS, N. D.; SMITH, R. J.; ROSENBLUM, I. Y.; Quantitative gene expression in a primate model of antibiotic-induced nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 200, p. 16-26, 2004.

DENAMUR, S.; VAN BAMBEKE, F.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; TULKENS, P. M.; Apoptosis induced by aminoglycosides in LLC-PK1 cells: comparative study of neomycin, gentamicin, amikacin and isepamicin using electroporation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2236-2238, 2008.

FABIAN, G.; FARAGO, N.; FEHER, L. Z.; NAGY, L. I.; KULIN, S.; KITAJKA, K.; BITO, T.; TUBAK, V.; KATONA, R. L.; TISZLAVICZ, L.; PUSKAS, L. G.; High-Density Real-Time PCR-Based *in Vivo* Toxicogenomic Screen to Predict Organ-Specific Toxicity. **International Journal of Molecular Science**, 12, 6116-6134, 2011

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

HAN, W. K.; BAILLY, V.; ABICHANDANI, R.; THADHANI, R.; BONVENTRE, J. V. Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney International**, v. 62, p. 237–244, 2002.

HAN, W.K.; BONVENTRE, J.V.; Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. **Curr. Opin. Crit. Care.** n.10, p.476–482, 2004.

ICHIMURA, T.; BONVENTRE, J.V.; BAILLY, V.; WEI, H.; HEISSON, C. A.; CATE, R. L.; SANICOLA, M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. **The Journal of Biological Chemistry**; v. 273, p. 4135–42, 1998.

ICHIMURA, T.; HUNG, C.C.; YANG, S.A.; STEVENS, J.L.; BONVENTRE, J.V. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** 286, F552–F563, 2004.

ICHIMURA, T.; ASSELDONK, E.J.; HUMPHREYS, B.D.; GUNARATNAM, L.; DUFFIELD, J.S.; BONVENTRE, J.V. Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. **J. Clin. Invest.** 118, p. 1657–1668, 2008.

KAPLAN, G.; TOTSUKA, A.; THOMPSON, P.; AKATSUKA, T.; MORITSUGU, Y.; FEINSTONE, S.M.; Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. **EMBO J.**, v. 15, p. 4282– 4296, 1996.

KROEGER, M.; How omics technologies can contribute to the '3R' principles by introducing new strategies in animal testing. **TRENDS in Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 343-346, 2006.

LAURENT, G., KISHORE, B. K., TULKENS, P. M. Aminoglycoside induced renal phospholipidosis and nephrotoxicity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40, p. 2383–2392, 1990.

L'EPLATTENIER, H. F.; ZHAO, J.; PFANNKUCH, F.; SCHOLTYSIK, G.; WIITHRICH, A. Cell culture in nephrotoxicity testing. **Toxicology Letters**, v. 53, p. 227-229, 1990.

MIYAZAKI, T.; SAGAWA, R., HONMA, T., NOGUCHI, S., HARADA, T., KOMATSUDA, A., OHTANI H, WAKUI H, SAWADA K, OTAKA M, WATANABE S, JIKEI M, OGAWA N, HAMADA F, ITOH H. 2004. 73-kDa molecular chaperone HSP73 is a direct target of antibiotic gentamicin. **J Biochem**, 279, p. 17295–17300.

OZAKI, N.; MATHEIS, K. A.; GAMBER, M.; FEIDL, T.; NOLTE, T.; KALKUHL, A.; DESCHL, U. Invertigation of genes involved in gentamicin induced nephotoxicity in rats – a toxicogenomic investigation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 555-566, 2010.

QUIROS, Y.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, P. D.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J.; MORALES, A. I.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; Cardiostrophin-1 administration prevents the renal toxicity of iodinated contrast media in rats. **Toxicological Science**, v.32, n. 2, p. 493-501, 2013.

SANDOVAL, R. M., MOLITORIS, B. A.. Gentamicin traffics retrograde through the secretory pathway and is released in the cytosol via the endoplasmatic reticulum. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 286, p. 617–624, 2004.

SEGERER, S.; NELSON, P. J.; SCHLONDORFF, D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiologic therapeutic studies. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 11, p. 152-176, 2000.

SERVAIS, H., VAN DER SMISSEN, P., THIRION, G., VAN DER ESSEN, G., VAN BAMBEKE, F., TULKENS, P. M., et al. Gentamicin-induced apoptosis in LLC-PK1 cells: involvement of lysosomes and mitochondria. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 206, p. 321–333, 2005.

SERVAIS, H.; JOSSIN, Y.; BAMBEKE, F. B.; TULKENS, P. M.; MINGEOT-LECLERCQ, M. P. Gentamicin causes apoptosis at low concentrations in renal LLC-PK1 cells subjected to electroporation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.50, n.4, p. 1213–1221, apr. 2006.

TAGLIATI, C. A.; ROMERO, D.; DUTRA, E. C. R.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, A.; MARTÍNEZ-LÓPEZ, E.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J.; A comparison of BGM and LLC-PK1 cells for the evaluation of nephrotoxicity. **Drug and Chemical Toxicology**. v. 35, n. 3, p. 285-263, 2012.

UEHARA, T.; KONDO, C.; MORIKAWA, Y.; HANAFUSA, H.; UEDA, S.; MINOWA, Y.; NAKATSU, N.; ONO, A.; MARUYAMA, T.; KATO, I.; YAMATE, J.; YAMADA, H.; OHNO, Y.; URUSHIDANI, T. Toxicogenomic biomarkers for renal papillary injury in rats. **Toxicology**, n. 303, p. 1-8, 2013.

VAIDYA, V. S.; FORD, G. M.; WAIKAR, S. S.; WANG, Y.; CLEMENT, M. B.; RAMIREZ, V.; GLAAB, W. E.; TROTH, S. P.; SISTARE, F. D.; PROZIALECK, W. C.; EDWARDS, J. R.; BOBADILLA, N.A.; MEFFERD, S. C.; BONVENTRE, J. V. A rapid urine test for early detection of kidney injury. **Kidney Int.**; v. 76, n. 1, p. 108–114, jul 2009.

VAIDYA, V. S.; OZER, J. S.; DIETERLE, F.; COLLINGS, F. B.; RAMIREZ, V.; TROTH, S.; MUNIAPPA, N.; THUDIUM, D.; GERHOLD, D.; HOLDER, D.; BOBADILLA, N. A.; MARRER, E.; PERENTES, E.; CORDIER, A.; VONDERSCHER, J.; MAURER, G.; GOERING, P. L.; SISTARE, F. D.; BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 478-485, may 2010.

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.

WANG, S.; HSU, S. C.; The molecular mechanisms of the mammalian exocyst complex in exocytosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, p. 687-690, 2006.

WANG, E-J.; SNYDER, R. D.; FIELDEN, M. R.; SMITH, R. J.; GU, Y-Z. Validation of putative genomic biomarkers of nephrotoxicity in rats. **Toxicology**, v. 246, p. 91-100, 2008.