

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

**STELLAMARIS SOARES**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE  
NEFROTOXICIDADE ATRAVÉS DE EXPRESSÃO GÊNICA  
UTILIZANDO CISPLATINA**

**BELO HORIZONTE - MG**

**2015**

**STELLAMARIS SOARES**

**AVALIAÇÃO *in vitro* DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE  
NEFROTOXICIDADE ATRAVÉS DE EXPRESSÃO GÊNICA UTILIZANDO  
CISPLATINA**

Dissertação, como requisito parcial, para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati  
- UFMG

BELO HORIZONTE - MG

2015

S676a Soares, Stellamaris.  
Avaliação *in vitro* de potenciais biomarcadores de nefrotoxicidade através de expressão gênica diferencial utilizando cisplatina. – 2015.

71 f. il.

Orientador: Carlos Alberto Tagliati.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Nefrotoxicologia – Teses. 2. Biomarcadores – Teses. 3. Cisplatina – Teses. I. Tagliati, Carlos Alberto. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD:615.9

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**

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

Apoio Financeiro:

- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-INOVAR)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 473125/2012-9
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)



## FOLHA DE APROVAÇÃO

### **AVALIAÇÃO IN VITRO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE NEFROTOXICIDADE ATRAVÉS DE EXPRESSÃO GÊNICA UTILIZANDO CISPLATINA**

### **STELLAMARIS SOARES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 14 de outubro de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Carlos Alberto Tagliati - Orientador  
UFMG

Prof(a). Adriano de Paula Sabino  
UFMG

Prof(a). Leonardo Augusto de Almeida  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Belo Horizonte, 14 de outubro de 2015.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos, que sempre estiveram ao meu lado,  
acreditando em mim e apoiando minhas escolhas.

Dedico, também, aos meus sobrinhos, que sempre trazem leveza para os momentos  
difíceis.

## AGRADECIMENTO

Aos meus pais e irmãos pelo amor sem medidas, pela dedicação e apoio que recebo dia após dia. Agradeço a compreensão e todos os ensinamentos que recebo de vocês. Sem vocês eu jamais chegaria onde estou, nem seria quem eu sou.

Aos meus sobrinhos por me proporcionarem as maiores alegrias, por carregarem tanto amor apesar de tão pequenos e que, mesmo sem saber, me ajudaram a ter forças para concluir este trabalho.

Às minhas cunhadas, que não poderiam ser melhores, pelo carinho e apoio.

A toda minha família pelo amor e por me proporcionarem momentos tão bons.

Aos meus amigos, em especial a Adriane, Lucila, Isabela, Gabriela, Camila e Luísa, por entenderem os momentos de ausência, pelos ombros e ouvidos sempre à minha disposição, e principalmente pelo amor.

Ao meu orientador, Dr. Carlos Alberto Tagliati, pelas oportunidades, pela disponibilidade e por todos os ensinamentos.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia *in vitro*, Marina, Mariana, Fernanda, Sarah, Augusta, Larissa e Patrick, pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho e pelo companheirismo.

Ao Dr. Leonardo Augusto Almeida e Dr. Adriano de Paula Sabino por terem aceitado fazer parte da banca de avaliação e compartilhar seus conhecimentos.

Ao Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da UFMG pela oportunidade.

*“É bem mais difícil julgar a si mesmo que julgar os outros.  
Se consegues julgar-te bem, eis um verdadeiro sábio.”*

***Antoine de Saint-Exupéry***

## RESUMO

Os ensaios toxicológicos são obrigatórios durante o desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, a falta de preditividade dos modelos *in vivo* tem aumentado a taxa de falha dos candidatos a fármacos, elevando o tempo e os custos para o desenvolvimento de um novo produto. Os métodos alternativos *in vitro* podem levar ao desenvolvimento de medicamentos mais seguros e com redução de custos, podendo ser utilizados nos ensaios pré-clínicos de novas moléculas. A falta de sensibilidade dos marcadores atuais para nefrotoxicidade faz com que estes efeitos sejam descobertos tardiamente. Assim, é fundamental a busca por melhores biomarcadores precoces. O sistema renal recebe grande fluxo sanguíneo devido a suas funções e, por isso, é importante alvo de toxicidade de muitos medicamentos. Considerando que os danos moleculares e celulares precedem as alterações histopatológicas, o estudo da expressão gênica diferencial induzida por medicamentos torna-se importante. Uma vez que a expressão de um conjunto de genes é consistentemente alterada após a exposição a um xenobiótico, a expressão destes genes pode ser utilizada como biomarcadores. O uso de medicamentos reconhecidamente nefrotóxicos em estudos de biomarcadores é uma maneira de identificar tais genes. A cisplatina é um quimioterápico amplamente utilizado na prática médica que tem na nefrotoxicidade sua maior limitação. As principais células renais atingidas pela nefrotoxicidade induzida por cisplatina são as do túbulo proximal. No presente estudo, células LLC-PK1 foram expostas a cisplatina por 48 horas e as concentrações de 1  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  foram escolhidas após o ensaio de MTT. A expressão diferencial de genes relacionados a nefrotoxicidade foi analisada através de PCR em tempo real nas células expostas às concentrações citadas. A diminuição da viabilidade celular observada nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  não foi acompanhada de alteração na expressão dos genes estudados e necessitam de mais estudos para a compreensão de como a cisplatina afetou o crescimento celular. Os genes *HAVCR1 (KIM-1)*, *BAX*, *CASP9*, *CASP3* e *ICAM-1* tiveram a expressão aumentada após exposição a 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina quando comparada a células não expostas. Nossos resultados sugerem que esses genes podem ser utilizados como biomarcadores *in vitro* de nefrotoxicidade, necessitando de mais estudos para validação dos mesmos.

**Palavras-chave:** nefrotoxicidade, biomarcadores, cisplatina, LLC-PK1.

## ABSTRACT

Toxicological tests are required to develop new drugs. However, the lack of predictability of in vivo models has increased the failure rate of drug candidates, increasing time and cost for developing a new medicine. In vitro alternative methods may lead to the development of safer drugs, reduce cost, and can be used in preclinical trials of new molecules. The lack of sensitivity of current markers for nephrotoxicity makes its effects are discovered later. Therefore, it is crucial to search for better early biomarkers. Renal system receives large blood flow due to its functions, and therefore it is important target to many drugs. Whereas the molecular and cellular damage precede the histopathological changes, the study of gene expression induced by drugs has becoming important. Once the expression of a set of genes is consistently changed after the exposure to xenobiotics, these genes can be used as biomarkers. Hence, nephrotoxic drugs have been used such as biomarker studies to identify these genes. Cisplatin is a chemotherapeutic agent widely used in medical practice that has in nephrotoxicity its biggest limitation. The major cells affected by cisplatin-induced nephrotoxicity are the proximal tubule. In this study, LLC-PK1 cells were exposed to cisplatin for 48 hours and the concentrations at 1  $\mu$ M, 6  $\mu$ M and 15  $\mu$ M were selected after the MTT assay. The expression of nephrotoxicity related genes was analyzed by real-time PCR in cells exposed to the aforementioned concentrations. Decrease in cell viability observed at concentrations of 1  $\mu$ M and 6  $\mu$ M and was not accompanied by changes in gene expression studies and require further research for understanding such as cisplatin affect cell growth. The *HAVCR1 (KIM-1)*, *BAX*, *CASP9*, *CASP3* and *ICAM-1* genes have increased expression after exposure to 15  $\mu$ M of cisplatin when compared to unexposed cells. The present study's results suggest that these genes may be used as biomarkers in vitro nephrotoxicity, requiring further studies for validation.

**Keywords:** nephrotoxicity, biomarkers, cisplatin, LLC-PK1.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	<b>Níveis de toxicidade de uma substância .....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2 -</b>	<b>Laboratórios associados ao RENAMA, em destaque o Laboratório de Toxicologia da UFMG.....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 3 -</b>	<b>Esquema de um néfron demonstrando sua constituição e sua microcirculação .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 4 -</b>	<b>Fotomicrografia do epitélio de túbulo contorcido proximal .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 5 -</b>	<b>Fotomicrografia do epitélio de túbulo contorcido distal .....</b>	<b>24</b>
<b>Figura 6 -</b>	<b>Estrutura da cisplatina .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 7 -</b>	<b>Principais aductos formados da interação cisplatina-DNA .....</b>	<b>26</b>
<b>Figura 8 -</b>	<b>Avaliação da metabolização do MTT .....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 9 -</b>	<b>Avaliação da expressão gênica de <i>HAVCR1</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 10 -</b>	<b>Avaliação da expressão gênica de <i>BAX</i> .....</b>	<b>46</b>
<b>Figura 11 -</b>	<b>Avaliação da expressão gênica de <i>CASP9</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 12 -</b>	<b>Avaliação da expressão gênica de <i>CASP3</i> .....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 13 -</b>	<b>Avaliação da expressão gênica de <i>ICAM-1</i> .....</b>	<b>49</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
3Rs	<i>Replace, reduce, refine</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i>
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
CASP3	Caspase 3
CASP9	Caspase 9
CD54	<i>Cluster of differentiation 54</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
$\text{Cl}^-$	Íon cloreto
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
Ctr1	Transportador de cobre 1
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate degydrogenase</i>
h	Hora
HAVCR1	<i>Hepatitis A virus cellular receptor 1</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>

ICCVAM	<i>Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IRA	Insuficiência renal aguda
K <sup>+</sup>	Íon potássio
KIM-1	<i>Kidney injury molecule 1</i>
LabTox	Laboratório de Toxicologia
LLC-PK1	<i>Porcine kidney cell line</i>
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
MEM	Meio Essencial Mínimo
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
Na <sup>+</sup>	Íon sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
°C	Graus Celsius
OCT	Transportador de cátion orgânico
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pt(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Cisplatina
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais

ZEBET

*Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz-und  
Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Desenvolvimento de fármacos e utilização de animais.....	17
1.2	Função renal.....	21
1.3	Cisplatina.....	24
1.4	Nefrotoxicidade induzida por cisplatina.....	27
1.5	Toxicogenômica.....	29
2	OBJETIVOS.....	32
2.1	Objetivo geral.....	32
2.2	Objetivos específicos.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Reagentes.....	33
3.2	Soluções.....	33
3.2.1.	Solução tampão fosfato-salina (PBS).....	33
3.2.2.	Solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02%.....	34
3.2.3.	Meio de cultivo celular.....	34
3.2.4.	Solução de azul de tripan 0,3%.....	34
3.2.5.	Solução de MTT.....	34
3.2.6.	Solução de cisplatina.....	35
3.2.7.	Solução de etanol 75%.....	35
3.3	Cultivo celular.....	35
3.4	Contagem celular pelo método de exclusão do azul de tripan.....	36
3.5	Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT.....	36
3.6	Análise de expressão gênica.....	37
3.6.1.	Extração de RNA total.....	37
3.6.2.	Síntese de cDNA.....	38
3.6.3.	PCR em tempo real.....	38
3.7	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	Avaliação da viabilidade celular pelo método de redução do MTT.....	41
4.2	Efeito do tratamento na expressão gênica diferencial.....	42
5	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	APÊNDICE A – Estudo <i>in vitro</i> de potenciais biomarcadores de nefrotoxicidade por expressão gênica.....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Novos produtos e substâncias entram em nossa vida continua e aceleradamente, porém as ferramentas para avaliação de segurança crescem lentamente. Com isso, existe uma distância crescente entre a capacidade e a necessidade de avaliação de segurança (HARTUNG, 2011). Os estudos toxicológicos têm como objetivo prever os efeitos adversos que podem ocorrer quando o homem entra em contato com medicamentos e outras substâncias químicas. Tais estudos são essenciais para os processos de desenvolvimento, registro e comercialização de medicamentos, sendo os modelos animais os mais utilizados para esse fim (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004).

Em 1959, os pesquisadores Russel e Burch publicaram o princípio dos 3 Rs (*replace, reduce, refine*). Esse princípio refere-se à necessidade de substituir (*Replace*) o uso de animais por métodos alternativos e, quando não for possível a substituição, reduzir (*Reduce*) o número de animais utilizados, além de refinar (*Refine*) as técnicas para que a dor e o sofrimento dos animais sejam diminuídos (RUSSEL, BURCH, 1959). Passaram-se décadas até que as legislações começassem a considerar o princípio dos 3 Rs. Somente nos anos de 1980, a União Europeia emitiu uma diretiva que requeria que os países membros desenvolvessem legislações para a promoção desse princípio (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004). No Brasil, a criação e uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica foi regulamentada no ano de 2008, pela lei nº 11.794 (BRASIL, 2008). E o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) foi criado no ano de 2011 com o objetivo de promover, divulgar e validar os métodos alternativos (BONES, MOLENTO, 2012).

Apesar das vantagens do uso de animais como, por exemplo, as interações entre tecidos e as décadas de experiência em seu manejo e interpretação de dados, a falta de preditividade desse modelo tanto ao que diz respeito a segurança quanto a eficácia eleva drasticamente o custo de desenvolvimento de novos fármacos (HARTUNG, 2011). Além disso, existe grande pressão da sociedade para o banimento dos animais utilizados na pesquisa e na indústria no que tange os aspectos éticos (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004; ALVES, 2013). Os testes toxicológicos atuais são custosos no que diz respeito a tempo, trabalho, síntese de compostos e o grande número de animais utilizados. Abordagens que ofereçam

diminuição em qualquer uma dessas áreas representam um avanço significativo no desenvolvimento de novas drogas (SUTER, BABISS, WHEELDON, 2004).

A toxicidade de qualquer substância é expressa através de danos a níveis celulares que precedem as alterações histopatológicas e clínicas nos seres vivos. Portanto, os primeiros sinais de toxicidade que se seguem à exposição a um xenobiótico podem ser identificados através de estudos em nível molecular. Esses estudos ajudam na compreensão das vias de toxicidade e, associados a estudos em nível tecidual e de resposta individual, permitem um melhor entendimento dos mecanismos de ação. Então, o conjunto de informações que podem ser obtidas desde a exposição até a resposta na população dará compreensão das vias de efeitos adversos (**Figura 1**). Desta maneira, compreender as alterações em nível celular e suas consequências nas funções biológicas é extremamente importante para a predição de toxicidade e avaliação de risco (VAN DE WATER *et al.*, 2006).

**Figura 1 – Níveis de toxicidade de uma substância**



Adaptado de MAXWELL *et al.* Applying the skin sensitisation adverse outcome pathway (AOP) to quantitative risk assessment. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 1, p. 8-12, fev. 2014.

O uso de biomarcadores de toxicidade pode melhorar significativamente o desenvolvimento de novas drogas. O processo de descoberta de um novo fármaco é beneficiado tanto com o uso de biomarcadores em modelos animais quanto durante a triagem de toxicidade em células. Para as indústrias farmacêuticas, a aplicação dos biomarcadores é focada na redução de custos e tempo para o desenvolvimento de um novo medicamento (GOODSAID, 2004).

A análise de expressão gênica diferencial vem sendo utilizada como importante ferramenta na estratégia de desenvolvimento de novos fármacos, pois

pode detectar mais precocemente os efeitos adversos que as metodologias convencionais da toxicologia (SUTER, BABISS, WHEELDON, 2004). Técnicas de toxicogenômica são importantes na identificação de modos de ação, mas transcritos específicos podem ser utilizados como biomarcadores preditivos de alterações tóxicas órgão-específicas. Genes que exibem alterações de expressão consistentes em resposta a efeitos tóxicos podem ser utilizados como marcadores preditivos de efeitos adversos (FUCHS, HEWITT, 2011). A identificação de biomarcadores para o processo de triagem ajudará a reduzir as taxas de falha referente à toxicidade durante o desenvolvimento de novos fármacos (SUTER, BABISS, WHEELDON, 2004).

Os rins são um dos maiores alvos para ação tóxica de drogas devido a sua função de depurar substâncias indesejadas do organismo. Portanto, recebem grande fluxo sanguíneo e são expostos a altas concentrações de drogas e demais químicos (PAZHAYATTIL, SHIRALI, 2014). Entre 30% e 50% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva apresentam quadro de insuficiência renal aguda (IRA) enquanto apenas 7% dos novos candidatos a fármacos falham durante os ensaios pré-clínicos devido a nefrotoxicidade (FUCHS, HEWITT, 2011).

A nefrotoxicidade avaliada em estudos toxicológicos em animais é um dos fatores de falha dos candidatos a fármacos, visto que faltam bons biomarcadores para monitoramento da injúria renal. Os marcadores de injúria renal tradicionais, como creatinina e ureia, são pouco sensíveis e ou específicos para detecção de nefrotoxicidade antes de uma perda considerável da função renal (VAIDYA *et al.*, 2010). Por isso, o potencial nefrotóxico é frequentemente subestimado durante o desenvolvimento de novas drogas, o que leva a um aumento de custos para a indústria farmacêutica. A falta de modelos *in vitro* validados ou aprovados para a predição da nefrotoxicidade é um dos principais problemas (TIONG *et al.*, 2014).

As células do túbulo proximal são os maiores alvos dos nefrotoxicantes, uma vez que suas funções envolvem a concentração e reabsorção do filtrado glomerular expondo essas células a altos níveis de toxinas circulantes (NAUGHTON, 2008). A identificação da injúria dos túbulos renais num estágio inicial tem importantes implicações para avaliação do potencial nefrotóxico em animais e humanos (ICHIMURA *et al.*, 2004).

Para a identificação de potenciais biomarcadores de injúria renal e para compreensão das vias de toxicidade, é fundamental o estudo de nefrotoxicantes

conhecidos como, por exemplo, a cisplatina. A cisplatina é um quimioterápico amplamente utilizado para tratamento de diversos tumores sólidos, e tem na nefrotoxicidade um dos maiores fatores limitantes para seu uso na prática médica. Os mecanismos de nefrotoxicidade induzida pela cisplatina são complexos e envolvem numerosos processos celulares, como apoptose, necrose, estresse oxidativo e inflamação (PABLA, DONG, 2008).

Por serem os maiores alvos dos efeitos tóxicos nos rins, as células do túbulo proximal são preferidas como modelo *in vitro* (TIONG *et al.*, 2014). A linhagem celular LLC-PK1 correspondente a região do túbulo proximal de porcos é amplamente utilizada para estudos de nefrotoxicidade em todo o mundo (KAUSHAL *et al.*, 2001; PARK, LEON, DEVARAJAN, 2002, DENAMUR *et al.*, 2008; FRANÇA *et al.*, 2014). No entanto, ainda existem poucos estudos que avaliam a expressão gênica dessa linhagem após indução de nefrotoxicidade por cisplatina.

Diante do exposto, verifica-se a necessidade da identificação de marcadores capazes de prever precocemente o potencial nefrotóxico durante o processo de desenvolvimento de novos fármacos.

## **1.1 Desenvolvimento de fármacos e utilização de animais**

Estudos toxicológicos são fundamentais nos processos de desenvolvimento de medicamentos e outras substâncias químicas, bem como seu registro e comercialização. Os mesmos têm como meta prever efeitos adversos que possam ocorrer quando tais produtos entram em contato com o ser humano, sendo os modelos animais os mais utilizados para este fim. Os testes toxicológicos regulatórios incluem ensaios de toxicidade aguda, toxicidade sub-crônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, reprodução e teratogênese, dentre outros (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004).

Estudos demonstraram que testes de toxicologia regulatória utilizam cerca de 10% de todos os animais usados para fins experimentais e científicos na União Europeia, enquanto o desenvolvimento e controle de qualidade de produtos médicos e veterinários, cerca de 30%. A área que mais utiliza animais é a de pesquisas biológicas fundamentais com aproximadamente 45% (EUROPEAN COMMISSION, 2013).

O grande número de animais utilizados e o sofrimento causado em alguns tipos de experimentação têm causado grandes discussões de caráter ético (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004). Além disso, o uso dos animais pouco foi modificado nas últimas décadas. Muitas vezes os testes em animais falham em prever os efeitos em humanos, sendo que as principais falhas relatadas envolvem problemas com segurança e falta de eficácia. A inabilidade de prever estas falhas, ou seja, a falta de preditividade, antes dos testes em humanos ou precocemente durante estes testes eleva drasticamente os custos de desenvolvimento de novos medicamentos (HARTUNG, 2011). Na fase pré-clínica, problemas toxicológicos são os maiores responsáveis pela falha no desenvolvimento, causando mais de 40% das falhas (SUTER, BABISS, WHEELDON, 2004).

No entanto, o uso de animais tem vantagens, como por exemplo, as interações entre tecidos e reações fisiológicas próprias de organismos vivos, as décadas de experiência no manejo animal e a interpretação de dados (HARTUNG, 2011). Os animais também são úteis para avaliar efeitos difíceis de se estudar diretamente no homem, como por exemplo, análise de danos a tecidos e ou órgãos através da histopatologia, efeitos no desenvolvimento embriofetal e potencial carcinogênico (SPINDLER, SJÖBERG, KNUDSEN, 2000).

Conforme já descrito, em 1959, Russel e Burch definiram o princípio dos 3Rs, descrevendo a necessidade de substituir o uso dos animais por métodos alternativos. Porém, apenas a partir da década de 1980 foi observada a introdução de novas leis e protocolos baseados na concepção dos 3Rs. Uma dessas medidas foi a diretiva 86/609/ECC do Conselho de Ministros da Comunidade Europeia que requeria que os países membros desenvolvessem legislações onde o princípio dos 3Rs fossem promovidos (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004).

No intuito de promover a implantação da diretiva 86/609/ECC, diversos estados membros da União Europeia criaram centros de validação de métodos alternativos, como o Centro Nacional de Documentação e Avaliação de Alternativas para os Métodos de Experimentação Animal (ZEBET - *Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch*), criado na Alemanha em 1989 (SPIELMANN, 2002). Em 1991, foi fundado o Centro Europeu de Validação de Métodos Alternativos (ECVAM – *European Centre for the Validation of Alternative Methods*), responsável por coordenar o processo de validação de

métodos alternativos no âmbito da União Europeia (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004).

Os Estados Unidos criaram, em 1997, o Comitê de Coordenação Interagências para Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM – *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*). O ICCVAM coordena discussões relativas ao desenvolvimento, validação, aceitação e harmonização dos ensaios toxicológicos (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004).

No Brasil, a lei nº 11.794/2008 estabelece critérios para a criação e uso de animais em atividades de ensino e pesquisa científica, cria o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e obriga que instituições de ensino e pesquisa que fazem uso de animais criem Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUAs). Dentre outras funções, o CONCEA deve credenciar as instituições para criação e ou utilização dos animais e manter um cadastro das CEUAs, dos procedimentos realizados e dos pesquisadores, além de monitorar e avaliar a introdução de métodos alternativos (BRASIL, 2008; BONES, MOLENTO, 2012).

Em 2011, foi criado no Brasil o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), a partir da parceria entre a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). O BraCVAM tem como objetivos promover e divulgar os métodos alternativos, bem como validar tais métodos. No ano seguinte, 2012, foi criada a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) composta por três laboratórios centrais, sendo eles o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ) e o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio). Além desses, constam também os laboratórios associados, dentre eles o LabTox (Laboratório de Toxicologia) da Faculdade de Farmácia/UFMG, todos cadastrados no Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (**Figura 2**). Dentre os objetivos da RENAMA estão o estímulo e implantação de métodos alternativos, incentivo à implementação de qualidade laboratorial e promoção do desenvolvimento, validação e certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais (BONES, MOLENTO, 2012; ARAÚJO, *et al.* 2014; RENAMA, 2015).

**Figura 2 – Laboratórios associados ao RENAMA, em destaque o Laboratório de Toxicologia da UFMG**



Laboratórios associados à Rede Nacional de Métodos Alternativos. Em destaque, Laboratório de Toxicologia da UFMG. Fonte: Adaptado de RENAMA. Disponível em <[http://renama.org.br/?page\\_id=59](http://renama.org.br/?page_id=59)>. Acesso: 21 ago. 2015.

Apesar de toda a regulamentação existente, diversos movimentos de proteção animal são desfavoráveis ao uso dos mesmos em experimentos. Em outubro de 2013, manifestantes contrários ao uso de animais em pesquisas médicas invadiram o Instituto Royal, em São Roque (SP), acusando a empresa de maus-tratos aos cães utilizados em pesquisas (ALVES, 2013).

O princípio dos 3Rs que se refere a diminuir a dor e o estresse causados ao animal de laboratório (refinamento) tem sido atendido com sucesso na toxicologia regulatória. No entanto, substituir os animais sem diminuir a segurança dos químicos é muito mais complexo no momento. A compreensão das bases mecânicas de áreas específicas da toxicologia pode ser uma chance para atender o quesito substituição (SPIELMANN, 2002).

Novos métodos precisam passar por avaliações que comprovem sua relevância e confiabilidade. Para isso são elaborados protocolos (*guidelines*) e os ensaios podem ser validados e aprovados pelos órgãos responsáveis. Assim, cada país poderá colocá-lo no rol de ensaios toxicológicos regulatórios (CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004).

Em setembro de 2014, a ANVISA reconheceu oficialmente o uso de 17 métodos alternativos no Brasil, todos validados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD – *Organization for Economic Co-operation and Development*). No mesmo documento, foi estabelecido o prazo de cinco anos para que os métodos originais sejam substituídos pelos alternativos (CONCEA, 2014).

O uso de metodologias *in vitro* permite a diminuição de custos, a realização de grande número de replicatas, a miniaturização e automação dos experimentos. Além disso, a disponibilidade de modelos celulares de praticamente todos os tecidos e espécies de animais utilizados em laboratório permite que os resultados sejam comparados. Outras tecnologias também estão emergindo, incluindo as “ômicas” (genômica, proteômica, metabolômica, etc.). Como todas as metodologias, as *in vitro* também têm suas limitações. Dentre elas podemos citar a manutenção das células em condições não fisiológicas e a presença de único tipo celular (HARTUNG, 2011).

## 1.2 Função renal

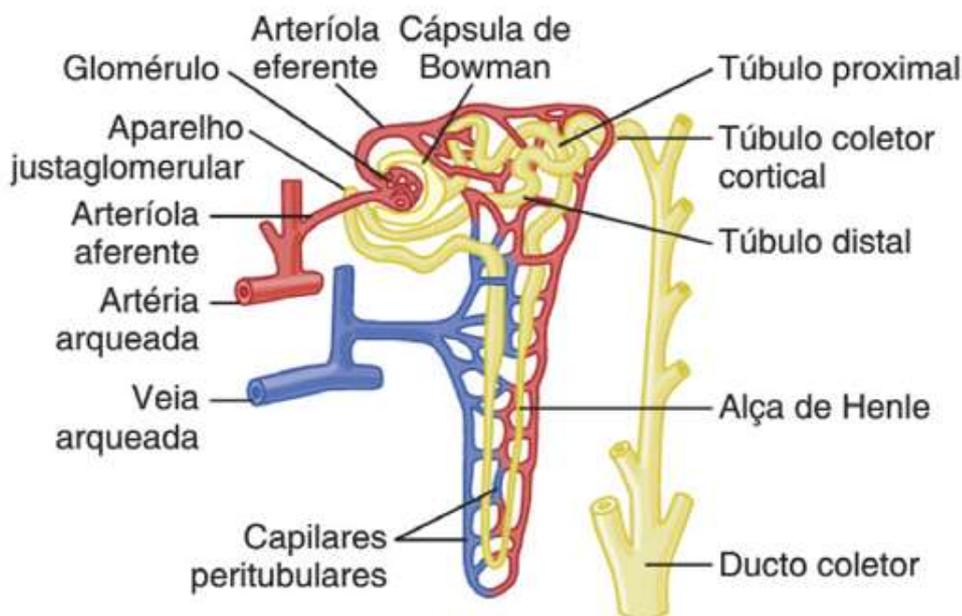
O sistema urinário tem como função eliminar, através da urina, produtos tóxicos da circulação sanguínea que são provenientes do metabolismo. Os rins são os órgãos responsáveis pela remoção de toxinas e, também, pela conservação de sais, glicose, proteína e água, além de outras substâncias essenciais ao bom funcionamento do organismo. Devido à sua função de eliminação e conservação, os rins atuam na regulação da pressão sanguínea, equilíbrio ácido-básico do organismo e hemodinâmica. Além disso, os rins possuem também função endócrina (GARTNER, HIATT, 2007).

Os rins possuem diversas funções primordiais ao bom funcionamento do organismo. Dentre as substâncias depuradas pelos rins, estão a ureia, creatinina, ácido úrico e outros produtos finais de metabolismo. Os dois rins recebem em torno de 22% do débito cardíaco, o que corresponde a um fluxo sanguíneo de,

aproximadamente, 1100 mL/min. O fluxo sanguíneo dos rins é extremamente elevado quando comparado a outros órgãos, isso ocorre devido a sua função de regulação dos volumes e das concentrações dos líquidos corporais (HALL, 2011).

A unidade funcional dos rins é denominada néfron, sendo que cada rim possui entre 800.000 a 1.000.000 de néfrons. Um néfron é constituído pelo glomérulo envolvido pela cápsula de Bowman e por uma porção tubular (**Figura 3**) (HALL, 2011). Cada região renal é modificada de acordo com as funções exercidas. Os glomérulos filtram o fluido vindo da corrente sanguínea, enquanto a porção tubular modifica o filtrado até a formação da urina (GARTNER, HIATT, 2007). Os processos de filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular são regulados de acordo com as necessidades do organismo, assim substâncias como aminoácidos e glicose são completamente reabsorvidas, fármacos e substâncias estranhas são pouco reabsorvidas além de serem secretadas, citando alguns dos solutos presentes do filtrado (HALL, 2011).

**Figura 3 – Esquema de um néfron demonstrando sua constituição e sua microcirculação**



Adaptado de HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

A porção tubular, responsável pela reabsorção e secreção, possui diversas regiões distintas morfológica e funcionalmente. O túbulo proximal tem grande capacidade de reabsorção, sendo que, aproximadamente, 65% da água e sódio

filtrados são reabsorvidos. Essa grande capacidade reabsortiva é decorrente das características celulares dessa porção renal (HALL, 2011). Os túbulos contorcidos proximais são compostos por epitélio simples cúbico, com elaborada borda em escova e um sistema complexo de prolongamentos celulares laterais entrelaçados e interdigitantes que se estendem por praticamente toda altura das células (GARTNER, HIATT, 2007). Essas células possuem grande número de mitocôndrias para suportar os processos de transporte ativo, além disso, a extensa borda em escova e extenso labirinto de canais intercelulares e basais formam uma grande área de superfície de membrana própria para o transporte rápido de substâncias (**Figura 4**). Além da reabsorção, as células do túbulo proximal também fazem secreção de substâncias, como ácidos e bases orgânicos que devem ser rapidamente removidas do organismo. Os fármacos e toxinas também são secretados por estas células, fazendo com que os rins depurem de forma rápida estas substâncias (HALL, 2011).

**Figura 4 – Fotomicrografia do epitélio de túbulo contorcido proximal**



Fotomicrografia evidenciando a borda em escova (entre setas) e a altura total da célula (seta tracejada). Coloração de hematoxilina-eosina, corte de rim de rato. UFRGS. **Biologia Celular Atlas Digital**. Disponível em <<http://www.ufrgs.br/biologiacelularatlas/memb2.htm>>. Acesso em 05 jun. 2015.

Após passar pelo túbulo proximal, o líquido tubular segue pela alça de Henle. A mesma é dividida em três porções, sendo elas o segmento descendente fino, segmento ascendente fino e segmento ascendente espesso. O segmento descendente fino é altamente permeável a água, que é então reabsorvida. Já os segmentos ascendentes são praticamente impermeáveis a água. No segmento

ascendente espesso ocorre a reabsorção ativa de diversos íons, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (GANONG, 2010). No túbulo distal a maioria dos íons é avidamente reabsorvida, mas suas células são praticamente impermeáveis a água e a ureia (**Figura 5**). O túbulo distal final e túbulo coletor cortical possuem funções similares, sendo reabsorção de íons sódio, secreção de íons potássio e hidrogênio e impermeabilidade a ureia. O ducto coletor medular realiza baixa reabsorção de água e sódio, sendo o local final para o processamento da urina (HALL, 2011).

**Figura 5 – Fotomicrografia do epitélio de túbulo contorcido distal**



Túbulo contorcido distal (1) em corte transversal evidenciando as células cúbicas pouco acidófilas. Coloração de hematoxilina-eosina. Adaptado de UFG. **Atlas de Histologia**. Disponível em <<https://histologia.icb.ufg.br/urina/open.htm>>. Acesso em 05 jun. 2015.

### 1.3 Cisplatina

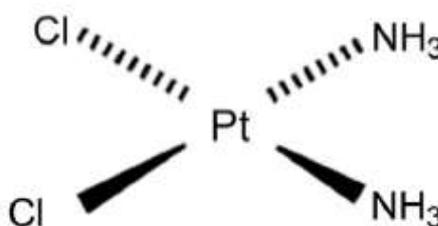
Drogas quimioterápicas têm um papel fundamental no tratamento de neoplasias, no entanto seu uso pode resultar em complicações sistêmicas. O desenvolvimento de nefrotoxicidade é comum durante o uso de quimioterápicos e pode resultar em diversas complicações renais (PAZHAYATTIL, SHIRALI, 2014), sendo este um frequente fator limitante durante o tratamento do câncer (TIONG *et al.*, 2014).

A cisplatina tem ação tumoricida e é utilizada em diversos regimes de tratamento de tumores sólidos, como câncer de bexiga, próstata, ovário, testículo, cabeça e pescoço, pulmão, mama, dentre outros (PABLA, DONG, 2008; MILLER *et al.*, 2010; PAZHAYATTIL, SHIRALI, 2014). Em 1965, foi demonstrada a ação de

inibição da divisão celular causada pela cisplatina. Em 1969, a ação anti-tumoral foi descoberta em modelos animais. Os testes clínicos de fase I da cisplatina iniciaram em 1971, quando foi feito o primeiro relato de sua nefrotoxicidade, e sua aprovação para o tratamento de câncer de próstata ocorreu em 1978, desde então tem sido amplamente utilizada na quimioterapia (MILLER *et al.*, 2010; NEVES, VARGAS, 2011).

A cisplatina é um complexo inorgânico formado por um átomo central de platina ligado a dois átomos de cloro e duas moléculas de amônia na posição cis (**Figura 6**), com massa molecular correspondente a 300,06 g/mol. A cisplatina apresenta-se em pó ou cristais amarelos em temperatura ambiente (DASARI, TCHOUNWOU, 2014).

**Figura 6 – Estrutura da cisplatina**



---

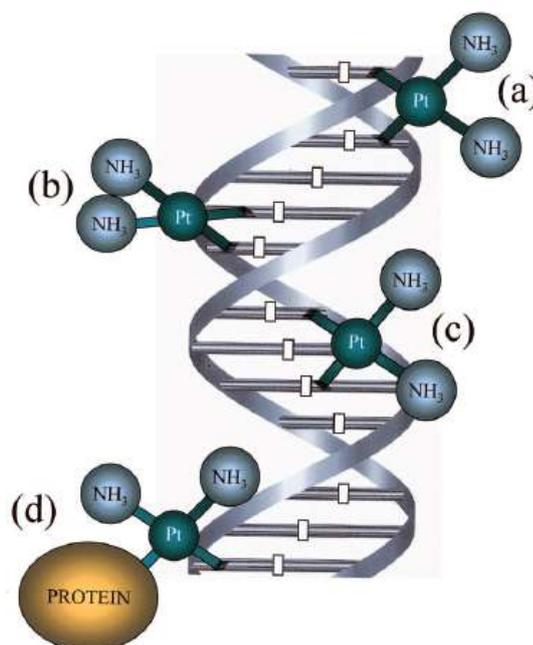
Adaptado de DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, v. 740, p. 364-368, out. 2014.

A alta concentração de íons cloreto fora das células impede que a cisplatina sofra hidrólise, permanecendo em sua forma neutra -  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$ . No entanto, ao entrar na célula, onde os níveis de cloreto são mais baixos, os átomos de cloro são substituídos por moléculas de água, formando espécies ativadas (NEVES, VARGAS, 2011; DASARI, TCHOUNWOU, 2014).

A cisplatina forma ligações cruzadas intra- e interfilamentos com o DNA (**Figura 7**), sendo mais comuns as ligações cruzadas intrafilamentos entre guaninas adjacentes. A formação de ligações cruzadas inibe a síntese de DNA, desnatura a dupla hélice e provoca quebra da molécula de DNA. Embora o DNA genômico seja aceito como o alvo farmacológico crítico para ação da cisplatina, outros alvos celulares contendo sítios nucleofílicos fazem ligações com este fármaco. O DNA mitocondrial, RNA e proteínas também são alvos para ação citotóxica da cisplatina

(GONZALEZ *et al.*, 2001; LACY *et al.*, 2003). A formação de aductos com o DNA ativa muitos mecanismos de sinalização celular, como reparo de DNA, arresto do ciclo celular e apoptose. O sistema de reparo de DNA é capaz de reparar danos medianos, no entanto, danos extensivos não podem ser reparados e culminam com a morte celular (PABLA, DONG, 2008; KARASAWA, STEYGER, 2015).

**Figura 7 – Principais aductos formados da interação cisplatina-DNA**



Ligação cruzada interfilamento (a), ligação cruzada intrafilamento (b) e (c), ligação cruzada proteína-DNA. Fonte: GONZALES *et al.* Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Molecular Pharmacology**, v.59, n. 4, p. 657-663, 2001.

Os mecanismos de transporte intracelular da cisplatina variam de acordo com o tipo celular. Evidências sugerem que o sistema de transporte de cobre está criticamente envolvido com a internalização de cisplatina, sendo o transportador Ctr1 altamente expresso nas células do túbulo proximal. No entanto, o papel deste transportador em modelos renais não tem sido estudado. Transportadores de cátion orgânico (OCTs) mediam a entrada de cisplatina pelas faces basolateral e apical celular. A cisplatina não interage com o transportador OCT1, expresso principalmente pelas células hepáticas, mas interage com OCT2 expresso pelas células renais. Sugere-se que este padrão de expressão dos transportadores OCT esteja relacionado com a toxicidade da cisplatina em diferentes órgãos (PABLA, DONG, 2008; OH *et al.*, 2014).

Mesmo tomando medidas para tentar reduzir a nefrotoxicidade causada pela cisplatina, a incidência de insuficiência renal aguda (IRA) ocorre entre 4% e 23% dos pacientes (TIONG et al., 2014). Os efeitos tóxicos, como ototoxicidade, neurotoxicidade e, principalmente, a nefrotoxicidade são os principais fatores limitantes do uso da cisplatina na prática clínica (PABLA, DONG, 2008).

#### **1.4 Nefrotoxicidade induzida por cisplatina**

Conforme mencionado anteriormente, os rins recebem grande fluxo de drogas e químicos presentes no sangue. Portanto, o uso de medicamentos nefrotóxicos pode levar à insuficiência renal aguda, que está associada ao aumento de morbidade e mortalidade (TIONG et al., 2014). Devido às suas funções de concentração do filtrado glomerular e transporte e metabolismo de drogas, as células do túbulo proximal são os maiores alvos para nefrotoxicantes. Além disso, muitos medicamentos são amplamente utilizados apesar de sua conhecida toxicidade renal, como aminoglicosídeos, vancomicina e cisplatina (NAUGHTON, 2008; TIONG et al., 2014).

Durante o desenvolvimento de novos fármacos, a toxicidade nos túbulos proximais é o maior alvo de pesquisa no que diz respeito ao dano renal. No entanto, apenas 7% dos novos candidatos a fármacos falham durante os ensaios pré-clínicos devido à nefrotoxicidade, enquanto cerca de 30% a 50% dos pacientes em unidades de terapia intensiva apresentam quadro de IRA. Essa discrepância ajuda a explicar como a nefrotoxicidade é subestimada durante os ensaios pré-clínicos (FUCHS, HEWITT, 2011). A nefrotoxicidade é influenciada tanto por características próprias das drogas quanto pelo ambiente específico dos rins (PAZHAYATTIL, SHIRALI, 2014). Sendo que a insuficiência renal aguda e suas complicações contribuem para falência de múltiplos órgãos em pacientes criticamente doentes, exercendo efeito direto em outros órgãos e sistemas (TIONG et al., 2014).

Estima-se que nos Estados Unidos 1% das admissões hospitalares refere-se a pacientes com IRA e que de 5% a 7% dos pacientes hospitalizados desenvolvem IRA. Além das sequelas, IRA prolonga a hospitalização e aumenta significativamente os custos hospitalares, tendo um custo anual estimado em cerca de oito bilhões de dólares (TIONG et al., 2014). Drogas e outros tóxicos são responsáveis em cerca de

20% pelo desenvolvimento de IRA adquirida dentro e fora dos hospitais (NAUGHTON, 2008; TIONG et al., 2014).

Além do baixo poder preditivo dos ensaios pré-clínicos e clínicos, o atual critério para diagnóstico da IRA envolve medidas de creatinina e ureia, no entanto os valores desses biomarcadores são alterados apenas quando 50% da taxa de filtração glomerular é perdida. Além disso, seus níveis são afetados pela idade, massa muscular, estado nutricional, alimentação, uso de esteróides, sexo, dentre outros fatores. O atraso no diagnóstico de IRA devido a baixa sensibilidade do diagnóstico leva a perda da oportunidade terapêutica, evidenciando a necessidade de novos biomarcadores também na prática clínica (TIONG et al., 2014).

A nefrotoxicidade induzida pela cisplatina foi reconhecida há cerca de quatro décadas e mesmo com os esforços para identificação de alternativas menos tóxicas e com mesma eficácia, a cisplatina continua sendo amplamente prescrita. Dentre os efeitos tóxicos causados pela cisplatina, a IRA é um dos mais comuns e também mais sérios, acometendo entre 20% e 30% dos pacientes em tratamento, sendo que um terço apresenta injúria renal já nos primeiros dias de tratamento (FUKASAWA et al., 2014; OH et al., 2014). Além disso, alterações eletrolíticas como hipomagnesemia, hipocalcemia, hipocalcemia, hipouricemia e hiponatremia podem ocorrer após administração de cisplatina e podem persistir por anos, mesmo após o fim da terapia (FUKASAWA et al., 2014).

A excreção da cisplatina é predominantemente renal, sendo a excreção biliar e intestinal mínima. Durante o processo de excreção, a cisplatina é acumulada nos rins podendo chegar a níveis tóxicos para suas células mesmo quando os níveis sanguíneos não são tóxicos. A nefrotoxicidade por cisplatina é dose-dependente e a concentração nas células tubulares pode chegar a ser até 5 vezes mais alta que a concentração sanguínea (PERES, CUNHA JÚNIOR, 2013; DASARI, TCHOUNWOU, 2014).

A patofisiologia da nefrotoxicidade induzida por cisplatina tem sido estudada nas últimas décadas. Porém, apenas recentemente os mecanismos celulares e moleculares tem sido foco das pesquisas científicas (PABLA, DONG, 2008). Ao entrar na célula, a cisplatina é hidrolisada e fica positivamente carregada. Essa forma ativa faz ligações cruzadas com DNA, conforme citado anteriormente. Porém, apenas cerca de 1% da cisplatina se liga ao DNA nuclear. A cisplatina positivamente carregada acumula-se preferencialmente dentro de mitocôndrias negativamente

carregadas. Assim, células com alta densidade mitocondrial parecem ser mais sensíveis à cisplatina. Essa observação pode explicar a alta sensibilidade das células do túbulo proximal à ação citotóxica da cisplatina (MILLER et al., 2010; PERES, CUNHA JÚNIOR, 2013).

Os mecanismos de ação da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina são complexos e envolvem numerosos processos celulares, incluindo estresse oxidativo, apoptose e inflamação. A morte celular ocorre tanto através da apoptose quanto através da necrose, sendo o dano renal uma característica histopatológica comum entre os pacientes em tratamento com este medicamento (PABLA, DONG, 2008; OH et al., 2014).

A apoptose do epitélio renal induzida pela cisplatina ocorre por diversas vias, incluindo a via extrínseca ativada por receptores de morte, a via intrínseca mitocondrial e a via de estresse do retículo endoplasmático. No entanto, a via mitocondrial tem emergido como a principal via apoptótica relacionada à nefrotoxicidade induzida por cisplatina (PABLA, DONG, 2008; MILLER et al., 2010; KARASAWA, STEYGER, 2015).

As células do túbulo proximal são as mais acometidas pela apoptose, por isso o uso de células deste sítio são muito utilizadas para o estudo dos mecanismos da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, seja através de culturas primárias ou utilizando linhagens celulares (PABLA, DONG, 2008).

## 1.5 Toxicogenômica

Tradicionalmente, a toxicologia utiliza testes em animais para determinar o potencial tóxico de uma entidade química para uso humano, através de *endpoints* bem estabelecidos como alterações citológicas, morfológicas, fisiológicas e metabólicas (CHEN et al., 2012). As tecnologias “ômicas” têm sido aceitas como parte essencial das metodologias para análise dos sistemas biológicos de maneira integrada, onde é possível observar mudanças globais de transcritos (transcriptômica), proteínas (proteômica) ou metabólicos (metabolômica) em sistemas celulares e ou tecidos (FUCHS, HEWITT, 2011).

Nesse contexto, a toxicogenômica é uma área relativamente nova da toxicologia que estuda as interações entre o genoma e os efeitos adversos causados por agentes exógenos como fatores de estresse ambientais, toxinas, drogas e

químicos (NORTH, VULPE, 2010; FUCHS, HEWITT, 2011). Efeitos adversos podem ser detectados mais precocemente com a análise de expressão gênica do que com os testes convencionais da toxicologia (SUTER, BABISS, WHEELDON, 2004).

Embora o principal objetivo da toxicogenômica seja a identificação dos modos de ação pelos quais xenobióticos produzem efeitos tóxicos, transcritos específicos podem ser usados como biomarcadores preditivos para alterações tóxicas órgão-específicas. Uma vez que determinados genes exibem consistentemente aumento ou diminuição na expressão em resposta a efeitos tóxicos, os mesmos podem ser utilizados como marcadores para prever potenciais efeitos adversos pré-clínicos e clínicos (FUCHS, HEWITT, 2011).

As expectativas mais otimistas prevêem que os métodos tradicionais toxicológicos serão substituídos pela toxicogenômica podendo diminuir drasticamente o tempo e os custos da avaliação de segurança de uma nova entidade química. Porém, uma visão mais realista sugere que a toxicogenômica irá ajudar a selecionar melhores compostos para desenvolvimento acelerando os testes toxicológicos e identificando biomarcadores para triagem, reduzindo, assim, as taxas de falha durante o desenvolvimento (SUTER, BABISS, WHEELDON, 2004).

O conceito de que os eventos moleculares precedem os eventos patológicos tem direcionado o desenvolvimento de ensaios toxicogenômicos rápidos para toxicidade que normalmente são realizados em ensaios de longo prazo em animais (CHEN et al., 2012). Sistemas *in vitro* para avaliação de nefrotoxicidade são importantes ferramentas para compreensão dos mecanismos de toxicidade e para o desenvolvimento de ferramentas de triagem para a predição precoce de nefrotoxicidade no processo de descoberta de novos fármacos (FUCHS, HEWITT, 2011).

Utilizando-se de microarranjos é possível analisar centenas ou milhares de genes ao mesmo tempo, permitindo a avaliação de alterações no perfil de expressão gênica induzidas por diversos compostos. No entanto, a grande quantidade de informação obtida torna um desafio a interpretação e integração dos dados (NORTH, VULPE, 2010; CHEN et al., 2012). Portanto, torna-se interessante a avaliação de um menor número de genes com potencial para utilização como biomarcadores. O RT-PCR (*Real Time-Polimerase Chain Reaction*) determina com precisão mudanças na expressão gênica e tem sido utilizado como padrão ouro (WANG et al., 2008). A classificação de xenobióticos com base em seus perfis de expressão gênica tem se

apresentado comumente na literatura, fazendo uso de cDNA e RT-PCR, especialmente em animais (ICHIMURA et al., 2004; VICKERS et al., 2004; WANG et al., 2008; VAIDYA et al., 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a linhagem renal LLC-PK1 como método alternativo ao uso de animais na avaliação da nefrotoxicidade medicamentosa utilizando cisplatina.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico da cisplatina na linhagem celular LLC-PK1.
- Analisar a expressão de genes responsivos à condição de nefrotoxicidade.
- Identificar potenciais biomarcadores precoces *in vitro*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

1. Água DEPC – Calbiochen
2. Álcool etílico absoluto – Química Moderna
3. Azul de Tripán – Vetec
4. Bicarbonato de sódio – Vetec
5. Cisplatina – Sigma
6. Cloreto de potássio – Fmaia
7. Cloreto de sódio – Fmaia
8. Clorofórmio – Fmaia
9. Dimetilsulfóxido – Synth
10. EDTA – Química Moderna
11. Fosfato de potássio monobásico – Vetec
12. Fosfato de sódio dibásico heptahidratado – Isofar
13. *illustra™ Ready-to-Go Beads™* – GE Healthcare
14. Isopropanol – JTBacker
15. Meio Essencial Mínimo (MEM) – Gibco
16. MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) – Sigma
17. Solução antibiótica antimicótica (penicilina, estreptomicina, anfotericina B) – Sigma
18. Soro fetal bovino – Gibco
19. SYBR® Green Master Mix – Applied Biosystems
20. Tripsina – Gibco
21. Trizol – Ambion

#### 3.2 Soluções

##### 3.2.1. Solução tampão fosfato-salina (PBS)

Os sais cloreto de sódio (8,0 g), cloreto de potássio (0,2 g), fosfato de sódio dibásico heptahidratado (2,17 g) e fosfato de sódio monobásico (0,2 g) foram solubilizados em água ultrapura. O pH foi ajustado entre 7,0 e 7,4 utilizando solução

diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. O volume final foi ajustado para 1000 mL. A solução final foi filtrada utilizando membrana de porosidade 0,22 µm (MILLIPORE) e armazenada sob refrigeração (2 °C a 8 °C).

### **3.2.2. Solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02%**

Dois gramas de tripsina 1:250 foram diluídos em PBS sob agitação constante e, em seguida, 0,2 g de EDTA foi adicionado e diluído. O pH foi ajustado entre 7,4 e 7,5 utilizando solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e o volume final foi ajustado para 1000 mL. A solução final foi filtrada utilizando membrana de porosidade 0,22 µm (MILLIPORE) e armazenada a -20 °C em alíquotas de 10 mL.

### **3.2.3. Meio de cultivo celular**

Um envelope de MEM (9,5 g) foi solubilizado em água ultrapura e, em seguida, foram adicionados 10 mL de solução antibiótica antimicótica e 2,2 g de bicarbonato de sódio. O pH foi ajustado para 7,0 utilizando solução diluída de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio e o volume final foi ajustado para 1000 mL. A solução final foi filtrada utilizando membrana de porosidade 0,22 µm (MILLIPORE). Foram aliqotados 480 mL deste meio em garrafa estéril e adicionado 20 mL de soro fetal bovino. A solução final foi armazenada entre 2 °C e 8 °C.

### **3.2.4. Solução de azul de tripan 0,3%**

O reagente azul de tripan (0,03 g) foi diluído em PBS, num volume final de 10 mL, e a solução final foi armazenada entre 2 °C e 8 °C.

### **3.2.5. Solução de MTT**

A solução de MTT foi preparada momentos antes do uso na proporção de 5 mg de MTT para cada 1 mL de PBS e mantida em recipiente fechado e protegido da luz.

### **3.2.6. Solução de cisplatina**

Uma massa de 1,12 mg de cisplatina foi diluída em 125 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e o volume final foi ajustado para 25 mL com PBS. A solução final foi filtrada utilizando membrana de porosidade 0,22 µm. A solução de cisplatina foi preparada momentos antes do uso e mantida em recipiente fechado e protegido da luz até o momento do uso.

As concentrações avaliadas foram obtidas adicionando diferentes volumes da solução estoque em meio de cultura MEM e completados com PBS estéril obtendo volumes finais iguais.

### **3.2.7. Solução de etanol 75%**

A solução de etanol 75% foi preparada na proporção de 750 µL de etanol absoluto para cada 250 µL de água DEPC. A solução foi preparada no momento do uso.

## **3.3 Cultivo celular**

A linhagem celular LLC-PK1 tem sido amplamente utilizada para estudos de nefrotoxicidade. Essa linhagem é composta por células do túbulo proximal do néfron de origem suína e foi adquirida do centro de recursos biológicos ATCC (ATCC® CL-101™).

A linhagem celular foi cultivada em frascos de polietileno próprio para crescimento celular de 75 cm<sup>2</sup> (SARSTEDT) em meio de cultivo MEM com 4% de soro fetal bovino, mantidas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> (Heal Force HF160W) a 37 °C.

O meio de cultivo foi substituído a cada dois ou três dias durante o crescimento celular. De acordo com a confluência da monocamada, foram realizados a troca de meio ou subcultivos (passagens). Ao atingir confluência igual ou superior a 80% na superfície da garrafa, o meio de cultura era descartado e a monocamada lavada duas vezes com PBS estéril. Após o descarte do PBS, foram adicionados 5 mL da solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% para descolamento da monocamada e individualização das células. A garrafa foi, então, incubada por 5

minutos em estufa a 37 °C, umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. As proteínas de adesão dependem de magnésio e cálcio para exercerem sua função. A tripsina age clivando as proteínas de adesão enquanto o EDTA age quelando os cátions divalentes livres (PERES, CURI, 2005).

Em seguida, foi realizada a contagem das células com a solução azul de tripan 0,3% em câmara de Neubauer, para realização dos ensaios.

### **3.4 Contagem celular pelo método de exclusão do azul de tripan**

Antes iniciar a realização dos experimentos, foi realizada a contagem de células viáveis utilizando o corante azul de tripan 0,3% em câmara de Neubauer. A formação de poros na membrana plasmática de células mortas permite a entrada do corante azul de tripan, fazendo com que a célula fique com coloração azul. Já as células viáveis são impermeáveis ao corante e são contadas em câmara de Neubauer.

Após a tripsinização, as células em suspensão foram transferidas para tubo plástico e, então, foi adicionado o mesmo volume obtido de meio de cultivo MEM. Em seguida, procedia-se a centrifugação por cinco minutos a 1500 rpm a 25 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de meio de cultivo MEM. Uma alíquota de 10 µL da suspensão celular foi adicionada em 90 µL da solução de azul de tripan 0,3%. Então, prosseguia-se a contagem das células com auxílio de câmara de Neubauer e microscópio ótico.

### **3.5 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução do MTT**

O ensaio de MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*) foi realizado baseado nos estudos de Mosmann (1983). O MTT possui coloração amarela e é metabolizado por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas dando origem a um produto de coloração roxa, o formazan. A quantidade de formazan gerado é diretamente proporcional ao número de células metabolicamente viáveis, sendo que células ativas produzem mais formazan que células em repouso.

Para realização do ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de  $5,0 \times 10^3$  células por poço contendo 180 µL de meio de

cultivo MEM. Após período de aderência, foram adicionadas diferentes concentrações de cisplatina (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15  $\mu\text{M}$ ), num volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Células não expostas ao fármaco foram utilizadas como controle negativo. Em seguida, as placas foram mantidas em estufa a 37 °C umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ , por 48 horas.

Após o período de exposição, o fármaco foi retirado e substituído por 200  $\mu\text{L}$ /poço de solução contendo meio de cultivo MEM e solução de MTT (5 mg/mL). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  por 3 horas, para metabolização do MTT. Em seguida, a solução foi removida e foi adicionado 100  $\mu\text{L}$ /poço de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi lida a 570 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices VERSAmax).

As células foram expostas às diferentes concentrações de cisplatina em sextuplicata, em três experimentos independentes. As diferenças na metabolização do MTT foram analisadas por análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **3.6 Análise de expressão gênica**

A análise de expressão gênica foi realizada através do ensaio de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real para avaliação quantitativa de RNA mensageiro transcrito para marcadores de nefrotoxicidade em células LLC-PK1. Para tanto, procedeu-se inicialmente a extração de RNA total e síntese de cDNA conforme descrito a seguir.

#### **3.6.1. Extração de RNA total**

As células LLC-PK1 foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de  $5,0 \times 10^3$  células/poço, acrescidas de 180  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo MEM e mantidas em estufa a 37 °C umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  para aderência celular. Em seguida, as concentrações de 1, 6 e 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina foram adicionadas aos poços, num volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Células não expostas à cisplatina foram utilizadas como controle negativo. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ , por 48 horas.

O fármaco foi, então, retirado e as células foram homogeneizadas em TRIzol. Duzentos microlitros de clorofórmio foram adicionados à mistura e procedeu-se a centrifugação por 15 minutos a 4°C a 12000 rpm. Após a centrifugação, a mistura apresentou-se separada em três fases distintas, sendo uma fase contendo TRIzol e clorofórmio, uma fase intermediária rica proteínas e debris celulares e uma fase superior aquosa contendo o RNA. A fase aquosa foi coletada, foi adicionado o mesmo volume obtido de isopropanol e nova centrifugação foi realizada a 12000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A centrifugação promove a precipitação do RNA total.

O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 200 µL de etanol 75% em água DEPC e realizou-se centrifugação por 5 minutos a 4 °C e 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado, o precipitado obtido foi ressuscitado em água DEPC livre de RNase e, então, foi quantificado e sua qualidade foi avaliada em NanoVue (GE).

### **3.6.2. Síntese de cDNA**

Um volume correspondente a 300 ng de RNA total foi utilizado para síntese de cDNA. A síntese foi realizada utilizando o kit illustra™ Ready-to-Go™ Beads (GE Healthcare) seguindo as recomendações do fabricante, utilizando termociclador (Applied Biosystems Veriti 96 Well).

### **3.6.3. PCR em tempo real**

Para análise de expressão gênica diferencial, foram selecionados 11 pares de oligonucleotídeos. A escolha foi baseada em levantamento bibliográfico, em que os transcritos alvos dos iniciadores apresentaram expressão diferencial durante processos indutores de nefrotoxicidade em diversos modelos *in vitro* e *in vivo*. 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).

O programa *PrimerBLAST* (NCBI) foi utilizado para obter os iniciadores baseados nas sequências dos transcritos escolhidos. Os amplificadores foram restritos a sequências entre 100 e 200 nucleotídeos. Os iniciadores *forward* e *reverse* foram escolhidos de acordo com suas posições nos genes codificadores dos transcritos,

sendo que foram escolhidos pares de iniciadores que não se encontravam no mesmo éxon. Com isso, caso houvesse contaminação de DNA genômico nas amostras seria possível detectar durante a etapa referente à curva de dissociação no PCR em tempo real.

Os alvos, oligonucleotídeos iniciadores e o número de acesso dos transcritos estão listados na Tabela 1.

**Tabela 1 – Sequência de iniciadores utilizados nos ensaios de PCR em tempo real**

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

Para a reação de PCR em tempo real, foram utilizados 5 µL de SYBR®Green Master Mix, 200 nM de cada oligonucleotídeo iniciador e 3 µL das amostras de cDNA diluídas 10 vezes, tendo como volume final 10 µL. As amostras de células não tratadas também foram analisadas na mesma placa de reação e as medições de PCR foram realizadas em triplicata. As reações de PCR foram efetuadas no equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando SYBR®Green para detecção das fitas duplas de DNA sintetizadas. As condições de amplificação utilizadas foram aquecimento a 50 °C por dois minutos, 95 °C por dez

minutos e, em seguida, 40 ciclos a 95 °C por quinze segundos e 60 °C por um minuto.

O estágio de curva de dissociação foi adicionado à reação para controle do número de alvos amplificados. A curva de dissociação representa a relação entre temperatura e quantidade de emissão de fluorescência da reação de PCR, sendo os dados coletados no intervalo entre 60 °C a 95 °C. Caso mais de um produto seja amplificado, são detectadas diferentes temperaturas de dissociação. Somente as reações que apresentaram apenas um pico na curva de dissociação foram utilizadas para análises posteriores.

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

### **3.7 Análise estatística**

Todos os dados apresentados representam experimentos em triplicata e estão expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. Os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular pelo método de redução do MTT e PCR em tempo real foram analisados através do teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.), sendo consideradas significativas as análises com  $p < 0,05$ .

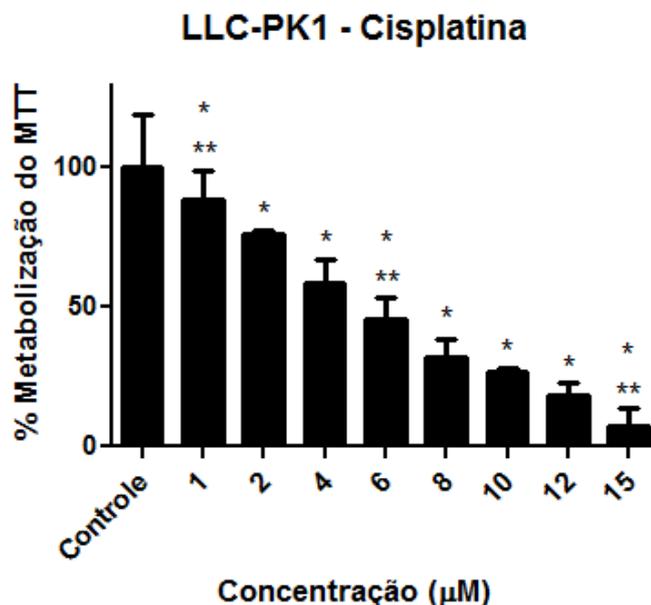
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da viabilidade celular pelo método de redução do MTT

A viabilidade das células LLC-PK1 após tratamento com cisplatina foi avaliada utilizando o método de redução do MTT. Através deste método, o efeito tóxico de determinada substância pode ser avaliado pela formação do subproduto formazan, que é derivado da metabolização do MTT por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas.

Verificou-se que a linhagem celular analisada é sensível à toxicidade da cisplatina de maneira concentração-dependente, conforme a curva concentração-resposta (**Figura 8**). Após 48 h de exposição, houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas as concentrações testadas em relação ao grupo controle e, também, entre todas as concentrações, exceto 8  $\mu\text{M}$  X 10  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  X 12  $\mu\text{M}$ . A linhagem de células LLC-PK1 é largamente utilizada para estudos de nefrotoxicidade. No entanto, existe grande discrepância na literatura entre os regimes de tratamento de cisplatina em trabalhos *in vitro* no que se refere a concentração e tempo de exposição (KAUSHAL et al., 2001; PARK, LEON, DEVARAJAN, 2002; TOWNSEND et al., 2003; IMAMDI, GRAAUW, VAN DE WATER, 2004; YANO et al., 2007). Porém, baixas concentrações, como as utilizadas no presente estudo, não foram encontradas durante a pesquisa bibliográfica no banco de dados do PubMed quando a busca foi realizada cruzando informações entre o tipo celular, o ensaio de MTT e cisplatina. A análise dos efeitos celulares após exposição a baixas concentrações torna-se muito importante, tendo em vista o objetivo de identificar potenciais biomarcadores precoces de nefrotoxicidade. Além disso, apesar da necessidade do desenvolvimento e implementação de métodos alternativos *in vitro*, a maior parte dos trabalhos com cisplatina disponíveis na literatura ainda utiliza modelos *in vivo* (WEI et al., 2007; WANG et al., 2008; EL-NAGA, 2014; NOZAKI et al., 2015).

**Figura 8 – Avaliação da metabolização do MTT**



Curva concentração-resposta da linhagem celular renal LLC-PK1. As células foram expostas a concentrações crescentes de cisplatina por 48 horas. Ensaio realizado em sextuplicata em três experimentos independentes. Controle negativo (células não tratadas) foram consideradas com 100% de viabilidade celular. (\*  $p < 0,05$ , valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle; \*\* $p < 0,05$ , valores significativamente diferentes entre si).

Tendo em vista as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas entre as concentrações analisadas, foram definidas as concentrações 1 µM, 6 µM e 15 µM para os estudos de expressão gênica.

#### **4.2 Efeito do tratamento na expressão gênica diferencial**

As células foram expostas às concentrações selecionadas de cisplatina por 48 h, seguida da extração do RNA total, síntese de cDNA e PCR em tempo real. Os genes analisados foram identificados através de pesquisa bibliográfica, após avaliação em modelos *in vitro* e *in vivo* e que demonstraram expressão diferencial mediante tratamentos nefrotóxicos. Os alvos escolhidos para análise por PCR em tempo real podem ser classificados em categorias de acordo com suas funções principais, sendo elas nefrotoxicidade, morte celular, inflamação e movimento de vesículas/secreção.

O PCR em tempo real foi utilizado para mensurar o nível relativo de expressão gênica nas células LLC-PK1 e as alterações foram representadas em

relação às células não expostas à cisplatina. Dentre os genes analisados, observou-se alteração na expressão de cinco deles. Os demais alvos apresentaram dois picos de amplificação na curva de dissociação durante o PCR em tempo real e, por isso, foram desconsiderados.

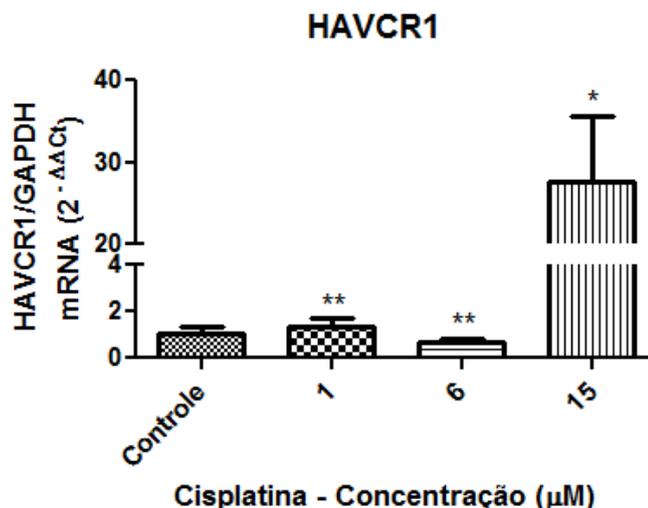
A análise de expressão gênica demonstrou que houve aumento relativo dos alvos *HAVCR1*, *BAX*, *CASP9*, *CASP3* e *ICAM-1* quando comparados ao nível de expressão dos transcritos desses mesmos genes nas células não expostas ao fármaco. Os cinco genes citados apresentaram aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração 15  $\mu\text{M}$  em relação ao grupo controle. No entanto, apesar da diminuição da viabilidade celular observada pelo método de redução do MTT, não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  em relação ao controle negativo. Esses resultados sugerem que as células LLC-PK1 não foram capazes de manter o crescimento normal após exposição à cisplatina, mesmo em baixas concentrações. É importante observar que apesar da metabolização do MTT ser diretamente proporcional ao número de células viáveis, as células ativas produzem mais formazan que células em repouso e sua formação ocorre mesmo na ausência de proliferação (MOSMANN, 1983), métodos não metabólicos são importantes para complementar os ensaio do MTT (STEPANENKO, DMITRENKO, 2015). Para melhor compreender o porquê da expressão dos genes analisados não ser afetada pelas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  é necessário que mais estudos sejam realizados para entender, também, como a cisplatina afetou o crescimento celular.

Nossos resultados mostraram que a expressão relativa do gene *HAVCR1* em células da linhagem LLC-PK1 é aumentada em, aproximadamente, 25 vezes após 48 h de exposição a 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina (**Figura 9**).

*HAVCR1* é um gene codificador de um receptor para o vírus causador da hepatite A, identificado inicialmente em macaco verde africano e, posteriormente, identificado como um gene homólogo ao gene humano *KIM-1* (*kidney injury molecule-1*), sendo um gene altamente conservado entre diversas espécies. *KIM-1* é uma proteína de membrana que contém um domínio de imunoglobulina e de mucina em sua porção extracelular. Estudos sugerem que sua função seja de um sensor ou receptor para adesão e sinalização em diversos processos que envolvem interação célula-célula ou célula-patógeno (KAPLAN *et al.*, 1996; ICHIMURA *et al.*, 1998; BONVENTRE, 2014). Ichimura *et al.* (2008) demonstraram pela primeira vez que

células epiteliais do túbulo proximal que sobreviveram a injúria e expressam KIM-1 apresentam função de fagocitose. Portanto, KIM-1 confere a células epiteliais características fagocíticas similares àquelas apresentadas por fagócitos profissionais.

**Figura 9 – Avaliação da expressão gênica de *HAVCR1***



Expressão gênica induzida por cisplatina em células LLC-PK1. Expressão relativa do gene *HAVCR1* normalizada para o gene *GAPDH*, após 48 h de exposição. Ensaio realizado em triplicata, células não tratadas foram utilizadas como controle. (\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 15  $\mu\text{M}$  e grupo controle; \*\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 1  $\mu\text{M}$  X 15  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  X 15  $\mu\text{M}$ ).

Em estudo realizado com diversos fármacos nefrotóxicos, incluindo cisplatina, verificou-se que a expressão de KIM-1 é aumentada na ocorrência de injúria renal, mas não sofre alterações significativas em diversos outros órgãos, mostrando a especificidade deste biomarcador. Além disso, na ausência de injúria renal, os níveis de KIM-1 são extremamente baixos e apenas na presença de nefrotoxicidade, seus níveis são largamente aumentados, mostrando, assim, sua sensibilidade. Quando comparado a outros biomarcadores, KIM-1 mostrou-se superior tanto em sensibilidade e especificidade, quanto em detecção precoce (VAIDYA *et al.*, 2010). WANG *et al.* (2008) analisaram um painel de genes através de PCR em tempo real após tratamento de ratos com cisplatina. Eles verificaram aumento significativo na expressão de *KIM-1* nos ratos tratados em relação aos não tratados. A presença de KIM-1 foi identificada em biópsia de túbulo proximal e na urina de pacientes com necrose tubular aguda e, em outro estudo, sua presença também foi identificada no

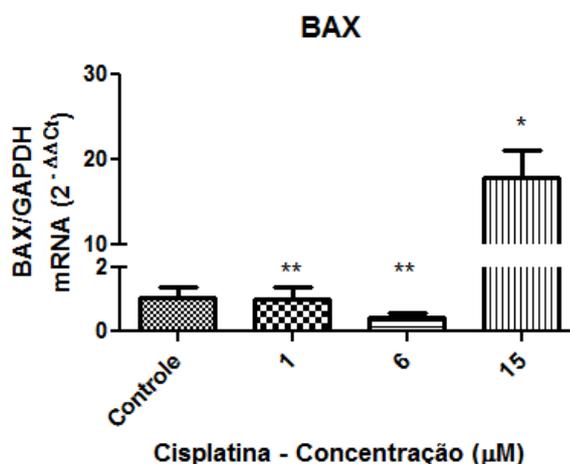
tecido renal e na urina de ratos tratados com cisplatina. Em ambos os estudos, a identificação de KIM-1 ocorreu antes da alteração de outros parâmetros urinários, como a creatinina (HAN et al., 2002; ICHIMURA et al., 2004).

Dessa maneira, observa-se que os resultados do presente estudo estão de acordo com estudos realizados em animais e, também, em humanos. O aumento na expressão relativa de *KIM-1* apresentado pelas células LLC-PK1 após exposição à cisplatina fornece evidências de que o modelo sugerido no presente estudo pode ser uma alternativa para triagem de entidades químicas ao que diz respeito à investigação do potencial nefrotóxico no túbulo proximal.

As agências FDA (*Food and Drugs Administration*) e EMA (*European Medicines Agency*) já qualificaram KIM-1 para o desenvolvimento de estudos pré-clínicos para detecção da toxicidade renal induzida por fármacos e o consideraram qualificado para tomada de decisões regulatórias em estudos clínicos de fase 1 e 2 em que ensaios pré-clínicos demonstrarem potencial nefrotóxico. Assim, o uso de KIM-1 como biomarcador de nefrotoxicidade pode ajudar a diminuir a taxa de atrito durante o desenvolvimento de drogas, bem como auxiliar na farmacovigilância de nefrotoxicidade induzida por fármacos (ICHIMURA *et al.*, 2004; VAIDYA, *et al.*, 2010; BONVENTRE, 2014). Atualmente, existe grande demanda para o desenvolvimento de metodologias *in vitro*, que auxiliem na redução do número de animais utilizados na pesquisa. Tendo em vista que KIM-1 tem se apresentado como um biomarcador específico e sensível para nefrotoxicidade e que o modelo estudado neste trabalho foi capaz de identificá-lo em nível transcricional, a continuidade dos estudos com a linhagem LLC-PK1 é fundamental para futura validação do modelo.

Dentre os genes analisados relacionados a apoptose, *BAX*, *CASP9* e *CASP3* apresentaram aumento em sua expressão após o tratamento com a maior concentração de cisplatina testada (**Figuras 10, 11 e 12**).

**Figura 10 – Avaliação da expressão gênica de *BAX***



Expressão gênica induzida por cisplatina em células LLC-PK1. Expressão relativa do gene *BAX* normalizada para o gene *GAPDH*, após 48 h de exposição. Ensaio realizado em triplicata, células não tratadas foram utilizadas como controle. (\* $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 15 µM e grupo controle; \*\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 1 µM X 15 µM e 6 µM X 15 µM).

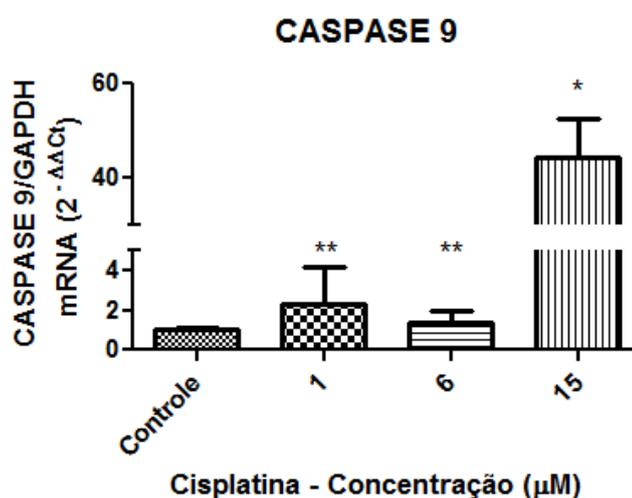
Após receber um sinal de morte, proteínas pró-apoptóticas, como Bax, sofrem modificações estruturais e alteram a integridade da membrana mitocondrial, liberando citocromo *c* para o citosol. No citosol, o citocromo *c* forma um complexo com outras proteínas, o apoptossomo, que ativa a caspase-9. Em seguida, a caspase-9 ativa a caspase-3 que, então, efetua a apoptose. A caspase-9 é uma proteína ativadora de caspase, enquanto a caspase-3 é uma proteína executora da apoptose. Após sua ativação, a caspase-3 é responsável pela clivagem de diversos substratos, incluindo enzimas de reparo de DNA, proteínas estruturais nucleares e citoesqueleto, sendo responsável pelas características morfológicas típicas da apoptose, como formação de vesículas de membrana, retração celular e fragmentação do DNA (KAUSHAL *et al.*, 2001; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; SERVAIS *et al.*, 2008).

Ratos apresentam aumento de expressão renal de Bax, caspase-3 ativada e KIM-1, além a excreção urinária de KIM-1 após exposição à cisplatina (NOZAKI *et al.*, 2015). A expressão de *BAX* inicia antes do aparecimento de danos teciduais, apoptose ou perda de função renal detectáveis em camundongos tratados com cisplatina. Camundongos nocaute para *BAX* têm a apoptose induzida por cisplatina atenuada. Concluindo que Bax tem importante papel na indução da apoptose via mitocondrial durante a nefrotoxicidade causada por cisplatina (WEI *et al.*, 2007). Estudos que expuseram a linhagem celular LLC-PK1 a diferentes regimes de

tratamento com cisplatina identificaram aumento na atividade da caspase-3 e da caspase-9 de maneira concentração-dependente. O tratamento com inibidores dessas caspases foi capaz de prevenir a apoptose (KAUSHAL et al., 2001; PARK, LEON, DEVARAJAN, 2002). Outro estudo que também avaliou a atividade de caspase-3 em células LLC-PK1, a atividade dessa caspase aumentou continuamente quando as células foram expostas a concentrações crescentes de cisplatina, no entanto, concentrações superiores 50  $\mu\text{M}$  diminuíram a atividade de caspase-3, sugerindo que a indução de apoptose é dose-dependente e que doses elevadas de cisplatina induzem necrose (LAU, 1999).

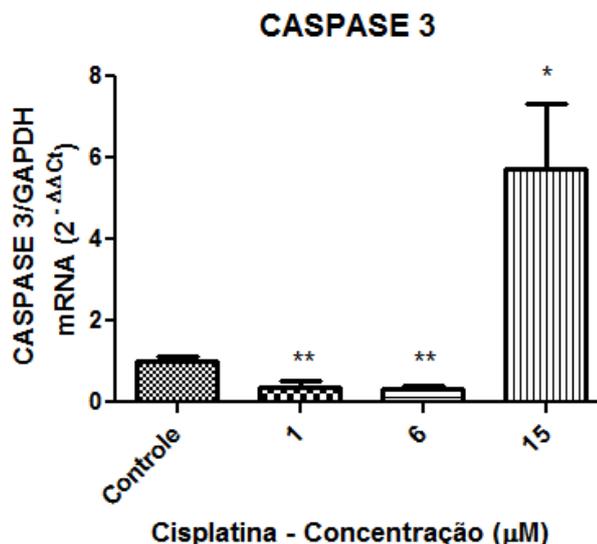
Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos supracitados mostrando que na nefrotoxicidade induzida por cisplatina a via mitocondrial tem papel fundamental na apoptose. Por serem genes expressos antes que alterações morfológicas ocorram, o modelo utilizado neste trabalho pode ser utilizado como parte dos ensaios toxicológicos alternativos *in vitro* para detecção precoce do potencial nefrotóxico durante o processo de desenvolvimento de novos fármacos.

**Figura 11 – Avaliação da expressão gênica de CASP9**



Expressão gênica induzida por cisplatina em células LLC-PK1. Expressão relativa do gene *CASP9* normalizada para o gene *GAPDH*, após 48 h de exposição. Ensaio realizado em triplicata, células não tratadas foram utilizadas como controle. (\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 15  $\mu\text{M}$  e grupo controle; \*\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 1  $\mu\text{M}$  X 15  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  X 15  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 12 – Avaliação da expressão gênica de CASP3**



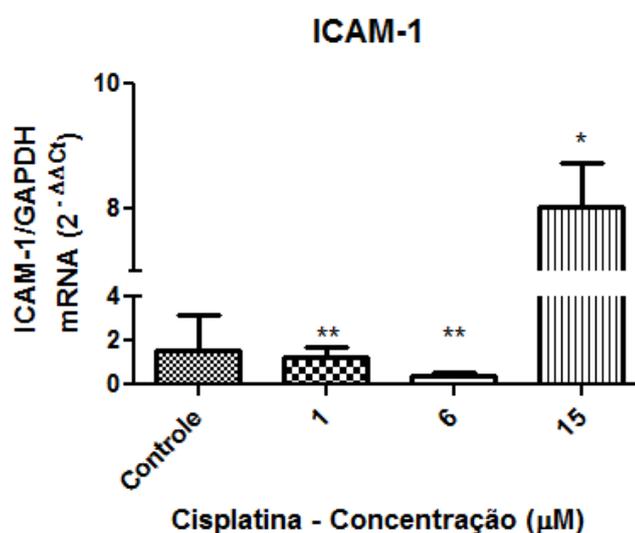
Expressão gênica induzida por cisplatina em células LLC-PK1. Expressão relativa do gene *CASP3* normalizada para o gene *GAPDH*, após 48 h de exposição. Ensaio realizado em triplicata, células não tratadas foram utilizadas como controle. (\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 15  $\mu\text{M}$  e grupo controle; \*\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 1  $\mu\text{M}$  X 15  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  X 15  $\mu\text{M}$ ).

Além disso, processos inflamatórios podem contribuir para a injúria renal ou ocorrem como uma conseqüência da injúria celular. Esses processos envolvem alterações na expressão e na função de moléculas de adesão como, por exemplo, *ICAM-1* (*intracellular adhesion molecule-1*), que é uma proteína necessária ao recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (PROZIALECK, EDWARDS, 2007). As células LLC-PK1 apresentaram aumento na expressão de *ICAM-1* após serem expostas a 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina por 48 h (**Figura 13**).

A importância de *ICAM-1*, também conhecido como CD54, na nefrotoxicidade induzida por cisplatina foi demonstrada em estudo onde ratos foram tratados com anticorpo monoclonal anti-CD54. Os níveis de expressão de *ICAM-1* nos rins desses animais foram aumentados em relação ao grupo controle. Os ratos tratados com anti-CD54 e cisplatina apresentaram níveis menores de creatinina e ureia em relação aos tratados apenas com cisplatina, além de terem sido protegidos da disfunção renal decorrente da administração de cisplatina. Esses resultados mostram o importante papel de *ICAM-1* na nefrotoxicidade induzida por cisplatina (KELLY *et al.*, 1999). A expressão de *ICAM-1* foi significativamente aumentada em rins de ratos tratados com cisplatina, tanto em níveis gênicos (RAMESH, REEVES,

2003) quanto em níveis protéicos (EL-NAGA, 2014). O aumento na expressão de *ICAM-1* apresentado pelas células LLC-PK1 em nosso trabalho está de acordo com os trabalhos apresentados, demonstrando ser uma molécula importante durante o desenvolvimento da nefrotoxicidade induzida por cisplatina e com potencial para ser utilizada como biomarcador precoce *in vitro* em ensaios pré-clínicos.

**Figura 13 – Avaliação da expressão gênica de *ICAM-1***



Expressão gênica induzida por cisplatina em células LLC-PK1. Expressão relativa do gene *ICAM-1* normalizada para o gene *GAPDH*, após 48 h de exposição. Ensaio realizado em triplicata, células não tratadas foram utilizadas como controle. (\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 15 μM e grupo controle; \*\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 1 μM X 15 μM e 6 μM X 15 μM)

## 5 CONCLUSÃO

O ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT mostrou que as células da linhagem LLC-PK1 são sensíveis aos efeitos da cisplatina, apresentando diminuição da viabilidade celular mesmo em baixas concentrações. No entanto, não houve alteração da expressão dos genes analisados quando as células foram expostas às concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  de cisplatina. É necessário que mais estudos sejam realizados para compreender como baixas concentrações de cisplatina afetaram o crescimento celular sem indução de aumento da expressão dos genes analisados na linhagem celular LLC-PK1.

A análise de expressão gênica mostrou aumento relativo de expressão para *HAVCR1 (KIM-1)*, *BAX*, *CASP9*, *CASP3* e *ICAM-1*, quando as células foram expostas a 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina. Esses resultados fornecem evidências de que esses genes são potenciais biomarcadores precoces para detecção de lesão renal, sendo necessários mais estudos para confirmar a robustez de previsibilidade dos mesmos. O aumento de expressão dos genes relacionados à apoptose, mais especificamente *BAX* e *CASP9*, confirmam que um dos mecanismos de nefrotoxicidade induzida por cisplatina é a apoptose via mitocondrial.

Trabalhos futuros são necessários para a validação de biomarcadores genômicos e da linhagem celular LLC-PK1, no entanto, nossos resultados indicam que os genes estudados são adequados para avaliação de nefrotoxicidade, auxiliando no desenvolvimento de drogas mais seguras.

## REFERÊNCIAS

ALVES, M. Ativistas resgatam cães de laboratório de testes em São Roque (SP). **Folha de S. Paulo**, São Paulo, 18 out. 2013. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2013/10/1358477-ativistas-invadem-laboratorio-em-sao-roque.shtml>>. Acesso em: 24 maio 2015.

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

BONES, V. C.; MOLENTO, C. F. M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em Foco**, v. 10, n. 1, p. 103-112, jul./dez. 2012.

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 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n.196, 09 out. 2008. Seção 1, p. 1.

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. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, jul./set. 2004.

CHEN, M.; ZHANG, M.; BORLAK, J.; TONG, W. A decade of toxicogenômica research and its contribution to toxicological science. **Toxicological Sciences**, v. 130, n. 2, p. 217-228, jul. 2012, doi: 10.1093/toxsci/ksf223.

CONCEA. Resolução Normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Brasília, DF, n. 185, 25 set. 2014. Seção 1, p. 9.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P. B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364-368, out. 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

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, jun. 2008, doi: 10.1128/AAC.01680-07.

EL-NAGA, R. N. Pre-treatment with cardamonin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: impact on NOX-1, inflammation and apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 274, n. 1, p. 87-95, jan. 2014, doi: 10.1016/j.taap.2013.10.031.

EUROPEAN COMMISSION. **Seventh Report from the Commission to the Council and the European Parliament on the Statistics on the Number of Animal used for Experimental and other Scientific Purposes in the Member States of the European Union**, 2013. COM(2013) 859 final. Disponível em: < [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/reports\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/reports_en.htm)>. Acesso em: 14 maio 2015.

FRANÇA, F. D.; FERREIRA, A. F.; LARA, R. C.; ROSSONI, J. V. Jr.; COSTA, D. C.; MORAES, K. C.; GOMES, D. A.; TAGLIATI, C. A.; CHAVES, M. M. Role of protein kinase A signaling pathway in cyclosporine nephrotoxicity. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 24, n. 6, p. 369-376, set. 2014, doi: 10.3109/15376516.2014.920447.

FUCHS, T. C.; HEWITT, P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity – an overview for applied toxicology. **The AAPS Journal** v. 13, n. 4, dez. 2011, doi: 10.1208/s12248-011-9301-x.

FUKASAWA, H.; FURUYA, R.; YASUDA, H.; YAMAMOTO, T.; HISHIDA, A.; KITAGAWA, M. Anti-cancer agent-induced nephrotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 7, p. 921-927, set. 2014.

GANONG, W. F. Função renal e micção. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia Médica**. 22. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sistema urinário. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de Histologia em Cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 443-468.

GONZALEZ, V. M.; FUERTES, M. A.; ALONSO, C.; PEREZ, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Molecular Pharmaceuticals**, v. 59, n. 4, p. 657-663, abr. 2001.

GOODSAID, F. M. Identification and measurement of genomic biomarkers of nephrotoxicity. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, n. 3, p. 183-186, maio/jun. 2004, doi: 10.1016/j.vascn.2004.02.005.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, jul./set. 2007.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

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, mar. 2002, doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x.

HARTUNG, T. From alternative methods to a new toxicology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 338-349, abr. 2011. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.12.027

ICHIMURA, T.; BONVENTRE, J. V.; BAILLY, V.; WEI, H.; HESSION, 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, n. 7, p. 4135-4142, fev. 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. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 286, n.3, p. F552-F563, mar. 2004, doi: 10.1152/ajprenal.00285.2002.

ICHIMURA, T.; ASSELDONK, E. J. P.v.; 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. **The Journal of Clinical Investigations**, v. 118, n. 5, p. 1657-1668, maio 2008. Doi: 10.1172/JCI34487.

IMAMDI, R.; GRAAUW, M.; VAN DE WATER, B. Protein Kinase C mediates cisplatin-induced loss of adherens junctions followed by apoptosis of renal proximal tubular epithelial cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 3, p. 892-903, dez. 2004, doi: 10.1124/jpet.104.072678.

KAPLAN, G.; TOTSUKA, A.; THOMPSON, P.; AKATSUKA, T.; MORISUGU, Y.; FEINSTONEL, S. M. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 16, p. 4282-4296, ago. 1996.

KARASAWA, T.; STEYGER, P. S. An integrated view of cisplatin-induced nephrotoxicity and ototoxicity. **Toxicology Letters**, v. 237, n. 3, p. 219-227, set. 2015, doi: 10.1016/j.toxlet.2015.06.012.

KAUSHAL, G. P.; KAUSHAL, V.; HONG, X.; SHAH, S. V. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin induced injury to renal tubular epithelial cells. **Kidney International**, v. 60, n. 5, p. 1726-1736, nov. 2001.

KELLY, K. J.; MEEHAN, S. M.; COLVIN, R. B. WILLIAMS JR, W. W.; BONVENTRE, J. V. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. **Kidney International**, v. 56, n. 3, p. 922-931, set. 1999.

LACY, C. F.; ARMSTRONG, L. L.; GOLDMAN, M. P.; LANCE, L. L. **Drug information handbook**. 11 ed. Ohio: Lexi-Comp Inc, 2003. 2029 p.

LAU, A. H. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. **Kidney International**, v. 56, n. 4, p. 1295-1298, out. 1999.

MILLER, R. P.; TADAGAVADI, R. K.; RAMESH, G.; REEVES, W. B. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. **Toxins**, v. 2, p. 2490-2518, oct. 2010. doi: 10.3390/toxins2112490

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, dez. 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NAUGHTON, C. A. Drug-induced nephrotoxicity. **American Family Physician**, v. 78, n. 6, p. 743-750, set. 2008.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, set. 2011.

NORTH, M.; VULPE, C. D. Functional toxicogenomics: mechanism-centered toxicology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 12, p. 4796-4813, nov. 2010, doi: 10.3390/ijms11124796.

NOZAKI, Y.; KINOSHITA, K.; HINO, S.; YANO, T.; NIKI, K.; HIROOKA, Y.; KISHIMOTO, K.; FUNAUCHI, M.; MATSUMURA, I. Signaling Rho-kinase mediates inflammation and apoptosis in T cells and renal tubules in cisplatin nephrotoxicity. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 308, n. 8, p. F899-F909, abr. 2015, doi: 10.1152/ajprenal.00362.2014.

OH, G-S.; KIM, H-J.; SHEN, A.; LEE, S. B.; KHANDKA, D.; PANDIT, A.; SO, H-S. Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies. **Electrolyte Bood Press**, v. 12, n. 2 p. 55-65, dez. 2014, doi: 10.5049/EBP.2014.12.2.55.

PABLA, N; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney International**, v. 73, n. 9, p. 994-1007, maio 2008, doi: 10.1038/sj.ki.5002786.

PARK, M. S.; LEON, M.; DEVARAJAN, P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 via activation of mitochondrial pathways. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 4, p. 858-865, abr. 2002.

PAZHAYATTIL, G. S.; SHIRALI, A. C. Drug-induced impairment of renal function. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, p. 457-468, dez. 2014.

PERES, L. A. B.; CUNHA JÚNIOR, A. D. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: mecanismos moleculares. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 4, p. 332-340, out. 2013, doi: 10.5935/0101-2800.20130052.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PROZIALECK, W. C.; EDWARDS, J. R. Cell adhesion molecules in chemically-induced injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 1, p. 74-93, abr. 2007, doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.01.001.

RAMESH, G.; REEVES, W. B. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 285, n. 4, p. F610-F618, out. 2003, doi: 10.1152/aiprenal.00101.2003.

RENAMA. **Laboratórios associados.** Disponível em: <[http://renama.org.br/?page\\_id=59](http://renama.org.br/?page_id=59)>. Acesso em: 21 ago. 2015.

RUSSEL, W.; BURCH, R. **The principles of humane experimental technique.** 1959. Disponível em: <[http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/het-toc](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc)>. Acesso em: 11 mar. 2015.

SERVAIS, H.; ORTIZ, A.; DEVUYST, O.; DENAMUR, S.; TULKENS, P. M.; MINGEOT-LECLERCQ, M.-P. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. **Apoptosis**, v. 13, n. 1, p. 11-32, jan. 2008, doi: 10.1007/s10495-007-0151-z.

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.; SJÖBERG, P.; KNUDSEN, L. E. First exposure in man: toxicological considerations. **Pharmacology & Toxicology**, v. 86, supl. I, p. 8-12, 2000.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, ago. 2015, doi: 10.1016/j.gene.2015.08.009.

SUTER, L.; BABISS, L. E.; WHELLDON, E. B. Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. **Chemistry & Biology**, v. 11, p. 161-171, fev. 2004, doi: 10.1016/j.chembiol.2004.02.003.

TIONG, H. Y.; HUANG, P.; XIONG, S.; LI, Y.; VATHSALA, A.; ZINK, D. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical *in vitro* models. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 1933-1948, jul. 2014.

TOWNSEND, D. M.; DENG, M.; ZHANG, L.; LAPUS, M. G.; HANIGAN, M. H. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 1-10, jan. 2003, doi: 10.1097/01.ASN.0000042803.28024.92.

VAIDYA, V. S.; OZER, J. S.; DIETERLE, F.; COLLINGS, F. B.; RAMIREZ, V.; TROTH, S.; MUNIAPPA, N.; THUDIUM, D.; GERHOLD, D.; HOLDER, D. J.; BOBADILHA, 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, maio 2010, doi: 10.1038/nbt.1623.

VAN DE WATER, B.; GRAAUW, M.; LE DÉVÉDEC, S.; ALDERLIESTEN, M. Cellular stress responses and molecular mechanisms of nephrotoxicity. **Toxicology Letters**, v. 162, n. 1, p. 83-93, mar. 2006, doi: 10.1016/j.toxlet.2005.10.014.

VICKERS, A. E. M.; ROSE, K.; FISHER, R.; SAULNIER, M.; SAHOTA, P.; BENTLHEY, P. Kidney slices of human and rat to characterize cisplatin-induced injury on cellular pathways and morphology. **Toxicology Pathology**, v. 32, n. 5, p. 577-590, set./out. 2004, doi: 10.1080/01926230490508821.

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, n. 2, p. 91-100, abr. 2008, doi: 10.1016/j.tox.2007.12.031.

WEI, Q.; DONG, G.; FRANKLIN, J.; DONG, Z. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. **Kidney International**, v. 72, n. 1, p. 53-62, jul. 2007, doi: 10.1038/sj.ki.5002256.

YANO, T.; ITOH, Y.; MATSUO, M.; KAWASHIRI, T.; EGASHIRA, N.; OISHI, R. Involvement of both tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced necrosis and p53-mediated caspase-dependent apoptosis in nephrotoxicity of cisplatin. **Apoptosis**, v. 12, n. 10, p. 1901-1909, out. 2007, doi: 10.1007/s10495-007-0110-8.

## APÊNDICE A – Estudo *in vitro* de potenciais biomarcadores de nefrotoxicidade por expressão gênica<sup>1</sup>

### Resumo

A nefrotoxicidade induzida por fármacos é um importante fator limitante do uso de medicamentos. Durante os ensaios toxicológicos, a nefrotoxicidade é subestimada devido a falta de preditividade dos modelos *in vivo* utilizados atualmente. Os métodos alternativos *in vitro* podem levar ao desenvolvimento de medicamentos mais seguros, podendo ser utilizados tanto na triagem de novas moléculas quanto nos ensaios pré-clínicos. Considerando que os danos moleculares e celulares precedem as alterações histopatológicas, o estudo da expressão gênica induzida por medicamentos torna-se importante na busca de biomarcadores precoces. A cisplatina é um quimioterápico amplamente utilizado na prática médica que tem na nefrotoxicidade sua maior limitação. As principais células renais atingidas pela nefrotoxicidade induzida por cisplatina são as do túbulo proximal devido a diversos fatores. No presente estudo, células LLC-PK1 foram expostas a cisplatina por 48 horas e as concentrações de 1 µM, 6 µM e 15 µM foram escolhidas após o ensaio de MTT. A expressão de genes relacionados a nefrotoxicidade foi analisada através de PCR em tempo real nas células expostas às concentrações citadas. A diminuição da viabilidade celular observada nas concentrações de 1 µM e 6 µM não foi acompanhada de alteração na expressão dos genes estudados e necessitam de mais estudos para a compreensão de como a cisplatina afetou o crescimento celular. Os genes *HAVCR1 (KIM-1)*, *BAX*, *CASP9*, *CASP3* e *ICAM-1* tiveram a expressão aumentada após exposição a 15 µM de cisplatina quando comparada a células não expostas. Nossos resultados sugerem que esses genes podem ser utilizados como biomarcadores *in vitro* de nefrotoxicidade, necessitando de mais estudos para validação dos mesmos.

Palavras-chave: nefrotoxicidade, biomarcadores, cisplatina, LLC-PK1.

---

<sup>1</sup>Manuscrito

## APÊNDICE A (continuação)

### 1. Introdução

O potencial nefrotóxico é frequentemente subestimado durante o desenvolvimento de novos fármacos (TIONG et al., 2014). Apenas 7% dos candidatos a fármacos falham devido a nefrotoxicidade, no entanto, cerca de 30% a 50% dos pacientes em unidades de terapia intensiva apresentam quadro de insuficiência renal aguda (FUCHS, HEWITT, 2011). Os modelos atuais para predição de nefrotoxicidade utilizam animais e marcadores clássicos, como creatinina e ureia, que são pouco sensíveis (VAIDYA et al., 2010).

O uso de biomarcadores de toxicidade pode melhorar significativamente o desenvolvimento de novas drogas, beneficiando o processo de descoberta de um novo fármaco desde a triagem de novas moléculas (GOODSAID, 2004). Assim, genes que consistentemente exibem alterações de expressão em resposta a efeitos tóxicos podem ser utilizados como marcadores para prever potenciais efeitos adversos. Sistemas *in vitro* para avaliação de nefrotoxicidade são importantes ferramentas para compreensão de mecanismos de ação e para desenvolvimento de processos de triagem para predição precoce de nefrotoxicidade (FUCHS, HEWITT, 2011). O conceito de que os eventos moleculares precedem os eventos patológicos tem direcionado o desenvolvimento de ensaios toxicogenômicos rápidos para toxicidade que normalmente são realizados em ensaios de longo prazo em animais (CHEN et al., 2012).

Para identificação de potenciais biomarcadores de injúria renal é fundamental o estudo de nefrotoxicantes conhecidos, como a cisplatina. A cisplatina é um quimioterápico utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer (MILLER et al., 2010; PAZHAYATTIL, SHIRALI, 2014), sendo a nefrotoxicidade um dos principais fatores limitantes do seu uso na prática clínica. Por serem mais acometidas pela nefrotoxicidade induzida por cisplatina, as células do túbulo proximal são as mais utilizadas para estudos de mecanismos (PABLA, DONG, 2008).

Neste estudo, células LLC-PK1 foram expostas a cisplatina e a expressão de diversos genes foi avaliada para identificação de potenciais biomarcadores precoces de nefrotoxicidade.

## APÊNDICE A (continuação)

### 2. Material e Métodos

#### 2.1 Linhagem celular e tratamento

Células LLC-PK1 (ATCC® CL-101™), células de túbulo proximal isoladas de rins de porco, foram adquiridas de *American Type Culture Collection*. As células foram mantidas em meio essencial mínimo (MEM; Gibco) com 4% de soro fetal bovino (Gibco) e solução antibiótica e antimicótica (penicilina, estreptomicina, anfotericina; Sigma) em estufa a 37 °C, umidificada com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 2.2 Ensaio de viabilidade celular pelo método de redução no MTT

Para o ensaio de MTT, as células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $5,0 \times 10^3$  células por poço e expostas às concentrações de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 15 µM de cisplatina (Sigma) por 48 horas. Após a exposição, o fármaco foi retirado e as células foram incubadas por 3 horas em estufa a 37 °C, umidificada com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> com 0,5 mg/mL de MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Sigma) em meio de cultura. Então, a solução foi retirada e foi adicionado 100 µL de dimetilsulfóxido (Synth) e procedeu-se a leitura de absorbância a 570 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices VERSAmax). As células foram expostas em sextuplicata para cada concentração de cisplatina em três ensaios independentes.

#### 2.3 Análise de expressão gênica por PCR em tempo real

As células foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de  $5,0 \times 10^3$  células por poço e expostas às concentrações de 0, 1, 6 e 15 µM de cisplatina por 48 horas e o RNA total foi extraído utilizando-se TRIzol (Ambion). O RNA foi convertido a cDNA utilizando kit *illustra™ Ready-to-Go Beads™* (GE Healthcare) conforme instruções do fabricante, a partir de amostra contendo 300 ng/µL de RNA. A busca pelas sequências de mRNA codificadores de proteínas previamente associados a danos renais foi realizada nos bancos de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), os iniciadores foram obtidos através do programa *PrimerBLAST* (NCBI) e estão listados na Tabela 1.

A reação de PCR em tempo real foi preparada utilizando 5 µL de SYBR®Green Master Mix (Applied Biosystems), 200 nM de cada oligonucleotídeo

## APÊNDICE A (continuação)

iniciador e 3 µL das amostras de cDNA diluídas 10 vezes. As reações de PCR foram efetuadas em equipamento StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) em triplicata nas seguintes condições de amplificação: 50 °C por dois minutos, 95 °C por dez minutos seguidos de 40 ciclos a 95 °C por quinze segundos e 60 °C por um minuto. Os dados da curva de dissociação foram coletados no intervalo entre 60 °C e 95 °C. O método comparativo do ciclo limiar foi utilizado para análise de dados de acordo com a equação  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Os dados estão apresentados como unidades de expressão relativa após normalização para o gene *GAPDH*.

**Tabela 1 – Sequência de iniciadores utilizados nos ensaios de PCR em tempo real**

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

### 2.4 Análise estatística

Todos os dados apresentados representam experimentos em triplicadas e estão expressos pela média ± desvio padrão. Os resultados foram analisados através do teste One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey utilizando o programa

## APÊNDICE A (continuação)

GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.), sendo consideradas significativas as análises com  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 Avaliação da viabilidade celular.

A viabilidade das células LLC-PK1 após tratamento com cisplatina foi avaliada utilizando o método de redução do MTT. Através deste método, o efeito tóxico de determinada substância pode ser avaliado pela formação do subproduto formazan, que é derivado da metabolização do MTT por desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente ativas.

Verificou-se que a linhagem celular analisada é sensível à toxicidade da cisplatina de maneira concentração-dependente, conforme a curva concentração-resposta (**Figura 1**). Após 48 h de exposição, houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre todas as concentrações testadas em relação ao grupo controle e, também, entre todas as concentrações, exceto 8  $\mu\text{M}$  X 10  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$  X 12  $\mu\text{M}$ .

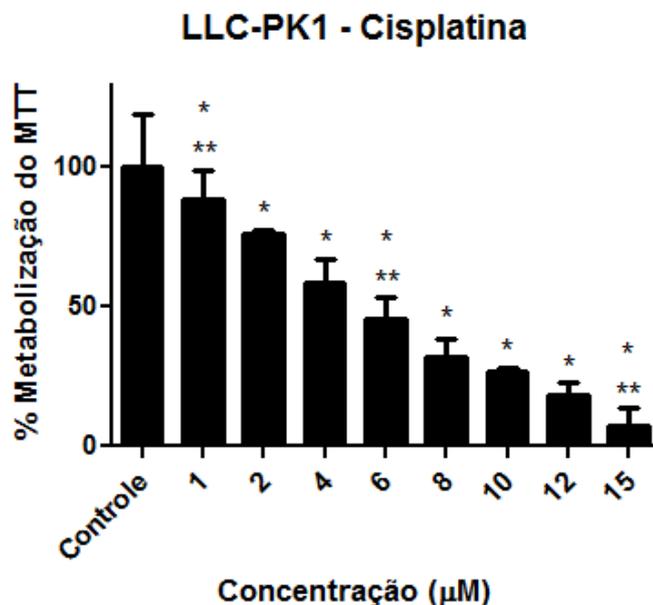
Tendo em vista as diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas entre as concentrações analisadas, foram definidas as concentrações 1  $\mu\text{M}$ , 6  $\mu\text{M}$  e 15  $\mu\text{M}$  para os estudos de expressão gênica.

#### 3.2 Efeito do tratamento na expressão gênica.

As células foram expostas às concentrações selecionadas de cisplatina por 48 h, seguida da extração do RNA total, síntese de cDNA e PCR em tempo real. Os genes analisados foram identificados através de pesquisa bibliográfica, após avaliação em modelos *in vitro* e *in vivo* e que demonstraram expressão diferencial mediante tratamentos nefrotóxicos. O PCR em tempo real foi utilizado para mensurar o nível relativo de expressão gênica nas células LLC-PK1 e as alterações foram representadas em relação às células não expostas à cisplatina. Dentre os genes analisados, observou-se alteração na expressão de cinco deles. Os demais alvos apresentaram dois picos de amplificação na curva de dissociação durante o PCR em tempo real e, por isso, foram desconsiderados.

## APÊNDICE A (continuação)

Figura 1 – Avaliação da metabolização do MTT.



Curva concentração-resposta da linhagem celular renal LLC-PK1. As células foram expostas a concentrações crescentes de cisplatina por 48 horas. Ensaio realizado em sextuplicata em três experimentos independentes. Controle negativo (células não tratadas) foram consideradas com 100% de viabilidade celular. (\*  $p < 0,05$ , valores significativamente diferentes em relação ao grupo controle; \*\* $p < 0,05$ , valores significativamente diferentes entre si).

A análise de expressão gênica demonstrou que houve aumento relativo dos alvos *HAVCR1*, *BAX*, *CASP9*, *CASP3* e *ICAM-1* quando comparados ao nível de expressão dos transcritos desses mesmos genes nas células não expostas ao fármaco. Os cinco genes citados apresentaram aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) na concentração 15 µM em relação ao grupo controle. No entanto, apesar da diminuição da viabilidade celular observada pelo método de redução do MTT, não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações de 1 µM e 6 µM em relação ao controle negativo (**Figura 2**).

#### 4. Discussão

A linhagem de células LLC-PK1 é largamente utilizada para estudos de nefrotoxicidade. No entanto, existe grande discrepância na literatura entre os regimes de tratamento de cisplatina em trabalhos *in vitro* no que se refere a

## APÊNDICE A (continuação)

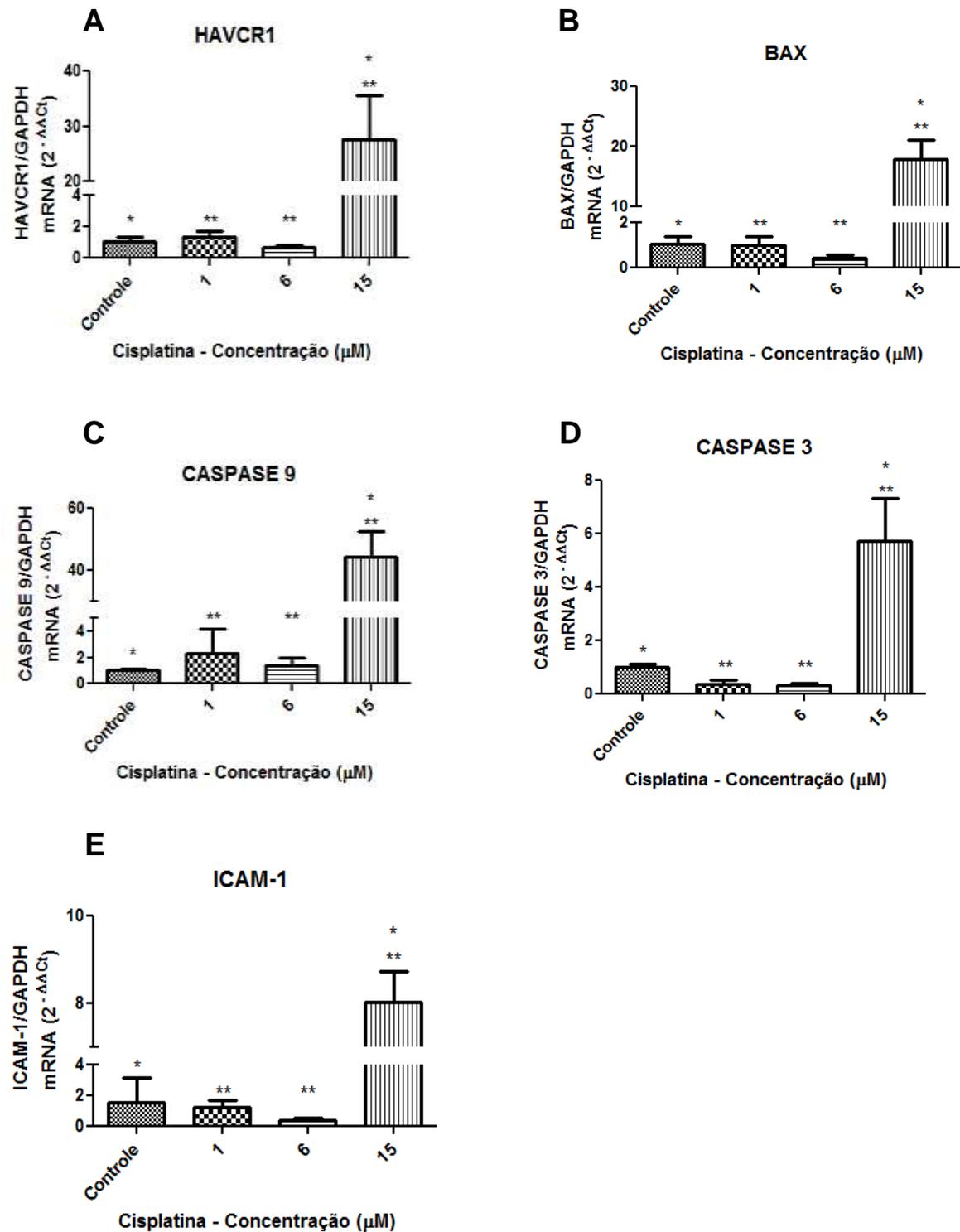
concentração e tempo de exposição (KAUSHAL et al., 2001; PARK, LEON, DEVARAJAN, 2002; TOWNSEND et al., 2003; IMAMDI, GRAAUW, VAN DE WATER, 2004; YANO et al., 2007). Porém, baixas concentrações, como as utilizadas no presente estudo, não foram encontradas durante a pesquisa bibliográfica no banco de dados do PubMed quando a busca foi realizada cruzando informações entre o tipo celular, o ensaio de MTT e cisplatina. A análise dos efeitos celulares após exposição a baixas concentrações torna-se muito importante, tendo em vista o objetivo de identificar potenciais biomarcadores precoces de nefrotoxicidade. Além disso, apesar da necessidade do desenvolvimento e implementação de métodos alternativos *in vitro*, a maior parte dos trabalhos com cisplatina disponíveis na literatura ainda utiliza modelos *in vivo* (WEI et al., 2007; WANG et al., 2008; EL-NAGA, 2014; NOZAKI et al., 2015).

As células LLC-PK1 não foram capazes de manter o crescimento normal após exposição à cisplatina. No entanto, a expressão dos genes avaliados não foi alterada após exposição às concentrações de 1 e 6  $\mu\text{M}$ . A metabolização do MTT é diretamente proporcional ao número de células viáveis, mas células ativas produzem mais formazan que células em repouso e sua formação ocorre mesmo na ausência de proliferação (MOSMANN, 1983), métodos não metabólicos são importantes para complementar os ensaios do MTT (STEPANENKO, DMITRENKO, 2015). Para melhor compreender o porquê da expressão dos genes analisados não ser afetada pelas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  é necessário que mais estudos sejam realizados para entender, também, como a cisplatina afetou o crescimento celular.

*HAVCR1* é um gene codificador de um receptor para o vírus causador da hepatite A, identificado inicialmente em macaco verde africano e, posteriormente, identificado como um gene homólogo ao gene humano *KIM-1* (*kidney injury molecule-1*), sendo um gene altamente conservado entre diversas espécies. *KIM-1* é uma proteína de membrana que contém um domínio de imunoglobulina e de mucina em sua porção extracelular. Estudos sugerem que sua função seja de um sensor ou receptor para adesão e sinalização em diversos processos que envolvem interação célula-célula ou célula-patógeno (KAPLAN et al., 1996; ICHIMURA et al., 1998; BONVENTRE, 2014), e confere a células epiteliais características fagocíticas similares àquelas apresentadas por fagócitos profissionais (ICHIMURA et al., 2008).

## APÊNDICE A (continuação)

Figura 2 – Avaliação da expressão gênica



Expressão gênica induzida por cisplatina em células LLC-PK1. Expressão relativa dos genes *HAVCR1* (A), *BAX* (B), *CASPASE9* (C), *CASPASE3* (D) e *ICAM-1* (E) normalizada para o gene *GAPDH*, após 48 h de exposição. Ensaio realizado em triplicata, células não tratadas foram utilizadas como controle. (\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 15  $\mu\text{M}$  e grupo controle; \*\*  $p < 0,05$ , valores estatisticamente significativos entre 1  $\mu\text{M}$  X 15  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  X 15  $\mu\text{M}$ )

## APÊNDICE A (continuação)

Após exposição a 15  $\mu$ M de cisplatina, a expressão dos genes *HAVCR1*, *BAX*, *CASP9*, *CASP3* e *ICAM-1* foi aumentada.

Em estudo realizado com diversos fármacos nefrotóxicos, incluindo cisplatina, verificou-se que KIM-1 é altamente sensível e específico para injúria renal. Quando comparado a outros biomarcadores, KIM-1 mostrou-se superior tanto em sensibilidade e especificidade, quanto em detecção precoce (VAIDYA *et al.*, 2010). WANG *et al.* (2008) analisaram um painel de genes através de PCR em tempo real após tratamento de ratos com cisplatina e verificaram aumento significativo na expressão de *KIM-1* nos ratos tratados em relação aos não tratados. A presença de KIM-1 também foi identificada em biópsia de túbulo proximal e na urina de pacientes com necrose tubular aguda e, em outro estudo, sua presença foi identificada no tecido renal e na urina de ratos tratados com cisplatina. Em ambos os estudos, a identificação de KIM-1 ocorreu antes da alteração de outros parâmetros urinários, como a creatinina (HAN *et al.*, 2002; ICHIMURA *et al.*, 2004). Dessa maneira, observa-se que nossos resultados estão de acordo com estudos realizados em animais e, também, em humanos. O aumento na expressão relativa de *KIM-1* apresentado pelas células LLC-PK1 após exposição à cisplatina fornece evidências de que o modelo sugerido no presente estudo pode ser uma alternativa para triagem de entidades químicas ao que diz respeito à investigação do potencial nefrotóxico. Atualmente, existe grande demanda para o desenvolvimento de metodologias *in vitro*, que auxiliem na redução do número de animais utilizados na pesquisa. Tendo em vista que KIM-1 tem se apresentado como um biomarcador específico e sensível para nefrotoxicidade e que o modelo estudado neste trabalho foi capaz de identificá-lo em nível transcricional, a continuidade dos estudos com a linhagem LLC-PK1 é fundamental para futura validação do modelo.

Dentre os genes analisados, *BAX*, *CASP9* e *CASP3*, estão relacionados a apoptose. Após receber um sinal de morte, proteínas pró-apoptóticas, como Bax, sofrem modificações estruturais e alteram a integridade da membrana mitocondrial, liberando citocromo *c* para o citosol. No citosol, o citocromo *c* forma um complexo com outras proteínas, o apoptossomo, que ativa a caspase-9. Em seguida, a caspase-9 ativa a caspase-3 que, então, efetua a apoptose. A caspase-9 é uma proteína ativadora de caspase, enquanto a caspase-3 é uma proteína executora da

## APÊNDICE A (continuação)

apoptose. Após sua ativação, a caspase-3 é responsável pela clivagem de diversos substratos, incluindo enzimas de reparo de DNA, proteínas estruturais nucleares e citoesqueleto, sendo responsável pelas características morfológicas típicas da apoptose, como formação de vesículas de membrana, retração celular e fragmentação do DNA (KAUSHAL *et al.*, 2001; GRIVICICH, REGNER, ROCHA, 2007; SERVAIS *et al.*, 2008).

Ratos apresentam aumento de expressão renal de Bax, caspase-3 ativada e KIM-1, além a excreção urinária de KIM-1 após exposição à cisplatina (NOZAKI *et al.*, 2015). A expressão de *BAX* inicia antes do aparecimento de danos teciduais, apoptose ou perda de função renal detectáveis em camundongos tratados com cisplatina. Camundongos nocaute para *BAX* têm a apoptose induzida por cisplatina atenuada. Concluindo que Bax tem importante papel na indução da apoptose via mitocondrial durante a nefrotoxicidade causada por cisplatina (WEI *et al.*, 2007). Estudos que expuseram a linhagem celular LLC-PK1 a diferentes regimes de tratamento com cisplatina identificaram aumento na atividade da caspase-3 e da caspase-9 de maneira concentração-dependente. O tratamento com inibidores dessas caspases foi capaz de prevenir a apoptose (KAUSHAL *et al.*, 2001; PARK, LEON, DEVARAJAN, 2002). Nossos resultados estão de acordo com os trabalhos supracitados mostrando que na nefrotoxicidade induzida por cisplatina a via mitocondrial tem papel fundamental na apoptose. Por serem genes expressos antes que alterações morfológicas ocorram, o modelo utilizado neste estudo pode ser utilizado como parte dos ensaios toxicológicos alternativos *in vitro* para detecção precoce do potencial nefrotóxico durante o processo de desenvolvimento de novos fármacos.

Além disso, processos inflamatórios podem contribuir para a injúria renal ou ocorrerem como uma consequência da injúria celular. Esses processos envolvem alterações na expressão e na função de moléculas de adesão como, por exemplo, ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*), que é uma proteína necessária ao recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório (PROZIALECK, EDWARDS, 2007). A importância de ICAM-1, também conhecido como CD54, na nefrotoxicidade induzida por cisplatina foi demonstrada em estudo onde ratos foram tratados com anticorpo monoclonal anti-CD54. Os níveis de expressão de *ICAM-1* nos rins desses

## APÊNDICE A (continuação)

animais foram aumentados em relação ao grupo controle. Os ratos tratados com anti-CD54 e cisplatina apresentaram níveis menores de creatinina e ureia em relação aos tratados apenas com cisplatina, além de terem sido protegidos da disfunção renal decorrente da administração de cisplatina. Esses resultados mostram o importante papel de ICAM-1 na nefrotoxicidade induzida por cisplatina (KELLY *et al.*, 1999). A expressão de ICAM-1 foi significativamente aumentada em rins de ratos tratados com cisplatina, tanto em níveis gênicos (RAMESH, REEVES, 2003) quanto em níveis protéicos (EL-NAGA, 2014). O aumento na expressão de *ICAM-1* apresentado pelas células LLC-PK1 em nosso trabalho está de acordo com os trabalhos apresentados, demonstrando ser uma molécula importante durante o desenvolvimento da nefrotoxicidade induzida por cisplatina e com potencial para ser utilizada como biomarcador precoce *in vitro* em ensaios pré-clínicos.

### 5. Conclusão

Novos biomarcadores precoces de nefrotoxicidade são essenciais para diminuição da taxa de atrito apresentada no desenvolvimento de fármacos. Os métodos alternativos *in vitro* têm se mostrado uma ótima opção para a triagem de novas entidades químicas, auxiliando na diminuição de custos e tempo para a indústria farmacêutica.

O ensaio de viabilidade celular pela redução do MTT mostrou que as células da linhagem LLC-PK1 são sensíveis aos efeitos da cisplatina, apresentando diminuição da viabilidade celular mesmo em baixas concentrações. No entanto, a falta de alteração da expressão dos genes analisados quando as células foram expostas às concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 6  $\mu\text{M}$  de cisplatina torna necessário que mais estudos sejam realizados para compreender como baixas concentrações de cisplatina afetaram o crescimento celular sem indução de aumento da expressão dos genes analisados na linhagem celular LLC-PK1.

A análise de expressão gênica mostrou aumento relativo de expressão para *HAVCR1 (KIM-1)*, *BAX*, *CASP9*, *CASP3* e *ICAM-1*, quando as células foram expostas a 15  $\mu\text{M}$  de cisplatina. Esses resultados fornecem evidências de que esses genes são potenciais biomarcadores precoces para detecção de lesão renal, sendo

## APÊNDICE A (continuação)

necessários mais estudos para confirmar a robustez de previsibilidade dos mesmos. O aumento de expressão dos genes relacionados à apoptose, mais especificamente *BAX* e *CASP9*, confirmam que um dos mecanismos de nefrotoxicidade induzida por cisplatina é a apoptose via mitocondrial.

Trabalhos futuros são necessários para a validação de biomarcadores genômicos e da linhagem celular LLC-PK1, no entanto, nossos resultados indicam que os genes estudados são adequados para avaliação de nefrotoxicidade, auxiliando no desenvolvimento de drogas mais seguras.

### Referências

BONVENTRE, J. V. Kidney injury molecule-1: a translational journey. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, v. 125, p. 293-299, 2014.

CHEN, M.; ZHANG, M.; BORLAK, J.; TONG, W. A decade of toxicogenômica research and its contribution to toxicological science. **Toxicological Sciences**, v. 130, n. 2, p. 217-228, jul. 2012, doi: 10.1093/toxsci/ksf223.

EL-NAGA, R. N. Pre-treatment with cardamonin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: impact on NOX-1, inflammation and apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 274, n. 1, p. 87-95, jan. 2014, doi: 10.1016/j.taap.2013.10.031.

FUCHS, T. C.; HEWITT, P. Biomarkers for drug-induced renal damage and nephrotoxicity – an overview for applied toxicology. **The AAPS Journal** v. 13, n. 4, dez. 2011, doi: 10.1208/s12248-011-9301-x.

GOODSAID, F. M. Identification and measurement of genomic biomarkers of nephrotoxicity. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 49, n. 3, p. 183-186, maio/jun. 2004, doi: 10.1016/j.vascn.2004.02.005.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, jul./set. 2007.

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, mar. 2002, doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00433.x.

ICHIMURA, T.; BONVENTRE, J. V.; BAILLY, V.; WEI, H.; HESSION, C. A.; CATE, R. L.; SANICOLA, M. Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell

**APÊNDICE A** (continuação)

adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 4135-4142, fev. 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. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 286, n.3, p. F552-F563, mar. 2004, doi: 10.1152/ajprenal.00285.2002.

ICHIMURA, T.; ASSELDONK, E. J. P.v.; 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. **The Journal of Clinical Investigations**, v. 118, n. 5, p. 1657-1668, maio 2008. doi: 10.1172/JCI34487.

IMAMDI, R.; GRAAUW, M.; VAN DE WATER, B. Protein Kinase C mediates cisplatin-induced loss of adherens junctions followed by apoptosis of renal proximal tubular epithelial cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 311, n. 3, p. 892-903, dez. 2004, doi: 10.1124/jpet.104.072678.

KAPLAN, G.; TOTSUKA, A.; THOMPSON, P.; AKATSUKA, T.; MORISUGU, Y.; FEINSTONEL, S. M. Identification of a surface glycoprotein on African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 16, p. 4282-4296, ago. 1996.

KAUSHAL, G. P.; KAUSHAL, V.; HONG, X.; SHAH, S. V. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin induced injury to renal tubular epithelial cells. **Kidney International**, v. 60, n. 5, p. 1726-1736, nov. 2001.

KELLY, K. J.; MEEHAN, S. M.; COLVIN, R. B. WILLIAMS JR, W. W.; BONVENTRE, J. V. Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. **Kidney International**, v. 56, n. 3, p. 922-931, set. 1999.

MILLER, R. P.; TADAGAVADI, R. K.; RAMESH, G.; REEVES, W. B. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. **Toxins**, v. 2, p. 2490-2518, oct. 2010. doi: 10.3390/toxins2112490

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1, p. 55-63, dez. 1983. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NOZAKI, Y.; KINOSHITA, K.; HINO, S.; YANO, T.; NIKI, K.; HIROOKA, Y.; KISHIMOTO, K.; FUNAUCHI, M.; MATSUMURA, I. Signaling Rho-kinase mediates inflammation and apoptosis in T cells and renal tubules in cisplatin nephrotoxicity. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 308, n. 8, p. F899-F909, abr. 2015, doi: 10.1152/ajprenal.00362.2014.

**APÊNDICE A** (continuação)

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney International**, v. 73, n. 9, p. 994-1007, maio 2008, doi: 10.1038/sj.ki.5002786.

PARK, M. S.; LEON, M.; DEVARAJAN, P. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 via activation of mitochondrial pathways. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 13, n. 4, p. 858-865, abr. 2002.

PAZHAYATTIL, G. S.; SHIRALI, A. C. Drug-induced impairment of renal function. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, p. 457-468, dez. 2014.

PROZIALECK, W. C.; EDWARDS, J. R. Cell adhesion molecules in chemically-induced injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 1, p. 74-93, abr. 2007, doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.01.001.

RAMESH, G.; REEVES, W. B. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 285, n. 4, p. F610-F618, out. 2003, doi: 10.1152/ajprenal.00101.2003.

SERVAIS, H.; ORTIZ, A.; DEVUYST, O.; DENAMUR, S.; TULKENS, P. M.; MINGEOT-LECLERCQ, M.-P. Renal cell apoptosis induced by nephrotoxic drugs: cellular and molecular mechanisms and potential approaches to modulation. **Apoptosis**, v. 13, n. 1, p. 11-32, jan. 2008, doi: 10.1007/s10495-007-0151-z.

STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, ago. 2015, doi: 10.1016/j.gene.2015.08.009.

TIONG, H. Y.; HUANG, P.; XIONG, S.; LI, Y.; VATHSALA, A.; ZINK, D. Drug-induced nephrotoxicity: clinical impact and preclinical *in vitro* models. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 1933-1948, jul. 2014.

TOWNSEND, D. M.; DENG, M.; ZHANG, L.; LAPUS, M. G.; HANIGAN, M. H. Metabolism of cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 1-10, jan. 2003, doi: 10.1097/01.ASN.0000042803.28024.92.

VAIDYA, V. S.; OZER, J. S.; DIETERLE, F.; COLLINGS, F. B.; RAMIREZ, V.; TROTH, S.; MUNIAPPA, N.; THUDIUM, D.; GERHOLD, D.; HOLDER, D. J.; BOBADILHA, 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, maio 2010, doi: 10.1038/nbt.1623.

**APÊNDICE A** (conclusão)

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, n. 2, p. 91-100, abr. 2008, doi: 10.1016/j.tox.2007.12.031.

WEI, Q.; DONG, G.; FRANKLIN, J.; DONG, Z. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. **Kidney International**, v. 72, n. 1, p. 53-62, jul. 2007, doi: 10.1038/sj.ki.5002256.

YANO, T.; ITOH, Y.; MATSUO, M.; KAWASHIRI, T.; EGASHIRA, N.; OISHI, R. Involvement of both tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced necrosis and p53-mediated caspase-dependent apoptosis in nephrotoxicity of cisplatin. **Apoptosis**, v. 12, n. 10, p. 1901-1909, out. 2007, doi: 10.1007/s10495-007-0110-8.