

FLÁVIA DAYRELL FRANÇA

**AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS VERO E MDCK  
NA SINALIZAÇÃO CELULAR E COMO ALTERNATIVAS PARA ESTUDO DA  
NEFROTOXICIDADE UTILIZANDO ANFOTERICINA B.**

**Belo Horizonte**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**2008**  
**FLÁVIA DAYRELL FRANÇA**

**AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS VERO E MDCK**  
**NA SINALIZAÇÃO CELULAR E COMO ALTERNATIVAS PARA ESTUDO DA**  
**NEFROTOXICIDADE UTILIZANDO ANFOTERICINA B.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr Carlos Alberto Tagliati.

Co-orientadora: Profa. Dra. Miriam Martins Chaves.

Belo Horizonte

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

2008

F814a

França, Flávia Dayrell

Avaliação das linhagens VERO e MDCK na sinalização celular e como alternativas para estudo da nefrotoxicidade utilizando anfotericina B / Flávia Dayrell França. – 2008.

83f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Tagliati.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Miriam Martins Chaves.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Anfotericina B – Teses. 2. Drogas – Toxicologia – Teses. 2. Medicamentos – Efeitos colaterais – Teses. 3. Nefrotoxicologia – Teses. 4. Toxicologia – Teses. I. Título. II. Tagliati, Carlos Alberto. III. Universidade Federal de

Minas Gerais. Faculdade de Farmácia.

CDD: 615.9

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais retorna ao seu tamanho original”.*

Albert Einstein.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus e minha mãe Laura, por me iluminarem sempre.

Aos professores Carlos Alberto Tagliati e Míriam Martins Chaves, pela oportunidade, orientação, apoio, confiança e amizade. Meus sinceros agradecimentos pelos ensinamentos e obrigada por estarem sempre disponíveis a ajudar.

Ao meu pai, pelo incentivo, apoio e confiança.

A minhas irmãs, Márcia e Aline, presenças indispensáveis em minha vida, por sempre me ouvir e apoiar e aos meus cunhados e sobrinhos: amo vocês!!

Aos meus tios e padrinhos, Lúgia e Leandro, seus filhos Luciana, Carminha, Fred, Dedeza e Ana: obrigada pela confiança e incentivo sempre!

A Profa. Zélia Maria Inês Lobato pelos ensinamentos sobre cultivo celular.

Ao Prof. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo pela disponibilidade de utilizar o leitor de ELISA.

Ao meu amigo tão especial Guilherme “em cujas opiniões eu sou viciada”, por me acompanhar e ajudar em todos os momentos.

Aos amigos Fabiana, Luciene, Clau, Pity, Márcia, Lets, Ana Paula, Thiago “Bozó”, Tiago Pires, Kika, Karine Roza, Karine Vale “Tiryn” e Vivi pelos momentos de descontração e incentivo.

Aos amigos do laboratório de Vírus da Faculdade de Veterinária, em especial a Grazielle, Fábria e Doraci.

Aos funcionários do LATO da Faculdade de Farmácia.

Aos amigos do laboratório de Bioquímica e Imunologia: Araci, Bárbara, Carol, Mariana, Gláucia, Sandra, Lucinara, Gil, Marcela, Raquel e Débora pela alegre convivência e incentivo.

À FAPEMIG pela concessão de bolsa de pesquisa.

E a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.





## RESUMO

Devido à grande pressão da sociedade e da comunidade científica para reduzir, refinar e substituir (3R's) o uso de animais em testes de toxicidade, métodos alternativos (*in vitro*) estão sendo desenvolvidos e aceitos por instituições em diversos países. Atualmente, há grande disponibilidade de linhagens em banco de células e as técnicas de cultivo celular são os métodos *in vitro* mais largamente empregados em Farmacologia e Toxicologia, pois o desenvolvimento de fármacos e as investigações toxicológicas começam a partir desses estudos. A nefrotoxicidade é um dos principais efeitos tóxicos do uso de medicamentos, o que torna fundamental a identificação precoce dos mesmos. Nesse contexto, o uso de células e de fármacos comprovadamente nefrotóxicos são importantes para a validação de métodos capazes de estudar esse efeito. A Anfotericina B é um agente antifúngico amplamente utilizado para tratar infecções fúngicas sistêmicas, entretanto a nefrotoxicidade é comum aos seus usuários. Alguns estudos sugerem que a Anfotericina B exerce seu efeito tóxico via fosforilação da proteína cinase C (PKC), uma importante proteína envolvida na sinalização celular. Assim, o objetivo geral do nosso estudo foi avaliar o emprego das linhagens celulares renais VERO (macaco) e MDCK (cão) em estudos de nefrotoxicidade utilizando Anfotericina B. As duas linhagens foram expostas a oito diferentes concentrações desse fármaco (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 µg/mL) por 1, 6, 18, 24 e 48 horas e o método empregado para avaliar a citotoxicidade foi o Vermelho Neutro, um corante que avalia a integridade lisossomal. Ambas apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular após exposição às concentrações de 15, 20 e 30 µg/mL nos cinco tempos avaliados. Com 1 e 6 horas de exposição nenhuma das duas linhagens apresentaram diferenças significativas entre as três concentrações. Entretanto, com 18, 24 e 48 horas essas concentrações apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Dessa maneira, a linhagem MDCK apresentou um perfil distinto da linhagem VERO. Além disso, com apenas uma hora de exposição ao fármaco nas duas linhagens se conseguiu prever a toxicidade ocorrida nos tempos posteriores. No estudo da sinalização celular via PKC as duas linhagens foram expostas à Anfotericina B (30 µg/mL) por 1 e 18 horas. Ambas possuem a via de sinalização PKC, mas na linhagem VERO a Anfotericina B preferencialmente não utilizou essa via para exercer o seu efeito citotóxico. Na MDCK a inibição da via PKC potencializou o efeito citotóxico da Anfotericina B. Portanto, os nossos resultados mostraram que as duas linhagens foram eficientes para o estudo da nefrotoxicidade ocasionada pela Anfotericina B, além dessas

linhagens serem eficazes para estudos de sinalização celular, como foi demonstrado pela potencialização do efeito citotóxico da Anfotericina B pela via de sinalização de PKC.

Palavras - chave: Anfotericina B, nefrotoxicidade, proteína cinase C (PKC), VERO e MDCK.

### **ABSTRACT**

Due to intense pressure from society and scientific communities to reduce, refine and replace (3R's) the use of animals in toxicity tests, alternative methods (*in vitro*) have been developed and recognized by various institutions worldwide. Cell lines are now widely available in cell banks and cellular cultivating techniques have become the most used *in vitro* methods within the fields of pharmacology and toxicology for their enormous research potential. One of the main toxic effects of medicines is nephrotoxicity and this is why the use of nephrotoxic cells and drugs is of crucial importance to validate methods which enable the study of toxic effects. Amphotericin B is an antifungus agent widely used to treat systemic fungus infections; however, nephrotoxicity is a common side-effect. Some studies have suggested that Amphotericin B exerts its toxic effect by means of the phosphorylation of Protein kinase C (PKC), an important protein involved in cellular signaling. The primary objective of our study is to use two different renal cell lines – VERO (monkey) and MDCK (dog) – to study nephrotoxicity caused by Amphotericin B. Both lines were exposed to eight different concentrations of this drug (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, and 30 µg/mL) for 1, 6, 18, 24 and 48 hours with Red Neutral in order to determine cytotoxicity, a dye that evaluates lysosomal integrity. They both presented a significant reduction ( $p < 0.05$ ) of cellular viability after exposure to concentrations of 15, 20 and 30 µg/mL in all five rounds of the test. No fundamental difference was found between the three doses when the two lines were exposed for both one and 6 hours. By contrast, the doses presented significant difference ( $p < 0.05$ ) after 18, 24 and 48-hour-exposures. In other words, the MDCK and the VERO lines showed different profiles. More importantly, for both lines, toxicity in the sequent time-spans could be predicted after only one hour of exposure to the drug. In order to examine cellular signaling by PKC, both lines were exposed to Amphotericin B (30 µg/mL) for one and 18 hours. The PKC signaling pathway was observed in both lines. However, in the VERO line, Amphotericin B did not use it as the main pathway to exert its cytotoxic effect. In the MDCK, the inhibition of the PKC pathway increased the cytotoxic effect of the Amphotericin B. In

short, our findings demonstrated that both lines were effective for studying nephrotoxicity caused by Amphotericin B. They also proved adequate for investigating cellular signaling, given that we could enhance the cytotoxic effect of Amphotericin B by inhibiting the PKC signaling pathway.

Key words: Amphotericin B, nephrotoxicity, protein Kinase C (PKC), VERO and MDCK.

### **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP = trifosfato de adenosina

CTIT = Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica

DAG = Diacilglicerol

DMSO = Dimetilsulfóxido

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

FDA = *Food and Drug Administration*

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

INVITTOXX = *In Vitro Techniques in Toxicology*

IP<sub>3</sub> = inositol 1,4,5 - trifosfato

INPI = Instituto Nacional da Propriedade Industrial

IP<sub>3</sub>R = receptor de IP<sub>3</sub>

ISO = *International Standardization Organization*

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

MEM = Meio Eagle mínimo essencial

nm = nanômetro

N = Normal

OECD = *Organisation for Economic Cooperation and Development*

PBS = solução salina tamponada sem cálcio e magnésio

PIP<sub>2</sub> = fosfatidilinositol 4,5 - bifosfato

PKC = proteína cinase C

PLC = Fosfolipase C

ROS = espécies reativas de oxigênio

Vermelho Neutro = 2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina

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

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** O papel dos estudos *in vitro* em Farmacologia e Toxicologia..... 19

<b>Figura 2:</b> Estrutura química da Anfotericina B.....	20
<b>Figura 3:</b> Modelo molecular de ligação da Anfotericina B ao colesterol.....	21
<b>Figura 4:</b> Visão lateral do canal Anfotericina B/Colesterol.....	22
<b>Figura 5:</b> Ativação da proteína cinase C via proteína G.....	26
<b>Figura 6:</b> Avaliação comparativa de três concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30 µg/mL) nos cinco tempos (1, 6, 18, 24 e 48 horas) na linhagem celular VERO utilizando Vermelho Neutro.....	42
<b>Figura 7:</b> Avaliação comparativa de três concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30 µg/mL) nos cinco tempos (1, 6, 18, 24 e 48 horas) na linhagem celular MDCK utilizando Vermelho Neutro.....	47
<b>Figura 8:</b> Estudo da via de sinalização celular de PKC na linhagem celular VERO através da incubação com a substância X.....	52
<b>Figura 9:</b> Estudo da via de sinalização celular de PKC na linhagem celular MDCK através da incubação com a substância X.....	55
<b>Figura 10:</b> Estudo comparativo das linhagens celulares VERO e MDCK: avaliação da via de sinalização celular de PKC.....	56



## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1:** Avaliação do efeito citotóxico da Anfotericina B nas células da linhagem VERO: estudo da viabilidade celular utilizando Vermelho Neutro....40

**Gráfico 2:** Avaliação do efeito citotóxico da Anfotericina B nas células da linhagem MDCK: estudo da viabilidade celular utilizando Vermelho Neutro....45



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Estudo cinético do efeito citotóxico da Anfotericina B nas células da linhagem VERO utilizando Vermelho Neutro.....39
- Tabela 2:** Estudo cinético do efeito citotóxico da Anfotericina B nas células da linhagem MDCK utilizando Vermelho Neutro.....44
- Tabela 3:** Comparação do efeito citotóxico das três concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30 µg/mL) entre as linhagens celulares VERO e MDCK utilizando Vermelho Neutro.....48
- Tabela 4:** Estudo comparativo da via de sinalização celular de PKC da linhagem VERO incubada em presença ou ausência da Anfotericina B nos tempos de 1 e 18 horas.....51
- Tabela 5:** Estudo comparativo da via de sinalização celular de PKC da linhagem MDCK incubada em presença ou ausência da Anfotericina B nos tempos de 1 e 18 horas.....54

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>27</b>
2.1. Objetivo geral .....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27

<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1. Reagentes .....	28
3.2. Soluções.....	29
3.3. Cultivo celular .....	32
3.4. Medida da viabilidade celular com o emprego do azul de Trypan .....	33
3.5. Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho Neutro .....	33
3.6. Estudo da sinalização celular via PKC .....	35
3.7. Análise Estatística .....	37
<b>4. RESULTADOS</b> .....	38
4.1. Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho Neutro .....	38
4.1.1. Ensaio de toxicidade linhagem VERO utilizando Vermelho Neutro .....	38
4.1.2. Ensaio de toxicidade linhagem MDCK utilizando Vermelho Neutro.....	43
4.1.3. Comparação do efeito citotóxico da Anfotericina B entre as linhagens VERO e MDCK utilizando Vermelho Neutro	48
4.2. Estudo da sinalização celular via PKC .....	49
4.2.1. Estudo da via de sinalização celular de PKC na linhagem VERO .....	50

4.2.2. Estudo da via de sinalização celular de PKC na linhagem MDCK .....	52
4.2.3. Estudo da via de sinalização celular de PKC: comparação entre as linhagens celulares VERO e MDCK	55
<b>5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>57</b>
5.1. Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho Neutro .....	57
5.1.1. Ensaio de toxicidade linhagem VERO utilizando Vermelho Neutro .....	61
5.1.2. Ensaio de toxicidade linhagem MDCK utilizando Vermelho Neutro.....	63
5.1.3. Comparação do efeito citotóxico da Anfotericina B entre as linhagens VERO e MDCK utilizando Vermelho Neutro	65
5.2. Estudo da sinalização celular via PKC .....	69
5.2.1. Estudo da via de sinalização celular de PKC: comparação entre as linhagens celulares VERO e MDCK	71
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O objetivo da Toxicologia é avaliar a possibilidade de risco que uma substância química pode provocar quando em contato com um organismo vivo. Qualquer substância, dependendo das condições de exposição, pode ser considerada tóxica. Assim, torna-se necessário conhecer as condições de uso seguro de uma substância química para o homem. Ou seja, toda substância pode ser usada de forma segura, desde que as condições de exposição sejam mantidas abaixo dos níveis de tolerância (SPINDLER *et al.*, 2000).

Para avaliação dos parâmetros de segurança, testes pré-clínicos (*in vitro* e em animais) e clínicos (seres humanos) devem ser realizados. Geralmente, a realização desses testes segue os protocolos pré-estabelecidos por órgãos oficiais (ex: FDA - *Food and Drug Administration* e OECD - *Organisation for Economic Cooperation and Development*) dos blocos econômicos aos quais os produtos serão submetidos. Dessa forma, quando se vai estudar uma nova molécula ou um composto natural, ambos são submetidos aos métodos preconizados pelos referidos órgãos, também conhecidos como guias (FDA, 2004; OECD, 2004). No

Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é o órgão responsável pela regulamentação dessas normas (ANVISA, 2003).

A exigência da realização de testes pré-clínicos deve-se ao fato de que um produto potencialmente terapêutico deve ser intensamente avaliado, antes de ser submetido às pesquisas clínicas, conforme Declaração de Helsinque (SPINDLER *et al.*, 2000).

O emprego de roedores e não roedores nesses testes levantam alguns importantes questionamentos. O maior desses refere-se ao aspecto ético, apesar de comprovada contribuição dos animais nos testes de toxicidade (HENDRIKSEN, 2002). Devido a grande pressão, tanto da sociedade quanto da comunidade científica, para diminuir o uso de animais nesses testes, em 1959 RUSSELL e BURCH (RUSSELL & BURCH, citado por SPIELMANN *et al.*, 2008) criaram o conceito dos 3R's (*Reduction, refinement and replacement* - Reduzir, refinar e substituir). Tal conceito vem sendo aceito por institutos de pesquisas científicas de diversos países que desenvolvem métodos alternativos ao uso de animais.

Em 1989 foi criado, na Alemanha, o ZEBET (*Zentralstelle zur Erfassung Bewertung von Ersatz und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch – National Centre for Documentation and Evaluation of Alternative Methods to Animal Experiments*). Em 1993, a



comunidade europeia estabeleceu o ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*). Em 1997 as agências governamentais dos Estados Unidos formaram o ICCVAM (*Inter-agency Coordinating Center for the Validation of Alternative Methods*) e em 2005 o governo japonês criou o JaCVAM (*Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods*). As atividades desenvolvidas por estas instituições governamentais focam substituir os testes regulatórios feitos em animais para identificar propriedades tóxicas de substâncias químicas, as quais seres humanos ou o ambiente são expostos (SPIELMANN *et al.*, 2008).

Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos de otimização pré-clínica são importantes nesse processo, visto que os mesmos facilitam a seleção de drogas candidatas aos estudos de eficácia e segurança (HENDRIKSEN, 2002).

Os ensaios *in vitro* tornam-se mais vantajosos em relação aos testes *in vivo* uma vez que fornece melhor controle sobre as condições experimentais, o que permite melhor reprodutividade dos ensaios e resultados, simplicidade, rapidez, diminuição do custo com a conseqüente redução do número de animais utilizados nos experimentos. Outra grande vantagem é a disponibilidade atual de uma variedade de linhagens em bancos de células, o que possibilita maior acesso e utilização de modelos *in vitro*, sendo uma alternativa para avaliações de toxicidade de muitas substâncias químicas. Dessa forma, testes de citotoxicidade *in vitro* têm sido propostos como substitutos para testes de toxicidade aguda (BERNAUER *et al.*, 2005).

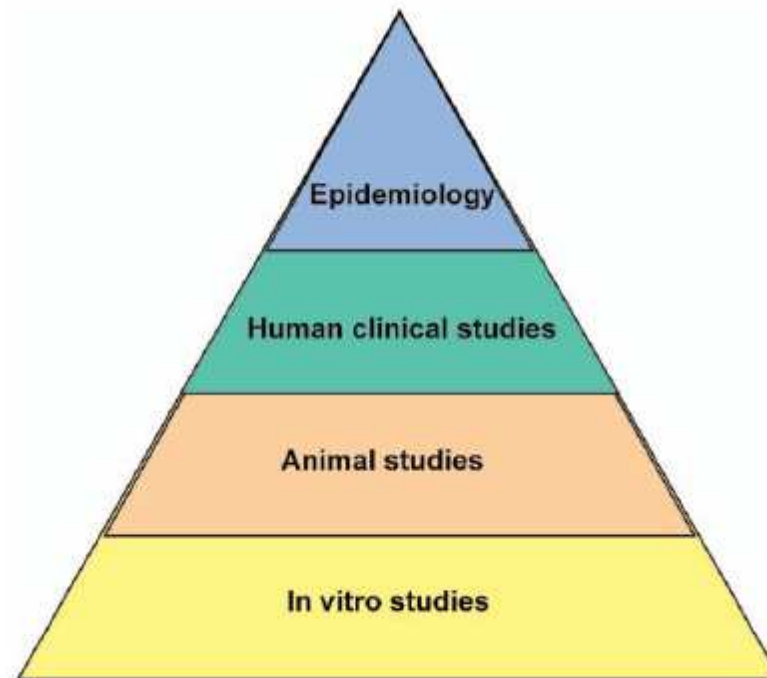
Esses testes são também importantes para as indústrias farmacêuticas, pois as mesmas necessitam de novas técnicas e modelos alternativos *in vitro* e de baixa-escala para determinação do perfil toxicológico, a fim de melhorar o diagnóstico (BROADHEAD *et al.*, 2000).

Desta maneira, tais ensaios têm, de fato, aberto novas possibilidades de diagnósticos em diversas áreas, inclusive em Toxicologia. Os estudos de toxicidade *in vitro*, celular ou tecidual, têm sido usados para estudar mecanismos de ação e efeitos tóxicos de drogas para avaliação de eficácia e segurança no homem a partir da exposição aos xenobióticos (compostos químicos, não nutrientes, expostos ao organismo) podendo, ainda, classificá-los de acordo com sua capacidade tóxica.

O conhecimento do mecanismo de ação tóxica envolvendo um xenobiótico é de suma importância, visto que o mesmo auxilia de forma significativa na avaliação do valor preditivo (EISENBRAND *et al.*, 2002; DESCOTES, 2003; BERNAUER *et al.*, 2005). Os resultados obtidos com testes *in vitro* ajudam a planejar os ensaios que deverão ser realizados *in vivo*, assim como direcionam quais drogas poderão ser testadas em tais ensaios (BERNAUER *et al.*, 2005). Além disso, o uso de cultura de células para testes de toxicidade é importante por reduzir o custo e o tempo necessário para a avaliação da segurança de uso de um xenobiótico

(ZUCCO *et al.*, 2004). Cultivo celular é o método *in vitro* mais largamente empregado em Farmacologia e Toxicologia, pois o desenvolvimento de fármacos e as investigações toxicológicas começam a partir desses estudos (SPIELMANN *et al.*, 2008).

**Figura 1.** O papel dos estudos *in vitro* em Farmacologia e Toxicologia

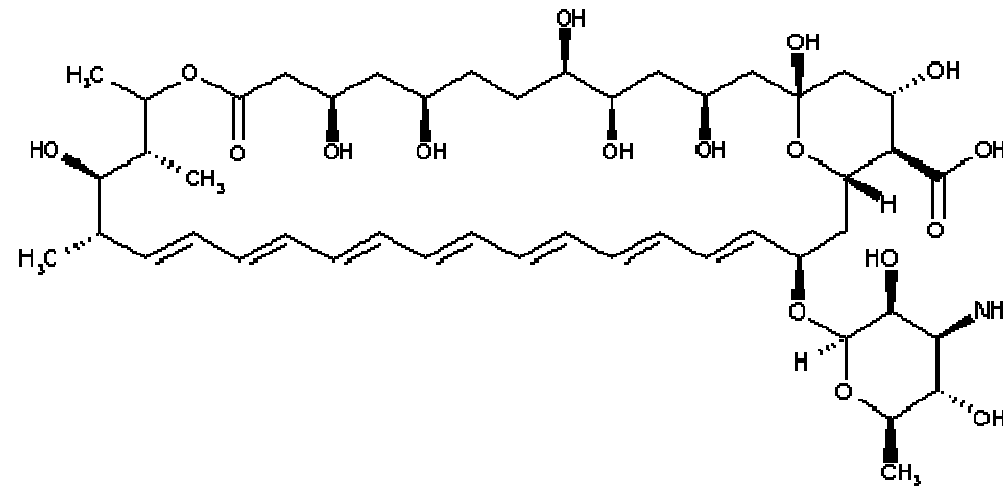


(Extraído de SPIELMANN *et al.*, 2008)

Dentre os efeitos tóxicos promovidos por produtos terapêuticos, a nefrotoxicidade é um dos maiores fatores que acometem os pacientes e que, obrigatoriamente, leva os mesmos ao abandono da terapia à qual estão submetidos. Portanto, na prescrição de uma droga potencialmente nefrotóxica, o risco/benefício deve ser sempre considerado (SCHETZ *et al.*, 2005).

Dentre os fármacos amplamente empregados na prática clínica, destaca-se a Anfotericina B (figura 2), um antibiótico macrolídeo poliênico (poliênico = que contém muitas ligações duplas; macrolídeo = que contém um grande anel de lactona de 12 ou mais átomos). É um agente com amplo espectro de atividade contra muitas espécies de fungos, sendo a droga de primeira escolha para tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, como as provocadas por *Candida albicans* e *Aspergillus fumigatus*. Entretanto, sua utilidade é limitada devido à severa nefrotoxicidade que acomete os pacientes e pode levar a falência renal. Além disso, é também o mais importante fármaco de segunda escolha para tratar casos de leishmaniose visceral e cutânea.

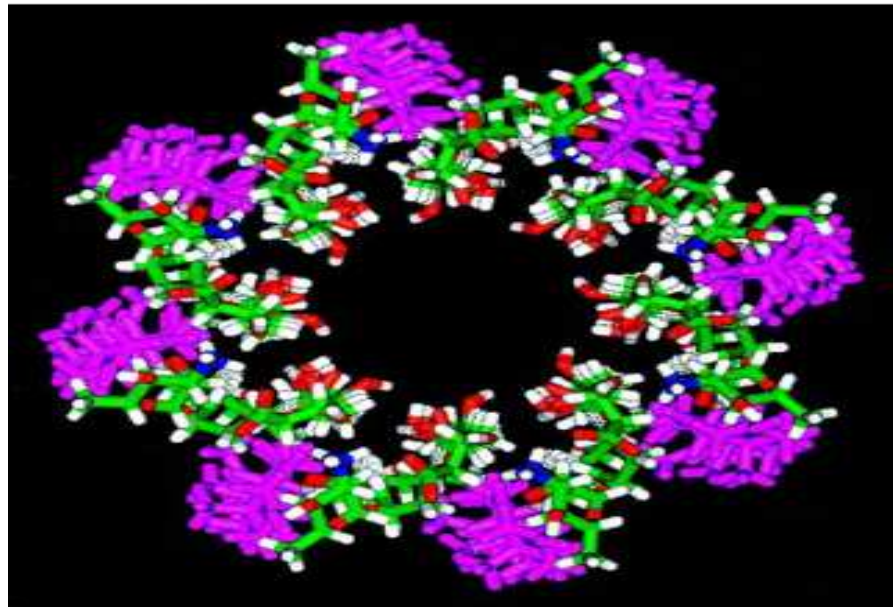
**Figura 2.** Estrutura química da Anfotericina B.



A sua estrutura poliênica permite a ligação ao ergosterol, o principal esteróide presente na membrana dos fungos. A parte polar da molécula é orientada para o interior do ergosterol, com os grupos hidroxilas formando um canal central (figura 3). A cadeia poliênica (figura 4) interage via forças de Van der Waals com moléculas de esterol/colesterol e fosfolípídeos de membrana. Devido à formação de poros em sua membrana, o organismo alvo sensível perde sua integridade celular, a qual pode ser monitorada pelo rápido efluxo de potássio (LEMKE *et al*, 2005). A ligação do fármaco ao ergosterol causa um aumento da permeabilidade da

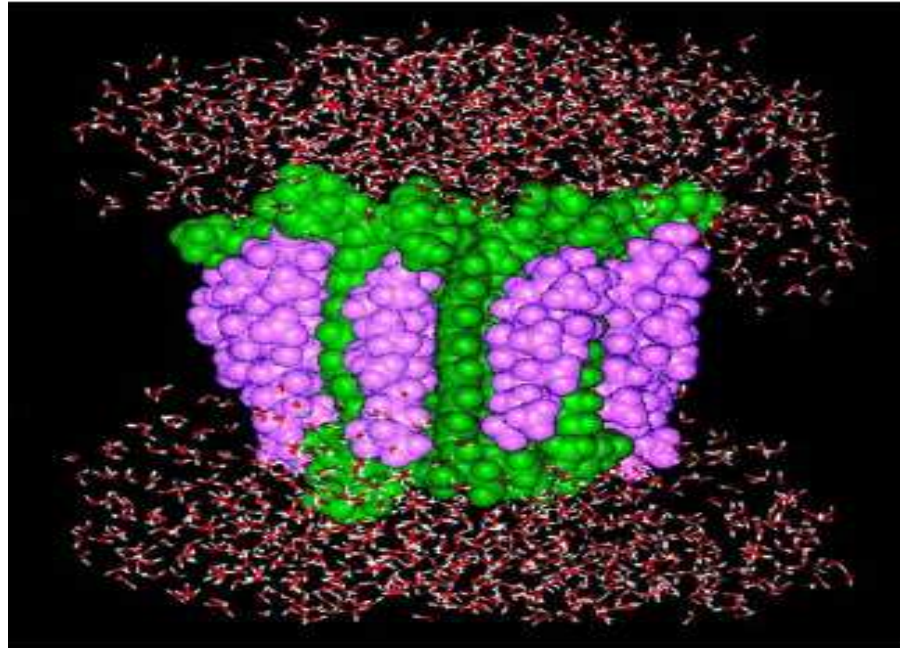
membrana fúngica, vazamento de eletrólitos e morte celular. Nas células dos mamíferos a Anfotericina B tem afinidade pelo colesterol, o que provoca danos renais (FUKASAWA, 2005).

**Figura 3:** Modelo molecular de ligação da Anfotericina B ao colesterol.



*Molécula da Anfotericina B: verde – átomos de carbono; azul – átomos de nitrogênio; vermelho – átomos de oxigênio; branco – prótons. Molécula de colesterol – violeta. (LEMKE et al., 2005).*

**Figura 4:** Visão lateral do canal Anfotericina B/Colesterol.



*Verde – Anfotericina B; Violeta – Colesterol; vermelho/branco – moléculas de água. (LEMKE et al., 2005).*

Sugere-se também que sua ação nefrotóxica seja devido à constrição arteriolar renal, a qual reduz o fluxo sanguíneo renal e a taxa de filtração glomerular. Esses eventos estão relacionados com apoptose e essa envolve injúria mitocondrial (NASCIMENTO *et al.*, 2005).

Os lisossomas também participam do processo apoptótico, já que este pode ser iniciado pela ruptura dessa organela a partir de um estímulo exógeno. A liberação de enzimas lisossômicas para dentro do citoplasma celular pode iniciar uma cascata de eventos de degradação intracelular. Estas enzimas podem atacar a mitocôndria diretamente e induzir a liberação de citocromo c; diretamente ou indiretamente aumentar a formação de ROS (espécies reativas de oxigênio) mitocondrial (e induzir mais desestabilização lisossomal) e ativar proteínas pró-apoptóticas. Assim, o eixo lisossoma – mitocôndria exerce um importante papel na apoptose (ZHAO *et al.*, 2003).

Linhagens celulares renais têm sido descritas como importantes ferramentas para o estudo de produtos terapêuticos que induzem nefrotoxicidade ([PFALLER & GSTRAUNTHALER, 1998](#); PRICE *et al.*, 2004; LINCOPAN *et al.*, 2005). O aumento do uso de técnicas *in vitro* que utilizam células renais isoladas, fragmentos de néfrons ou culturas celulares derivadas de tipos celulares renais específicos têm aperfeiçoado a compreensão do mecanismo molecular envolvido na nefrotoxicidade ([PFALLER &](#)



[GSTRAUNTHALER, 1998](#)). Neste trabalho, as linhagens utilizadas com esta finalidade são a VERO (macaco) e a MDCK (cão), já que poucos autores realizaram estudos da nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B nestas.

A linhagem celular VERO (macaco) é recomendada para avaliar toxicidade de substâncias químicas *in vitro* (ISO - *International Standardization Organization*, 1999), como a provocada pelo inseticida pentaclorofenol (FERNÁNDEZ FREIRE *et al.*, 2005) e pelo medicamento Carbamazepina (PÉREZ MARTÍN *et al.*, 2008). Outros autores já demonstram a utilização dessas células para avaliar nefrotoxicidade provocada por micotoxinas (HASSEN *et al.*, 2007). São células de grande uso em estudos microbiológicos (YU *et al.*, 2000; DROSTEN *et al.*, 2003) e muito empregadas para produzir grande quantidade de vírus para caracterização e desenvolvimento de vacinas, pelo fato dessas células apresentarem um rápido crescimento (TIWARI *et al.*, 2006). Recentemente foram utilizadas para avaliar um método que quantifica a replicação dos vírus da dengue em cultura de células (LUDERT *et al.*, 2008). A referida linhagem tem sido utilizada também em alguns estudos de toxicologia de metais (ROMERO *et al.*, 2004a; ROMERO *et al.*, 2004b), devido, principalmente, ao baixo custo (SWANSON *et al.*, 1988).

As células MDCK (cão) são consideradas um sistema modelo para estudo da nefrotoxicidade causada por Ciclosporina (JEON *et al.*, 2005; NASCIMENTO *et al.*, 2005; REZZANI *et al.*, 2002) e também para avaliar a toxicidade provocada pela Gentamicina (VAN

DER HARST *et al.*, 2005). Tal linhagem é também utilizada para avaliar citotoxicidade e alterações provocadas no rearranjo do citoesqueleto causadas por veneno de cobra (NASCIMENTO *et al.*, 2007) e é uma ferramenta útil para estudar permeabilidade da membrana a drogas (IRVINE *et al.*, 1999; SHAH *et al.*, 2007; VOLPE, 2008). Na produção de vacinas, esta linhagem é um substrato celular para propagação e isolamento de vírus (GREGERSEN, 2008), como por exemplo, isolamento do vírus influenza (DY *et al.*, 2008).

Vários ensaios podem ser realizados com a finalidade de avaliar a nefrotoxicidade da Anfotericina B em culturas celulares.

Um deles é o teste de viabilidade celular Vermelho Neutro (2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina). Este ensaio fornece informações sobre as funções metabólicas celulares, especificamente do lisossomo, uma organela que participa de vários processos celulares, inclusive apoptóticos, como relatado anteriormente. É largamente utilizado, sendo, portanto, um método de sensibilidade satisfatória e que permite avaliar o mecanismo de toxicidade do fármaco estudado a nível lisossomal.

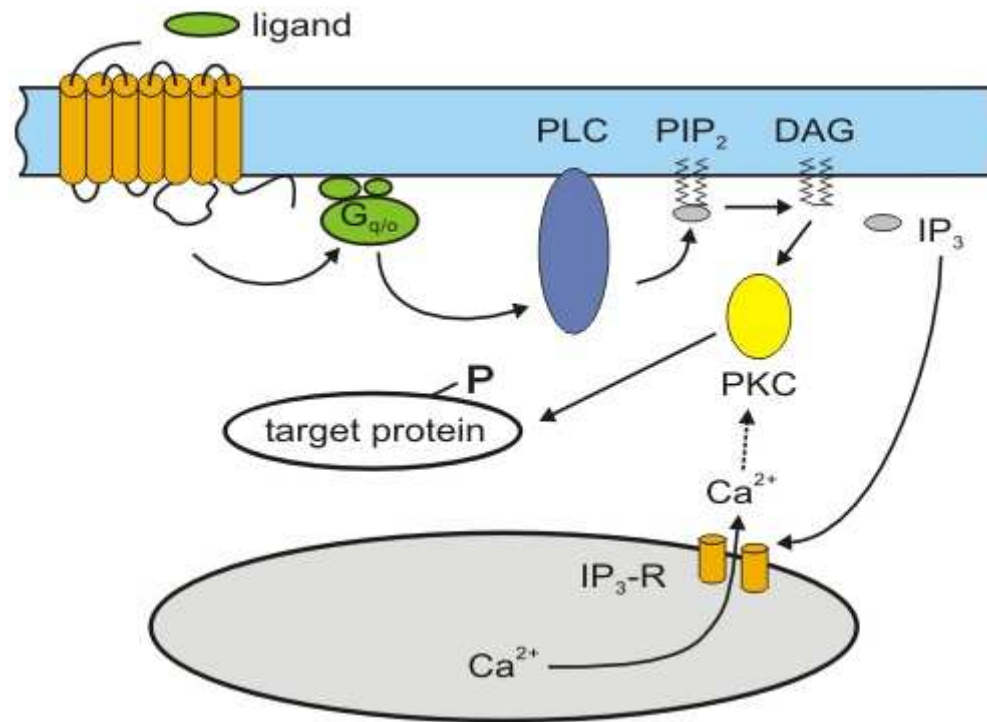
Outro ensaio que surge como nova perspectiva de estudo da nefrotoxicidade é a sinalização celular. Alguns estudos que utilizam células RAW 264.7 (linhagem de monócitos de roedores) já sugerem que a Anfotericina B provoca seus efeitos tóxicos via

fosforilação da proteína cinase C (PKC), uma importante proteína envolvida na sinalização celular (MATSUO *et al.*, 2006). No entanto, não há relatos na literatura deste mesmo estudo nas células VERO e MDCK.

Todos os tipos de PKC (novas, convencionais e atípicas) são ativados por fosforilação e esta serve para regular a atividade da proteína (PARK & BAINES, 2006). A PKC fosforila preferencialmente resíduos dos aminoácidos treonina e serina presentes em proteínas específicas localizadas na membrana plasmática, no núcleo ou em elementos do citoesqueleto (CUNHA, 2006).

A ativação da PKC ocorre a partir de uma via fisiológica bem conhecida que envolve a participação da Proteína G (figura 5). Substâncias químicas (endógenas ou exógenas) se ligam a receptores específicos na membrana, o que provoca ativação de uma cascata que envolve a proteína G e a fosfolipase C (PLC). A PLC hidroliza moléculas de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) com a subsequente produção de dois segundo mensageiros: inositol trifosfato ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  produzido se liga ao receptor específico presente no retículo endoplasmático ( $IP_3$  - R) e promove a liberação de cálcio desta organela e conseqüentemente a translocação da PKC para a membrana. A proteína cinase C está envolvida na regulação de uma variedade de processos, que incluem proliferação, diferenciação, transformação e apoptose (IMAMDI *et al.*, 2004).

**Figura 5:** Ativação da proteína cinase C via proteína G.



[www.fz-juelich.de/inb/inb-1/Neurotransmitter](http://www.fz-juelich.de/inb/inb-1/Neurotransmitter)

Assim, o presente trabalho tem como objetivo central avaliar as linhagens VERO e MDCK como modelos de estudo da nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Testar a aplicabilidade do uso das linhagens celulares VERO e MDCK em estudos de nefrotoxicidade após a administração de substância comprovadamente nefrotóxica (Anfotericina B).

### **2.2. Objetivos específicos:**

- 1- Avaliar a viabilidade celular, utilizando VERO e MDCK, após a incubação com Anfotericina B utilizando o ensaio do Vermelho Neutro.
- 2- Avaliação da via de sinalização da proteína cinase C (PKC) nas linhagens celulares estimuladas com Anfotericina B, utilizando o ensaio do Vermelho Neutro.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

A metodologia apresentada nesta dissertação gerou uma Patente depositada pela CTIT/UFMG (Coordenadoria de Transferência e Inovação Tecnológica – Universidade Federal de Minas Gerais) junto ao INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial) com o número 014080005552, conforme documento em anexo.

#### **3.1. Reagentes**

1. Ácido acético glacial – ECIBRA
2. Ácido clorídrico – ECIBRA
3. Ácido etileno diamino tetracético (EDTA) - Sigma
4. Álcool etílico absoluto – ECIBRA
5. Anfotericina B - CRISTÁLIA

6. Azul de Trypan - SIGMA
7. Bicarbonato de sódio – ECIBRA
8. Cloreto de cálcio – ECIBRA
9. Cloreto de Potássio - ECIBRA
10. Cloreto de sódio – ECIBRA
11. Dimetilsulfóxido – ECIBRA
12. Estreptomicina - SIGMA
13. Formaldeído – ECIBRA
14. Fosfato Dissódico – ECIBRA
15. Fosfato Monopotássico – ECIBRA
16. HEPES – SIGMA
17. Hidróxido de sódio - VETEC
18. MEM - Meio Mínimo Essencial Eagle – SIGMA
19. Penicilina G Potássica - SIGMA
20. Soro fetal bovino – GIBCO



21. Substância X – CALBIOCHEM

22. Vermelho neutro - 2-amino-3-metil-7dimetil-amino-cloreto de fenazina – VETEC.

### **3.2. Soluções**

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

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,15 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,20 g), NaCl (8,0 g), KCl (0,20 g), sendo o volume final completado para 1 litro com água MILLI-Q. O pH da solução (7,3) foi acertado utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N. A solução final foi autoclavada (PHOENIX) a 121 °C por 20 minutos.

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

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

### *3. Solução de Penicilina/Estreptomicina*

Primeiramente diluiu-se um frasco de penicilina G potássica 5.000.000 U e um frasco de estreptomicina 5 g em 250 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  e conservada sob congelamento. A concentração final da solução estoque foi 200 U/mL de penicilina e 200  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina.

### *4. MEM*

Um frasco de MEM foi diluído em 900 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 2,2 g de bicarbonato de sódio e 5,958 g de HEPES. O volume final foi ajustado para 1000 mL e a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$  e colocada em recipiente estéril.

### *5. Solução estoque de Vermelho Neutro*

Foram adicionados 0.4 g de Vermelho Neutro em 100 mL de água destilada. Após o preparo da solução a mesma foi armazenada em frasco âmbar e recoberta por papel alumínio.

*6. Solução de trabalho de Vermelho Neutro (40 µg/mL)*

Um mL da solução estoque de vermelho neutro foi adicionado a 79 mL de MEM com 10% (v/v) de Soro fetal bovino e 1% (v/v) da mistura de antibióticos: Penicilina/Estreptomicina. Em seguida, a solução foi incubada a 37 °C em banho-maria (HEMOQUÍMICA) por 30 minutos para que ocorresse a solubilização dos cristais de vermelho neutro. Logo após a solução foi centrifugada (FANEM®) por 10 minutos a 1000 rpm.

*7. Solução de Cloreto de Cálcio (1%)*

*8. Solução de Formaldeído (0,5% v/v) em Cloreto de Cálcio (1%)*

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

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

### 11. Solução de Anfotericina B

A Anfotericina B (CRISTÁLIA) foi gentilmente cedida pelo professor da Faculdade de Farmácia Lucas Antônio Miranda Ferreira. Primeiramente 0,0050 – 0,0300 g de Anfotericina B (90% de grau de pureza) foram solubilizadas em 0,2-0,8 mL e Dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, o volume foi completado para 50 mL com PBS em um balão volumétrico (0,01% de DMSO). A solução estoque foi armazenada em vidro âmbar até o momento de uso (2 a 8 °C por no máximo um mês).

### 12. Substância X

A substância X foi diluída em MEM e utilizada na faixa de concentração de 0,05-0,30 µM.

### 3.3. Cultivo celular

As linhagens celulares renais VERO (macaco verde africano, *Cercopithecus aethiops*, passagem 151) e MDCK (cão - *Madin-Darby canine kidney*, passagem 69) foram gentilmente fornecidas pelo Departamento de Medicina Veterinária (Prof.<sup>a</sup> Zélia Inês Portela Lobato - Faculdade de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG).

Para cultivar as células renais VERO e MDCK, as mesmas foram colocadas em frascos estéreis de crescimento de 75 cm<sup>2</sup> (SARDEST) contendo o meio de cultura MEM. Ao meio foram adicionados tampão HEPES, 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% (v/v) de uma mistura dos antibióticos: Penicilina (200 U/mL) e Estreptomicina (200 µg/mL). As garrafas foram incubadas em estufa (SHEL LAB) a 37 °C, umidificada com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). O meio foi substituído a cada dois ou três dias, de acordo com a confluência da monocamada celular (observada em microscópio invertido) e os subcultivos (passagens) realizados.

Quando as garrafas atingiram 100% de confluência o meio foi aspirado e a monocamada celular lavada duas vezes com solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS). Posteriormente, para o descolamento das monocamadas, utilizou-se solução de Tripsina 0,10-0,50% e EDTA 0,01-0,04%. Em seguida, foi realizada a contagem das células com azul de trypan 0,3% na câmara de Neubauer (OPITIK LABOR), conforme descrito abaixo.

### **3.4. Medida da viabilidade celular com o emprego do azul de Trypan**

Para a realização dos experimentos de citotoxicidade, bem como para a manutenção das células viáveis em estoque, foi estimado o número de células viáveis com o uso do corante azul de Trypan. O fundamento desse método baseia-se na observação de que células viáveis são impermeáveis ao referido corante, ao passo que as células não viáveis apresentam permeabilidade, devido à

formação de poros na membrana, o que permite a penetração do corante e assim as células não viáveis exibem coloração azul após tratamento (KONOPKA *et al.*, 1996). Resumidamente, 100 µL da suspensão celular foi adicionada a 900 µL do azul de trypan (0,3%) e posteriormente uma gota foi colocada na câmara de Neubauer para a realização da contagem.

### **3.5. Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho Neutro**

O corante Vermelho Neutro tem sido utilizado como indicador de citotoxicidade em culturas primárias de hepatócitos e em outras linhagens celulares. Caracteriza-se por acumular nos lisossomas de células viáveis (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006) que incorporam esse corante vital, ligeiramente catiônico, que penetra na membrana celular por difusão passiva não-iônica e se concentra nos lisossomas, onde se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos inclusive fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal (MELO, 2000).

As células foram colocadas em placas de plástico de 96 pocinhos (SARDEST) e expostas às seguintes concentrações de Anfotericina B (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 µg/mL). Após os períodos de 1, 6, 18, 24 e 48 horas de exposição das células à Anfotericina B o ensaio de toxicidade do Vermelho Neutro foi realizado para avaliar a citotoxicidade. As concentrações estudadas

foram baseadas no trabalho de WASAN e colaboradores (1994). Concentrações de Anfotericina B entre 0,25 e 5 µg/mL correspondem aos níveis farmacológicos dessa droga em muitos pacientes (ROGERS *et al.*, 1998).

Para a realização destes experimentos, foram utilizadas células da linhagem VERO nas passagens 151 a 157 e células da linhagem MDCK nas passagens 69 a 77.

A cada pocinho foram adicionadas células na concentração de  $1,0 \times 10^3$  –  $1,0 \times 10^6$ , sendo 180 µL o volume final de células e meio de cultura MEM (10% v/v de Soro Fetal Bovino e 1% (v/v) de mistura de antibióticos Penicilina/Estreptomicina). As células foram incubadas com Anfotericina B com 10 - 50 µL das oito diferentes concentrações (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 µg/mL). Para obter cada uma dessas concentrações, volumes diferentes da solução estoque de Anfotericina B (30 µg/mL) foram adicionados aos pocinhos e completados com PBS para chegar ao volume final de 10 - 50 µL. Ao controle foram adicionados 10 - 50 µL de PBS.

As placas ficaram incubadas em estufa umidificada com 2-7% de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 1, 6, 18, 24 e 48 horas. Decorrido esse s tempos, o sobrenadante foi retirado e 200 µL de solução de Vermelho Neutro (40 µg/mL) foram adicionados e a placa incubada

novamente em estufa umidificada com 2-7% de CO<sub>2</sub> a 37 °C, por 3 horas. Em seguida, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µL de solução de formaldeído (0,5%, v/v) em CaCl<sub>2</sub> (1%).

Após cinco minutos retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 100 µL de solução de álcool ácido (BABICH & BOREUNFREUND, 1991). A absorbância foi lida a 540 nm no leitor de microplacas (THERMO PLATE). O cálculo utilizado para avaliar a percentagem de viabilidade celular foi: Absorbância das células tratadas/ absorbância do controle X 100. A percentagem de citotoxicidade foi assim calculada: 100 – percentagem de viabilidade. Ao controle atribuiu-se 100% de viabilidade.

Dessa forma, foi verificado se as linhagens celulares estudadas possuíam sensibilidade adequada para avaliação da nefrotoxicidade provocada pela Anfotericina B.

### **3.6. Estudo da sinalização celular via PKC**

Para a realização destes experimentos, foram utilizadas células da linhagem VERO nas passagens 156 a 157 e células da linhagem MDCK nas passagens 69 a 70.



Inicialmente, as células foram incubadas numa faixa de 0,5 - 3 horas a 37 °C em banho-maria, com a substância X (0,05-0,30µM), em tubos de vidro. O número de células adicionado a 180 µL de meio de cultura MEM (10% v/v de Soro Fetal Bovino e 1% v/v de mistura de antibióticos Penicilina/Estreptomicina) foi  $1,0 \times 10^3$  -  $1,0 \times 10^6$ , sendo a contagem realizada conforme descrito no item 3.4.

Posteriormente, as células foram colocadas em placas de 96 pocinhos em ausência ou presença de 20 µL de Anfotericina B (30 µg/mL) por 1 e 18 horas. As células que não foram pré-incubadas com a substância X também foram adicionadas à placa nas mesmas condições ( $1,0 \times 10^3$  –  $1,0 \times 10^6$  células em 180 µL de meio), na ausência ou presença de 20 µL de Anfotericina B (30 µg/mL) por 1 e 18 horas. Após esses tempos de incubação o ensaio de citotoxicidade do Vermelho Neutro foi realizado, conforme citado no item 3.5.

### **3.7. Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados foi efetuada pela Empresa Jr. de Estatística da UFMG.

Os testes estatísticos utilizados foram os não paramétricos de “Mann & Whitney” e “Kruskal-Wallis”. O programa estatístico foi o SPSS 15.0 *for Windows*.

O teste de “Mann & Whitney” correspondente ao teste t para amostras independentes no caso paramétrico e avalia se existe diferença significativa entre duas variáveis distintas. Por exemplo, quando tiver a existência de dois grupos: controle versus experimento-teste (Anfotericina B).

Já o teste de “Kruskal-Wallis” avalia a diferença entre três grupos ou mais. Assim, este teste compara três ou mais grupos definidos por um fator simples. Por exemplo, nove grupos (controle e oito diferentes concentrações de Anfotericina B: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 µg/mL) mediante um fator simples: efeito deste fármaco.

O nível de significância foi avaliado a partir de um p-valor e para valores com  $p < 0,05$  os resultados foram considerados significativos.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho Neutro**

#### **4.1.1. Ensaio de toxicidade linhagem VERO utilizando Vermelho Neutro**

Os resultados mostraram que a Anfotericina B foi capaz de exercer o seu efeito citotóxico sobre a linhagem de células VERO nos cinco tempos estudados (1, 6, 18, 24 e 48 horas) (Tabela 1). As três maiores concentrações (15, 20 e 30 µg/mL) apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle nos cinco tempos, de acordo com o teste não paramétrico de “Mann & Whitney” (Tabela 1).

Não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre as três maiores concentrações em cada um dos cinco tempos avaliados, de acordo com o teste de comparações múltiplas de “Kruskal-Wallis” (Tabela 1).

Os resultados ainda mostraram que o efeito citotóxico gerado pelas três maiores concentrações (15, 20 e 30 µg/mL) de Anfotericina B ocasionaram conseqüentemente menor viabilidade celular, em todos os tempos estudados, sendo que essa foi significativa ( $p > 0,05$ ) pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney” (Gráfico 1).

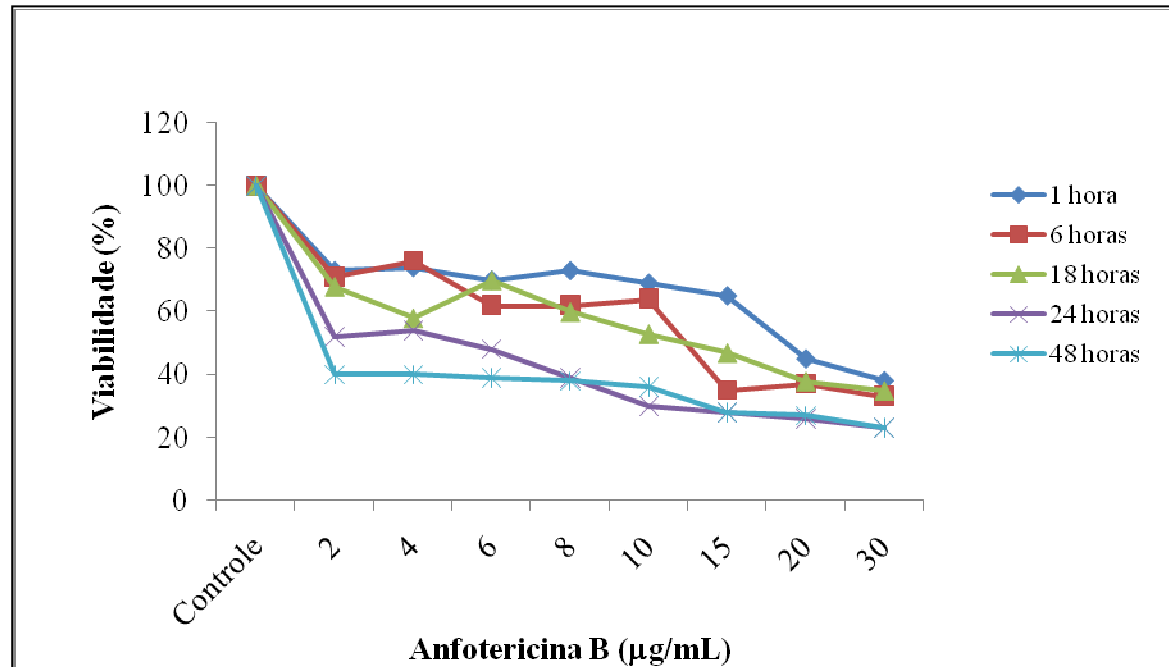
**Tabela 1.** Estudo cinético do efeito citotóxico da Anfotericina B nas células da linhagem VERO utilizando Vermelho Neutro

Tempo (horas)	Concentrações (µg/mL)								
	Controle	2	4	6	8	10	15	20	30
1**	0,209±0,025	0,152±0,019	0,154±0,017	0,146±0,017	0,153±0,018	0,144±0,025	0,134±0,023*	0,093±0,016*	0,078±0,014*
6**	0,111±0,014	0,079±0,013	0,084±0,014	0,069±0,012	0,071±0,018	0,052±0,016	0,039±0,015*	0,041±0,013*	0,036±0,011*
18**	0,095±0,011	0,065±0,009	0,055±0,007	0,067±0,009	0,057±0,007	0,050±0,006	0,044±0,007*	0,036±0,006*	0,033±0,005*
24**	0,209±0,010	0,108±0,012	0,113±0,010	0,100±0,008	0,081±0,007	0,063±0,005	0,058±0,008*	0,053±0,009*	0,046±0,009*
48**	0,468±0,012	0,186±0,020	0,189±0,014	0,185±0,014	0,177±0,009	0,169±0,016	0,130±0,007*	0,125±0,009*	0,104±0,010*

Os resultados são expressos como média ± erro padrão. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das concentrações em relação ao grupo controle dentro de cada tempo pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney”. \*\* Indicam que não houve diferença

significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparou as três maiores concentrações entre si, pelo teste de comparações múltiplas "Kruskal-Wallis". Para cada tempo:  $n=5$ , sendo para cada concentração 6 repetições.

**Gráfico 1.** Avaliação do efeito citotóxico da Anfotericina B nas células da linhagem VERO: estudo da viabilidade celular utilizando Vermelho Neutro.



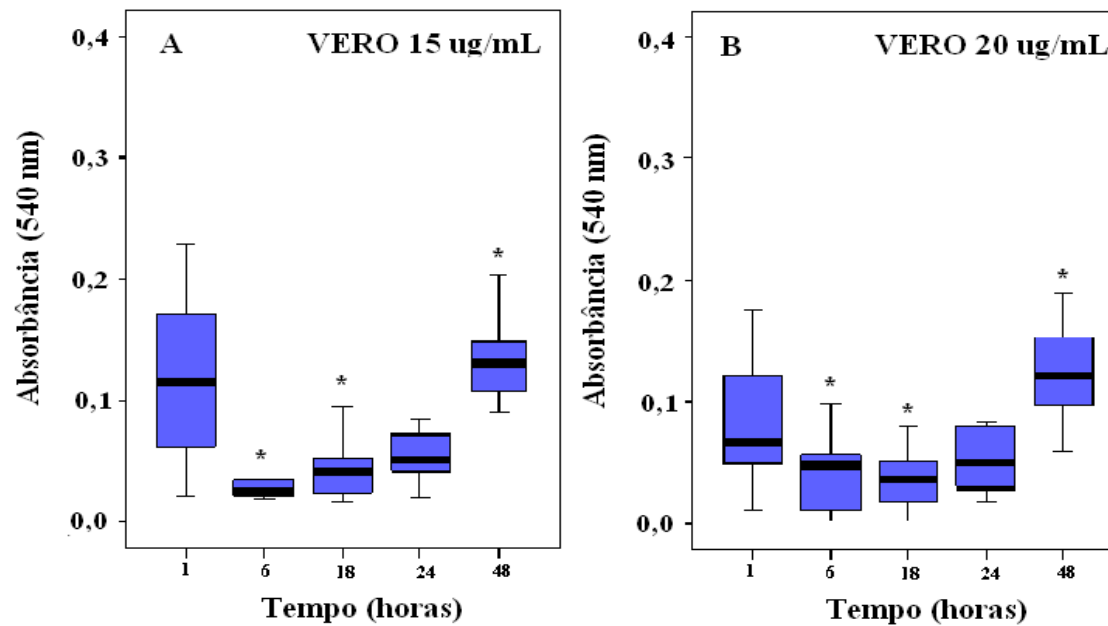
*Células da linhagem VERO foram incubadas nos tempos de 1, 6, 18, 24 e 48 horas com Anfotericina B nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 µg/mL para avaliação da viabilidade celular. Para cada tempo: n=5, sendo para cada concentração 6 repetições.*

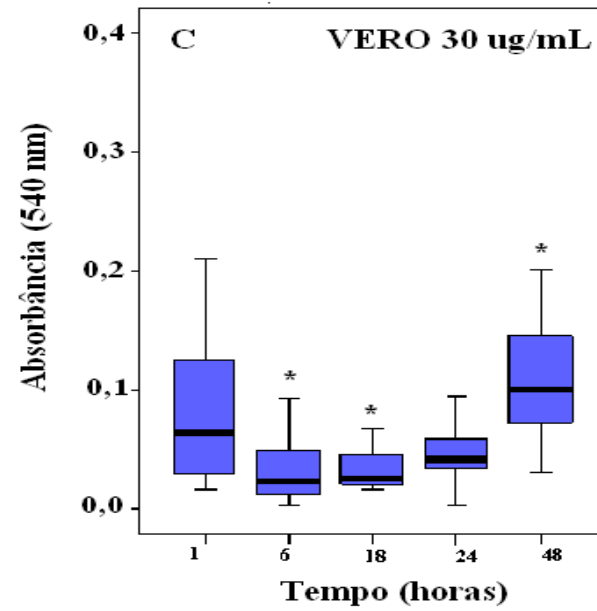
Ao analisar comparativamente as três maiores concentrações (15, 20 e 30 µg/mL) de Anfotericina B, que geraram maior citotoxicidade e conseqüentemente, menor viabilidade, nos cinco tempos avaliados, os resultados com 1 hora de exposição foram eficientes para identificar a citotoxicidade e a diminuição da viabilidade nas células da linhagem VERO (Figura 6, painéis A, B e C). Esses resultados foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos resultados de citotoxicidade e viabilidade quando comparados aos tempos de 6, 18 e 48 horas de exposição (Figura 6 – painéis A, B e C).

Entretanto, quando essa comparação foi feita entre os tempos de 1 e 24 horas não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) pelo teste não paramétrico “Mann & Whitney” (Figura 6 – painéis A, B e C). Quando foi realizada a análise dos resultados nos tempos de 6, 18 e 24 horas verificou-se maior capacidade citotóxica da Anfotericina B e, conseqüentemente, diminuição da viabilidade celular, em relação aos tempos de 1 e 48 horas, sendo essa análise significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de comparações múltiplas “Kruskal-Wallis” (Figura 6 – painéis A, B e C).

Quando comparamos os tempos de 1 e 48 horas observamos menor capacidade citotóxica com um conseqüente aumento da viabilidade celular que foi significativo ( $p < 0,05$ ) pelo teste não paramétrico “Mann & Whitney”.

**Figura 6.** Avaliação comparativa de três concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) nos cinco tempos (1, 6, 18, 24 e 48 horas) na linhagem celular VERO utilizando Vermelho Neutro.





*\*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tempo de 1 hora em relação aos tempos de 6, 18 e 48 horas, pelo teste de não paramétrico de "Mann & Whitney".*



#### **4.1.2. Ensaio de toxicidade linhagem MDCK utilizando Vermelho Neutro**

Os resultados mostraram que a Anfotericina B foi capaz de exercer o seu efeito citotóxico sobre a linhagem de células MDCK nos cinco tempos estudados (1, 6, 18, 24 e 48 horas) (Tabela 2 e Gráfico 2). As três maiores concentrações (15, 20 e 30 µg/mL) apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle nos cinco tempos, de acordo com o teste não paramétrico de “Mann & Whitney” (Tabela 2).

Quando se comparou as três concentrações (15, 20 e 30 µg/mL) de Anfotericina B entre elas, em cada um dos cinco tempos, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) com 1 e 6 horas de incubação, quando comparadas pelo teste de comparações múltiplas de “Kruskal-Wallis (Tabela 2) .

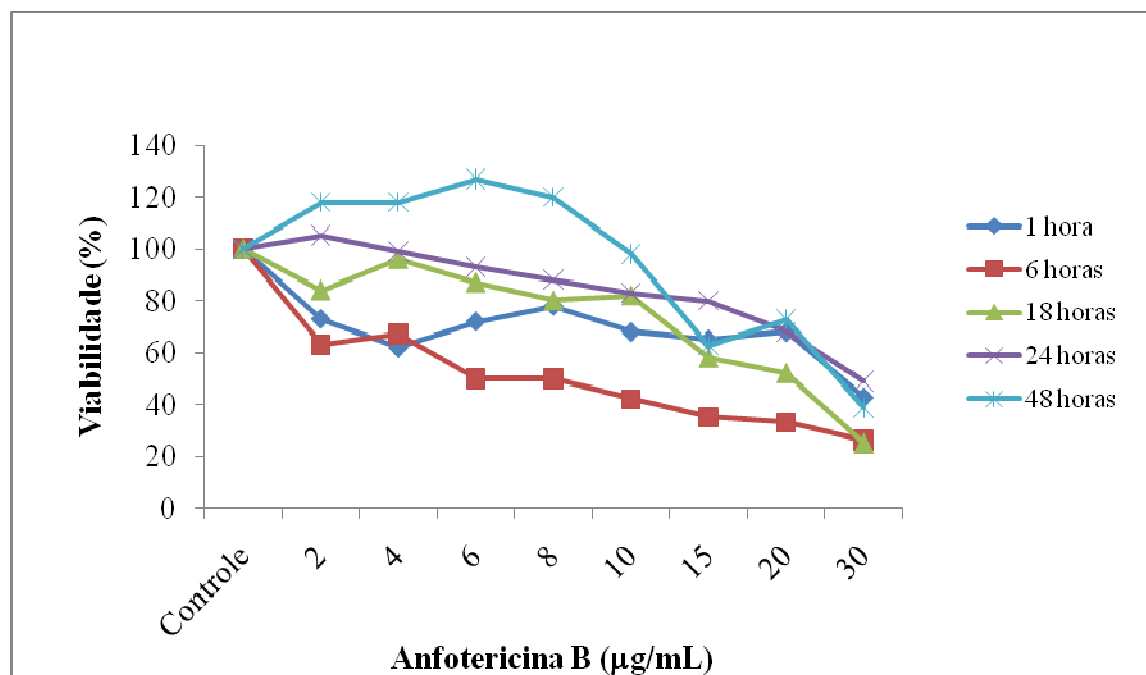
Entretanto, nos tempos de 18, 24 e 48 horas essas diferenças foram significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste de comparações múltiplas “Kruskal-Wallis” (Tabela 2). Assim, a linhagem MDCK apresentou perfil distinto da linhagem VERO.

**Tabela 2.** Estudo cinético do efeito citotóxico da Anfotericina B nas células da linhagem MDCK utilizando Vermelho Neutro.

Tempo (horas)	Concentrações (µg/mL)								
	Controle	2	4	6	8	10	15	20	30
1	0,230±0,021	0,167±0,019	0,143±0,018	0,166±0,017	0,180±0,016	0,157±0,019	0,149±0,020*	0,156±0,022*	0,099±0,019*
6	0,151±0,026	0,095±0,021	0,102±0,019	0,076±0,010	0,075±0,013	0,064±0,010	0,052±0,005*	0,050±0,007*	0,038±0,004*
18**	0,045±0,006	0,038±0,011	0,043±0,010	0,039±0,009	0,036±0,008	0,037±0,007	0,026±0,006*	0,023±0,004*	0,010±0,003*
24**	0,144±0,008	0,152±0,005	0,142±0,005	0,134±0,005	0,127±0,005	0,120±0,004	0,114±0,004*	0,098±0,004*	0,070±0,003*
48**	0,113±0,012	0,134±0,017	0,133±0,017	0,144±0,020	0,136±0,016	0,111±0,013	0,071±0,008*	0,083±0,009*	0,044±0,005*

Os resultados são expressos como média ± erro padrão. \* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das concentrações em relação ao grupo controle dentro de cada tempo pelo teste não paramétrico de "Mann & Whitney". \*\* Indicam que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparou as três maiores concentrações entre si, pelo teste de comparações múltiplas "Kruskal-Wallis". Para cada tempo:  $n=5$ , sendo para cada concentração 6 repetições.

**Gráfico 2.** Avaliação do efeito citotóxico da Anfotericina B nas células da linhagem MDCK: estudo da viabilidade celular utilizando Vermelho Neutro.



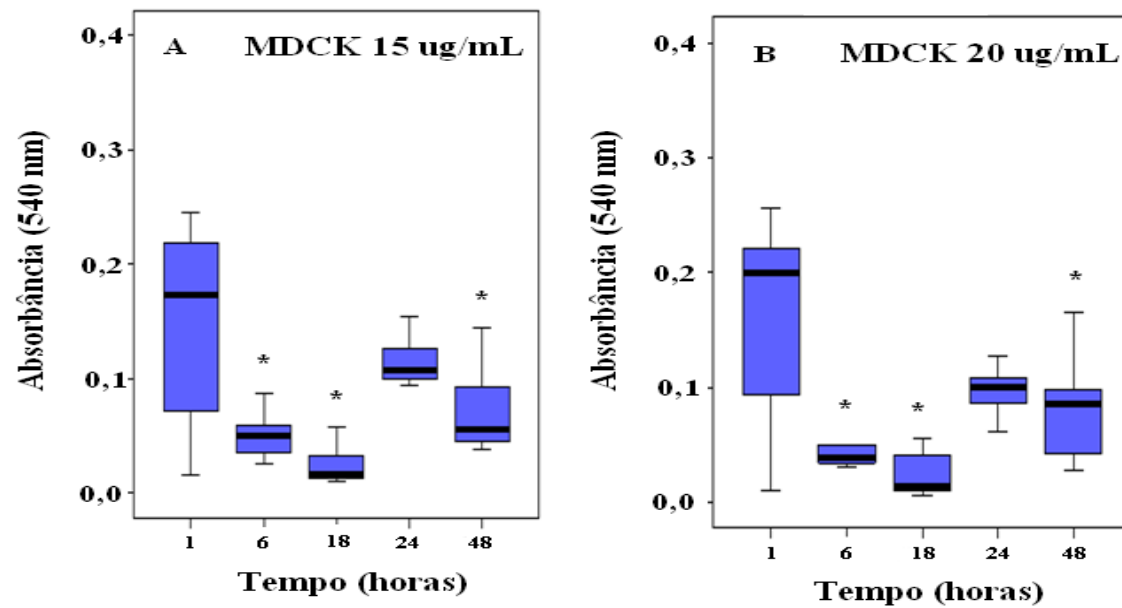
*Células da linhagem MDCK foram incubadas nos tempos de 1, 6, 18, 24 e 48 horas com Anfotericina B nas concentrações de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 e 30 µg/mL para avaliação da viabilidade celular. Para cada tempo: n=5, sendo para cada concentração 6 repetições.*

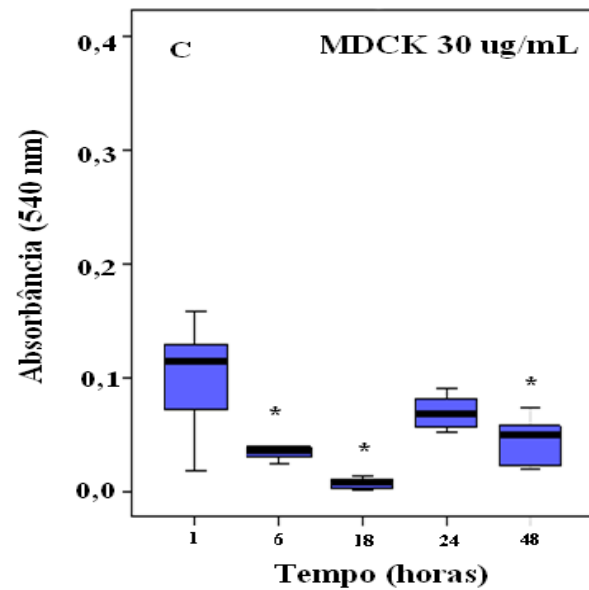
Ao analisar comparativamente as três maiores concentrações (15, 20 e 30 µg/mL) de Anfotericina B que geraram maior citotoxicidade e conseqüentemente, menor viabilidade, nos cinco tempos avaliados, os resultados com 1 hora de exposição foram eficientes para identificar a citotoxicidade e a diminuição da viabilidade celular nas células da linhagem MDCK (Figura 7, painéis A, B e C). Esses resultados foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos resultados de citotoxicidade e viabilidade quando comparados aos tempos de 6, 18 e 48 horas de exposição (Figura 7 – painéis A, B e C). Entretanto, quando essa comparação foi efetuada entre os tempos de 1 e 24 horas não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney” (Figura 7 – painéis A, B e C).

Quando foi realizada a análise dos resultados nos tempos de 6, 18 e 24 horas verificou-se maior capacidade citotóxica da Anfotericina B, com conseqüente diminuição da viabilidade celular, em relação aos tempos de 1 e 48 horas, sendo essa significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de comparações múltiplas “Kruskal-Wallis” (Figura 7 – painéis A, B e C).

Quando comparamos os tempos de 1 e 48 horas observamos maior capacidade citotóxica com conseqüente diminuição da viabilidade celular em 48 horas, sendo significativo ( $p < 0,05$ ) pelo teste não paramétrico “Mann & Whitney”.

**Figura 7.** Avaliação comparativa de três concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) nos cinco tempos (1, 6, 18, 24 e 48 horas) na linhagem celular MDCK utilizando Vermelho Neutro.





*\*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o tempo de 1 hora em relação aos tempos de 6, 18 e 48 horas, pelo teste não paramétrico de "Mann & Whitney".*

#### **4.1.3. Comparação do efeito citotóxico da Anfotericina B entre as linhagens VERO e MDCK utilizando Vermelho Neutro**

A fim de avaliar a sensibilidade das duas linhagens frente à Anfotericina B foram feitas comparações entre ambas após a exposição às três concentrações mais tóxicas (15, 20 e 30 µg/mL) nos cinco tempos estudados (1, 6, 18, 24 e 48 horas).

**Tabela 3.** Comparação do efeito citotóxico das três concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30 µg/mL) entre as linhagens celulares VERO e MDCK utilizando Vermelho Neutro.

Tempo	Linhagens	15 (µg/mL)	% Cito.	20 (µg/mL)	% Cito.	30 (µg/mL)	% Cito.
1 h.	VERO	0,134 ± 0,023	35	0,093 ± 0,016	55	0,078 ± 0,014	62
	MDCK	0,150 ± 0,020	35	0,156 ± 0,022	32	0,099 ± 0,019	57
6 hs.	VERO	0,039 ± 0,015	65	0,041 ± 0,013	63	0,036 ± 0,011	67
	MDCK	0,052 ± 0,005	65	0,050 ± 0,007	67	0,038 ± 0,004	74
18 hs.	VERO	0,044 ± 0,007	53*	0,036 ± 0,006	62*	0,033 ± 0,005	65*
	MDCK	0,026 ± 0,006	42	0,023 ± 0,004	48	0,011 ± 0,003	75
24 hs.	VERO	0,058 ± 0,008	72*	0,053 ± 0,010	74*	0,046 ± 0,009	77*
	MDCK	0,114 ± 0,004	20	0,098 ± 0,004	32	0,070 ± 0,003	51
48 hs.	VERO	0,130 ± 0,007	72*	0,125 ± 0,010	73*	0,104 ± 0,010	77*
	MDCK	0,071 ± 0,008	37	0,083 ± 0,009	27	0,044 ± 0,005	61

Os valores expressam média ± erro padrão. h.= hora; hs.= horas; % Cito. = percentagem de citotoxicidade.\* Indica que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as citotoxicidades pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney”.

Conforme mostrado na tabela 3, com 1 e 6 horas de exposição às três concentrações (15, 20 e 30 µg/mL) de Anfotericina B não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre ambas quanto à capacidade citotóxica do fármaco. Entretanto, nos tempos de 18, 24 e 48 horas essa diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste não paramétrico “Mann & Whitney”.

Com 18 horas de incubação as concentrações de 15 e 20 µg/mL de Anfotericina B foram mais citotóxicas ( $p < 0,05$ ) para as células da linhagem VERO. No entanto, a concentração de 30 µg/mL foi mais citotóxica para a linhagem MDCK ( $p < 0,05$ ), pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney” (Tabela 3).

Com 24 e 48 horas de incubação as três concentrações de Anfotericina B foram mais citotóxicas para as células da linhagem VERO ( $p < 0,05$ ), pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney” (Tabela 3).

#### **4.2. Estudo da sinalização celular via PKC**

Diante dos resultados obtidos do ensaio de toxicidade nas duas linhagens, dois tempos de exposição à Anfotericina B foram selecionados para o estudo da via de sinalização celular PKC: 1 hora e 18 horas. O primeiro tempo foi devido ao fato da Anfotericina B já apresentar citotoxicidade com 1 hora de incubação, o que demonstrou o desencadeamento de um processo de sinalização celular iniciada pelo fármaco e o segundo tempo foi escolhido pelo fato desse ser o tempo em que o fármaco tem o seu



pico de ação. A concentração de Anfotericina B (30 µg/mL) também foi escolhida baseada nos resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade com Vermelho Neutro, sendo essa a que apresentou maior efeito.

#### **4.2.1. Estudo da via de sinalização celular de PKC na linhagem VERO**

De acordo com a figura 8 (Painel A) e a tabela 4, com 1 hora de incubação da linhagem de células VERO com a substância X ocorreu inibição significativa ( $p < 0,05$ ) de 37% em relação ao controle. Quando as células foram expostas à Anfotericina B, a inibição em relação ao controle foi de 46%, sendo também significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 8, painel A).

Entretanto, quando as células foram incubadas com a substância X e com a Anfotericina B, ocorreu ativação não significativa ( $p > 0,05$ ) de 14% (Figura 8, painel A) quando comparados com os valores apresentados das células incubadas apenas com o fármaco. Estes dados foram analisados pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney”.

O estudo da sinalização com 18 horas apresentou o mesmo perfil de 1 hora. No entanto, com 18 horas os efeitos inibitórios provocados pela substância X e pela Anfotericina B foram exacerbados. Assim, com 18 horas ocorreu inibição significativa

( $p < 0,05$ ) de 48% (Figura 8, painel B) quando as células foram incubadas com a substância X em relação ao controle. Quando essas células foram expostas à Anfotericina B pelo mesmo tempo ocorreu inibição significativa ( $p < 0,05$ ) de 61% (figura 8, painel B), também em relação ao controle.

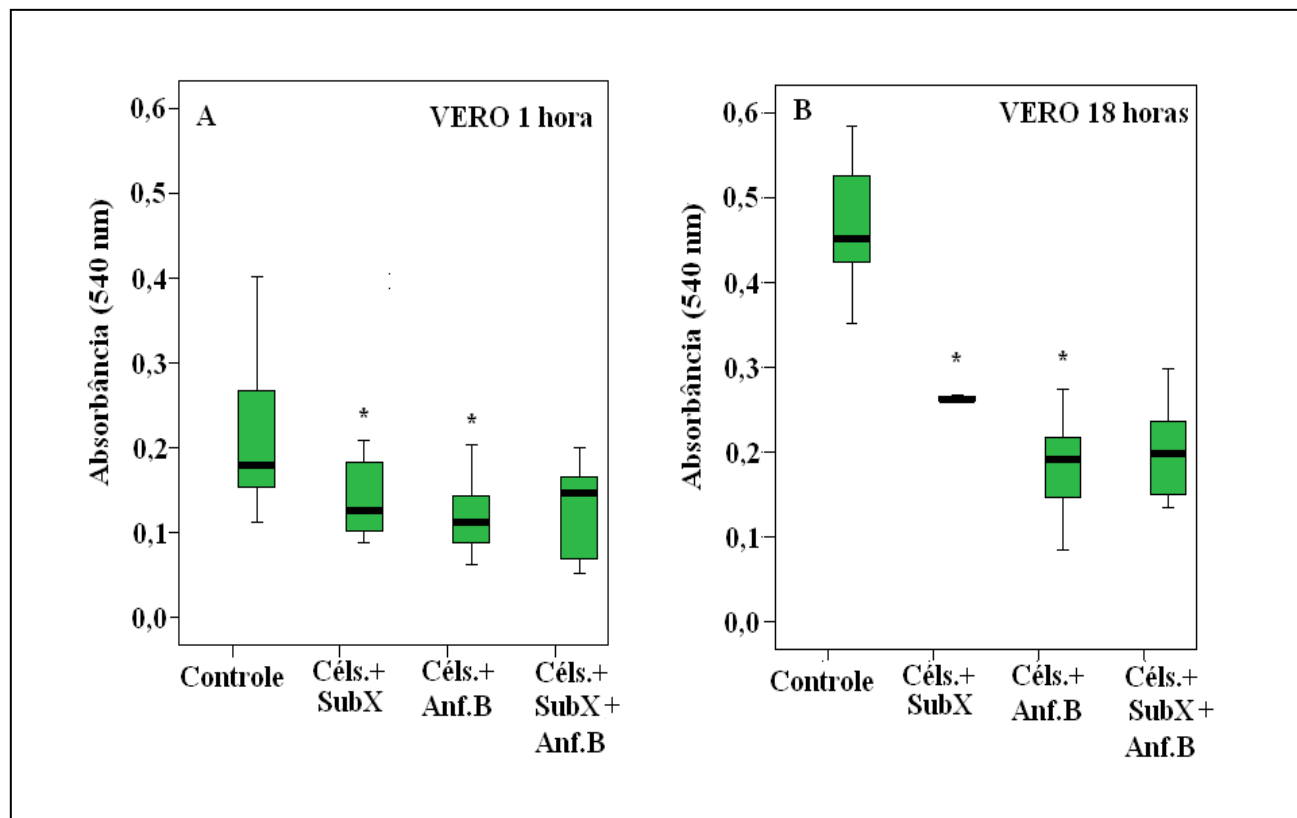
Entretanto, quando as células foram incubadas com a substância X e com a Anfotericina B houve ativação não significativa ( $p > 0,05$ ) de 9% quando comparada com os valores obtidos das células incubadas apenas com o fármaco, segundo o teste não paramétrico de “Mann & Whitney”.

**Tabela 4.** Estudo comparativo da via de sinalização celular de PKC da linhagem VERO incubada em presença ou ausência da Anfotericina B nos tempos de 1 e 18 horas.

Tempo (horas)	Controle	Cels. + SubX	% Inib.	Cels.+ A.	% Inib.	Cels.+ SubX+ A.	% Ativ.
1	0,218±0,031	0,138±0,013	37*	0,117±0,012	46*	0,133±0,012	14
18	0,466±0,014	0,244±0,022	48*	0,184±0,022	61*	0,201±0,020	9

Os resultados são expressos com média  $\pm$  erro padrão. Cels.+ SubX = células + Substância X; % Inib.= percentagem de inibição; Cels.+ A. = células + Anfotericina B; Cels.+ SubX + A. = células + Substância X + Anfotericina B; % Ativ. = percentagem de ativação; \* Indica que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney”. Para cada tempo: n= 3, sendo 5 repetições.

**Figura 8.** Estudo da via de sinalização celular de PKC na linhagem celular VERO através da incubação com a Substância X.



\* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, pelo teste não paramétrico de "Mann & Whitney".

#### 4.2.2. Estudo da via de sinalização celular de PKC na linhagem MDCK

De acordo com a figura 9 (painel A) e a tabela 5, com 1 hora de incubação da linhagem de células MDCK com a Substância X houve inibição significativa ( $p < 0,05$ ) de 36% em relação ao controle. Quando as células foram expostas à Anfotericina B, a inibição em relação ao controle foi de 69%, sendo também significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 9, painel A). Entretanto, quando as células foram incubadas com a substância X e com a Anfotericina B ocorreu inibição não significativa ( $p > 0,05$ ) de 4% quando comparados com os valores apresentados das células incubadas apenas com o fármaco. Esses dados foram analisados pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney”.

Da mesma maneira que na linhagem celular VERO, o estudo da sinalização na linhagem celular MDCK com 18 horas apresentou o mesmo perfil de 1 hora. Dessa forma, com 18 horas ocorreu inibição significativa ( $p < 0,05$ ) de 54% (Figura 9, painel B) quando as células foram incubadas com a substância X em relação ao controle. Quando essas células foram expostas à Anfotericina B pelo mesmo tempo ocorreu inibição significativa ( $p < 0,05$ ) de 51% (Figura 9, painel B). Entretanto, quando as células foram incubadas com a substância X e com Anfotericina B houve exacerbação da inibição de 52% que foi significativa ( $p < 0,05$ ) (figura 9, painel B)

quando comparado com os valores obtidos das células incubadas apenas com o fármaco, pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney”.

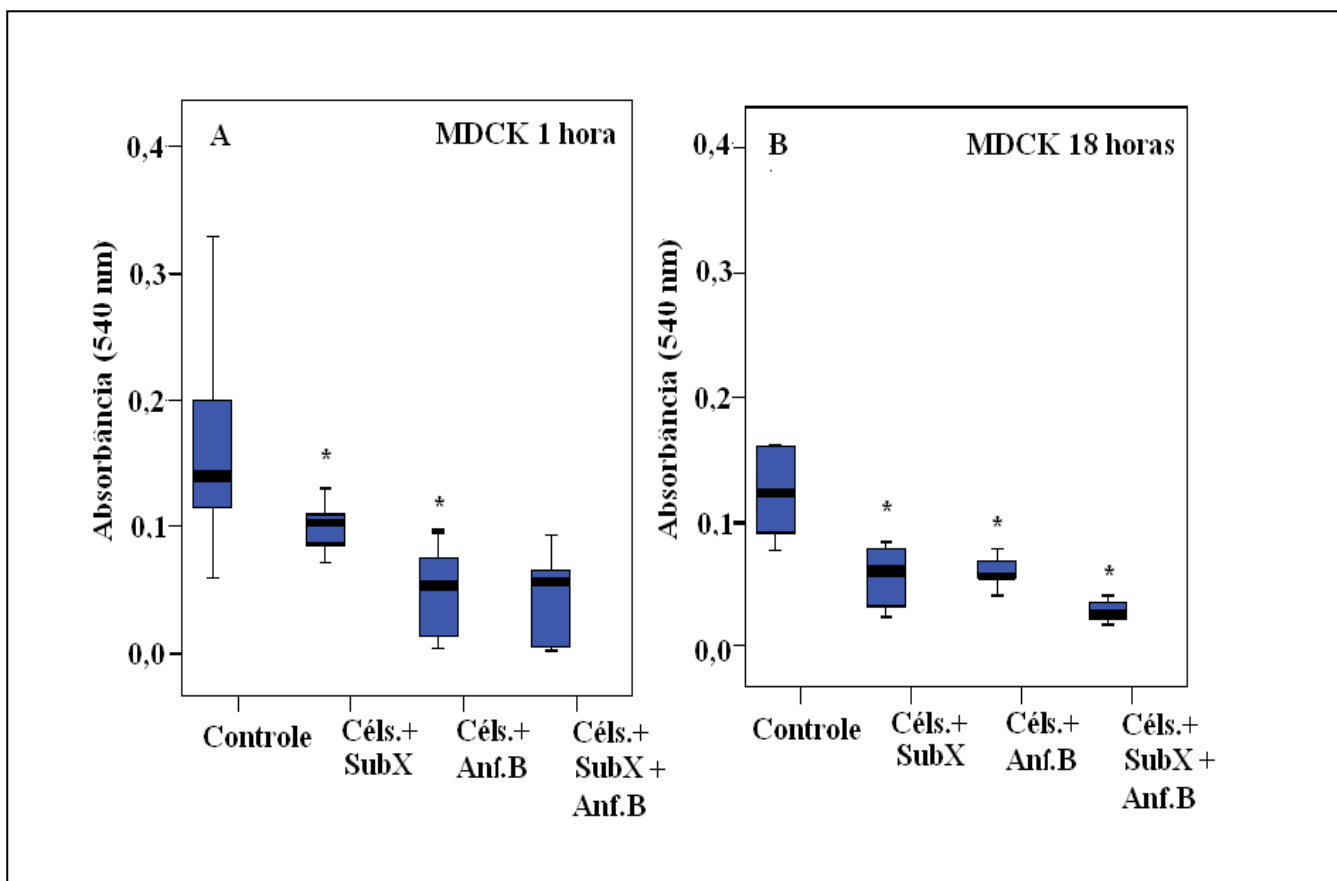
Assim, com 18 horas de incubação as células incubadas com a substância X e com a Anfotericina B apresentaram efeito citotóxico exacerbado (52% de inibição significativa -  $p < 0,05$ ) em relação às células incubadas com a substância X e com a Anfotericina B apenas por 1 hora (4% de inibição não significativa -  $p > 0,05$ ).

**Tabela 5.** Estudo comparativo da via de sinalização celular de PKC da linhagem MDCK incubada em presença ou ausência da Anfotericina B nos tempos de 1 e 18 horas.

Tempo (horas)	Controle	Cels. + SubX	% Inib.	Cels.+ A.	% Inib.	Cels.+ SubX + A.	% Inib.
1	0,158±0,020	0,101±0,006	36*	0,049±0,012	69*	0,047±0,009	4
18	0,123±0,011	0,057±0,010	54*	0,060±0,004	51*	0,029±0,003	52*

Os resultados são expressos com média  $\pm$  erro padrão. Cels.+ SubX; = células +Substância X; % Inib.= percentagem de inibição; Cels.+ A. = células + Anfotericina B; Cels.+ SubX. + A. = células + Substância X + Anfotericina B; % Ativ. = percentagem de ativação; \* Indica que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney”. Para cada tempo:  $n=3$ , sendo 5 repetições.

**Figura 9.** Estudo da via de sinalização celular de PKC na linhagem celular MDCK através da incubação com a Substância X.

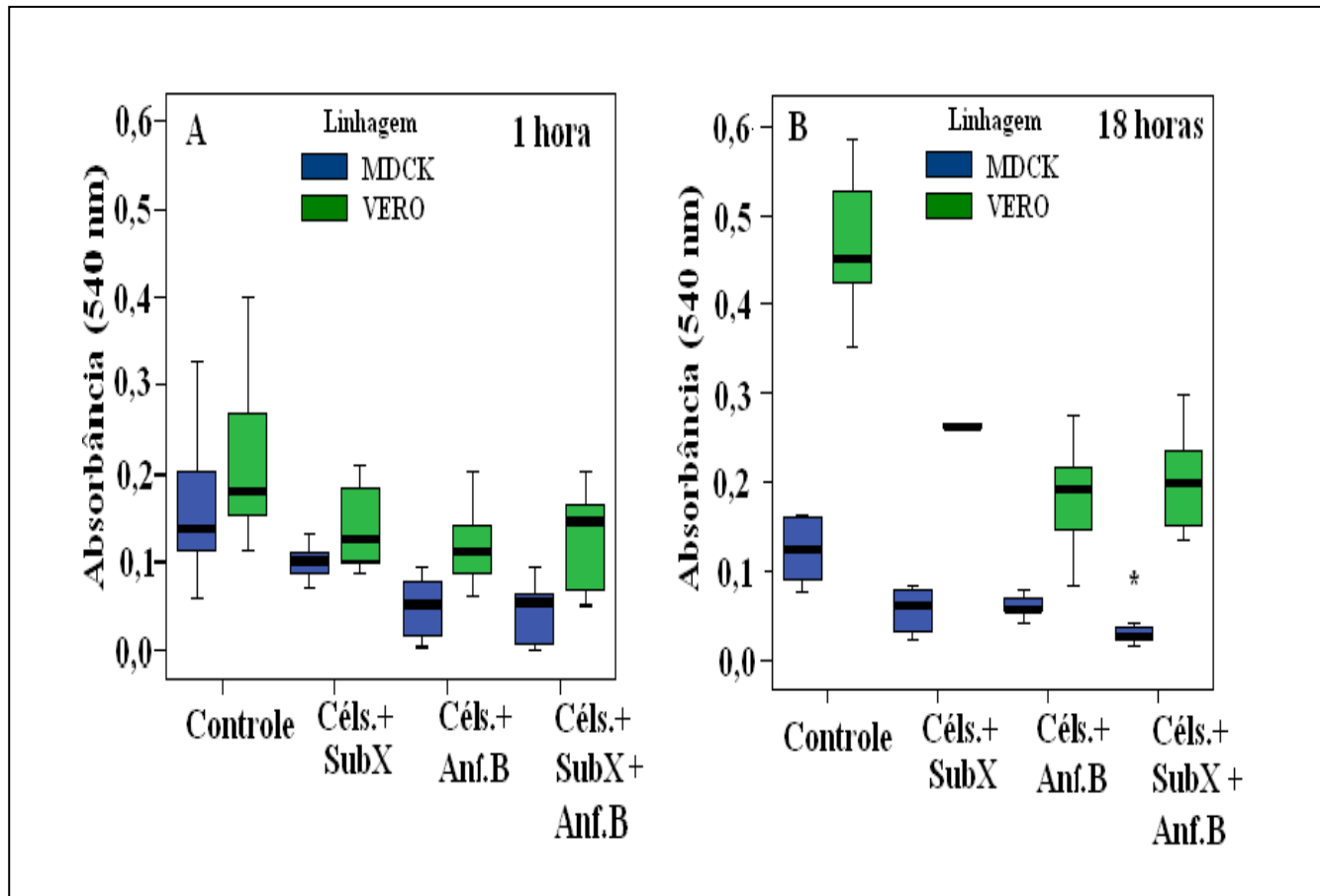


\* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle, pelo teste não paramétrico de "Mann & Whitney".

#### **4.2.3. Estudo da via de sinalização celular de PKC: comparação entre as linhagens celulares VERO e MDCK**

Os resultados mostraram que quando as linhagens celulares VERO e MDCK foram comparadas em cada um dos dois tempos estudados (1 e 18 horas), verificou-se que o tempo de 1 hora apresentou o mesmo perfil do tempo 18 horas. Entretanto, com 18 horas as células incubadas com a substância X e as células incubadas com a substância X e com a Anfotericina B tiveram seus efeitos exacerbados, como pode ser percebido pela figura 10 (painéis A e B).

**Figura 10.** Estudo comparativo das linhagens celulares VERO e MDCK: avaliação da via de sinalização celular de PKC.



\* Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as linhagens, pelo teste não paramétrico de "Mann & Whitney".



## 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### 5.1. Ensaio de citotoxicidade utilizando Vermelho Neutro

Os ensaios *in vitro* são uma alternativa para avaliações de toxicidade de muitas substâncias químicas (BERNAUER *et al.*, 2005) e estudos detalhados de concentrações e de tempo de exposição das células a essas substâncias podem sustentar informações valiosas sobre o mecanismo e tipo de toxicidade celular provocados por essas (EISENBRAND *et al.*, 2002). A utilização desses ensaios apresentou aumento expressivo em todo o mundo nos últimos anos (SPIELMANN *et al.*, 2008).

Considerando que linhagens celulares renais foram descritas como importantes ferramentas para o estudo de produtos terapêuticos que induziram nefrotoxicidade ([PFALLER & GSTRAUNTHALER, 1998](#); PRICE *et al.*, 2004; LINCOPAN *et al.*, 2005), VERO e MDCK foram avaliadas no presente estudo no intuito de conhecer se ambas são adequadas para essa finalidade.

O método empregado para essa avaliação foi o teste de citotoxicidade do Vermelho Neutro, corante vital que se acumula em células viáveis.

Os resultados obtidos no ensaio com Vermelho Neutro são dependentes de dois fatores principais. Primeiramente, dependem do número de células viáveis na cultura, onde há relação linear entre o corante extraído da cultura e o número de células viáveis na mesma, o que implica que alterações tóxicas na proliferação celular podem modificar significativamente os resultados. Em segundo lugar, os resultados dependem da viabilidade lisossomal das células ou função dessas. A incorporação do Vermelho Neutro por células viáveis pode ser modificada por alterações na superfície celular ou na membrana lisossomal. De acordo com a capacidade lisossomal de incorporar o corante é possível distinguir células viáveis das injuriadas ou mortas (MELO,1996). A avaliação da incorporação do corante pelas células é feita através dos valores de absorbância, sendo esses proporcionais à viabilidade das células e dos lisossomas. Assim, esse ensaio é um indicador de danos provocados ao lisossoma.

As duas linhagens celulares, VERO e MDCK, apresentaram diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular após exposição a três diferentes concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) nos cinco tempos avaliados (1, 6, 18, 24 e 48 horas).

Portanto, essas três concentrações reduziram a captação do Vermelho Neutro. Isso pode sugerir que a Anfotericina B, nas referidas concentrações, interage com as membranas lisossomais, o que pode indicar que essa organela é altamente susceptível a

ser danificada por esse fármaco. Sendo assim, o mecanismo de toxicidade da Anfotericina B pode ser iniciado pelos danos provocados ao lisossoma. Estudos anteriores já relataram a importante participação dessa organela nos processos apoptóticos (ZHAO *et al.*, 2003).

O transporte da Anfotericina B, assim como o de outras drogas hidrofóbicas, é mediado por proteínas plasmáticas de baixa densidade (LDL) e essas estão primariamente envolvidas no transporte de lipídeos e proteínas por toda a circulação sistêmica. Estudos indicam que esse fármaco se liga a lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade *in vivo* e *in vitro* e esse fenômeno está envolvido no desenvolvimento de toxicidade renal (WASAN, 1996). A Anfotericina B pode penetrar nas células por um mecanismo de endocitose através de receptores LDL (VERTUT-DOI *et al.*, 1994).

O receptor LDL transporta macromoléculas relevantes, principalmente lipoproteínas ricas em colesterol (LDL), para dentro das células através de um processo chamado endocitose mediada por receptor. Esse processo envolve reconhecimento dos receptores de superfície celular das partículas LDL proveniente da membrana celular externa, internalização dessas e transporte intracelular através de vesículas.

A vesícula é degradada após fusão com lisossomas e libera lipídeos para o citoplasma da célula, enquanto isso o receptor é reciclado de volta à superfície da célula para se ligar a outras partículas de LDL (CHUNG & WASAN, 2004). Sendo assim, pode-se sugerir que a Anfotericina B é liberada no interior celular dessa maneira, o que também pode ser condizente com o ensaio de toxicidade Vermelho Neutro.

Apesar do teste de citotoxicidade do Vermelho Neutro ser largamente utilizado por vários pesquisadores em todo o mundo, a metodologia empregada na realização deste e em outros testes de citotoxicidade, como o MTT, pode ser questionável, já que o contato das células com a substância estudada só é feito após 24 ou 48 horas de crescimento celular (ROMERO *et al.*, 2004a; FERNÁNDEZ FREIRE *et al.*, 2005; FOTAKIS & TIMBRELL, 2006) e a substância é adicionada nessas sem ser feito um teste de viabilidade celular.

Como essas células aderem na superfície em que são colocadas, decorridos esses tempos elas já formaram camadas, ocorrendo alterações bioquímicas importantes que podem gerar falsos resultados. Além disso, essas metodologias relatadas anteriormente deixam as células por muito tempo em contato com a substância (até 72 horas), para só depois realizar os testes de citotoxicidade.

Assim, os resultados apresentados na metodologia realizada por outros autores podem não refletir a citotoxicidade da substância, mas sim mostrar morte celular que pode ser provocada por outros fatores, como esgotamento de nutrientes do meio de cultivo ou alteração do pH do meio decorrente do grande período de incubação.

Diante do exposto acima, a metodologia utilizada no presente estudo tem se mostrado mais eficaz e confiável, pois a exposição das células à Anfotericina B é realizada em no máximo 48 horas com a verificação da viabilidade antes das células entrarem no experimento, o que garante que essas células estão viáveis ( $\pm$  95% de viabilidade).

Além disso, curtos períodos de exposição são recomendados quando já se sabe que a substância é tóxica e seus efeitos vão ser comparados entre linhagens celulares (FRESHNEY, 2001), o que está totalmente de acordo com o presente estudo. Outros autores que estudaram a citotoxicidade da Anfotericina B utilizaram a metodologia descrita primeiramente e os tempos de incubação variaram de 24 a 72 horas (WASAN *et al.*, 1994; BARTLETT *et al.*, 2004; CHÉRON *et al.*, 2003).

### 5.1.1. Ensaio de toxicidade linhagem VERO utilizando Vermelho Neutro

Com os resultados obtidos do estudo de viabilidade celular realizado com a linhagem celular VERO, segundo tabela 1, gráfico 1 e figura 6, verificou-se que essas células são sensíveis aos efeitos nefrotóxicos provocados pela Anfotericina B. No entanto, como essas células não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre as três concentrações mais tóxicas (15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) do fármaco durante os cinco tempos de exposição (1, 6, 18, 24 e 48 horas), pode-se sugerir que essa linhagem não foi a mais adequada, pelo teste de viabilidade celular Vermelho Neutro, para avaliar os efeitos tóxicos provocados por diferentes concentrações de Anfotericina B. Ela foi útil para verificar se o fármaco é tóxico ou não, mas não conseguiu demonstrar qual foi a melhor concentração para se avaliar esses efeitos tóxicos.

Apesar de ter ocorrido diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das três concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) entre o tempo de exposição 1 hora e os tempos de 6, 18 e 48 horas, o de 1 hora forneceu indícios do potencial citotóxico do fármaco em curto espaço de tempo e foi importante para prever o efeito citotóxico que ocorreu nas horas posteriores. Sendo assim, com a metodologia empregada no presente estudo conseguiu demonstrar que o tempo de 1 hora de exposição é suficiente para predizer a manifestação da toxicidade.

Além disso, pode-se sugerir que a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ocorrida entre o tempo de 1 hora e o de 48 horas demonstrou que diminuindo a citotoxicidade e aumentando a viabilidade celular corrobora para qualificar mais uma vantagem dessa nova metodologia, que consegue verificar que com um tempo maior de exposição ao fármaco esse pode vir a não ser tóxico, pois nesse tempo pode estar ocorrendo um processo de reversibilidade da citotoxicidade.

Verificou-se também que não ocorreu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de exposição 1 e 24 horas, o que volta a ressaltar a importância da metodologia aqui apresentada, onde pode-se detectar o início do processo de reversibilidade descrito para 48 horas de incubação. Assim, pode-se inferir que para a linhagem VERO o período de tempo máximo para a realização desse teste de citotoxicidade seria de 1- 24 horas.

Somado a isso, quando se comparou as concentrações de 15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$  de Anfotericina B entre os tempos de exposição 6, 18 e 24 horas, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Com isso, pode-se dizer que a Anfotericina B exerce seu maior efeito citotóxico na linhagem celular VERO entre 6 e 24 horas, o que está de acordo com o tempo de meia-vida desse fármaco ( $18 \pm 11$  horas). Dessa forma, com a linhagem VERO conseguiu-se identificar o efeito tóxico da substância estudada em

todos os tempos estudados (1, 6, 18, 24 e 48 horas), mas não conseguiu diferenciar qual concentração apresentou maior efeito citotóxico.

### **5.1.2. Ensaio de toxicidade linhagem MDCK utilizando Vermelho Neutro**

De acordo com os resultados obtidos do estudo de viabilidade celular realizado com a linhagem celular MDCK, segundo a tabela 2, gráfico 2 e figura 7, pode-se sugerir que essa foi uma linhagem compatível para o estudo da nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B.

Da mesma maneira que na linhagem celular VERO, apesar da diferença significativa ( $p < 0,05$ ) das três concentrações (15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$ ) de Anfotericina B, que ocorreu entre o tempo de exposição 1 hora e os tempos de 6, 18 e 48 horas, o tempo de 1 hora forneceu indícios do potencial citotóxico do fármaco em curto espaço de tempo e foi importante para prever o efeito citotóxico que ocorreu nas células MDCK nas horas posteriores. Sendo assim, com a metodologia empregada no presente estudo se conseguiu demonstrar que as células apresentaram sensibilidade ao fármaco estudado com apenas 1 hora de exposição.



Outro resultado passivo de discussão é que quando os tempos de 1 e 48 horas de incubação foram comparados, verificou-se que a linhagem MDCK apresentou perfil distinto da linhagem VERO. Nessa, observou-se um perfil de reversibilidade da citotoxicidade e viabilidade celular, mas na linhagem MDCK não se observou tal efeito.

A linhagem celular MDCK teve o seu padrão citotóxico aumentado, o que pode caracterizar aumento da capacidade citotóxica e menor sensibilidade aos efeitos tóxicos desse fármaco. Como não ocorreu diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de exposição 1 e 24 horas, pode-se sugerir que a nossa primeira hipótese se torna mais acertada e novamente esta nova metodologia foi capaz de discriminar essa diferença na sensibilidade de linhagens celulares à fármacos.

Como as concentrações de 15, 20 e 30  $\mu\text{g/mL}$  de Anfotericina B foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) durante cada um dos tempos de exposição 18, 24 e 48 horas, pode-se sugerir que a linhagem MDCK foi potencialmente útil para avaliar e comparar efeitos tóxicos provocados por diferentes concentrações de Anfotericina B.

Como os tempos de 6, 18 e 24 horas apresentaram maior capacidade citotóxica frente à Anfotericina B em relação aos tempos de 1 e 48 horas e como ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando se comparou cada uma das três concentrações entre os tempos 6, 18 e 24 horas, pode-se dizer que as células MDCK apresentaram sensibilidade significativa à concentração de 30  $\mu\text{g/mL}$  de Anfotericina B, após 18 horas de exposição. Isso foi condizente com o pico de ação da Anfotericina B (18 horas).

Diante disso, pode-se sugerir que as células MDCK foram eficazes para avaliar os efeitos nefrotóxicos causados por diferentes concentrações de Anfotericina B, além de conseguir mostrar qual foi a concentração mais tóxica dentre as avaliadas e em qual tempo de exposição essa toxicidade foi maior. Mais uma vez devemos destacar que a nova metodologia empregada foi capaz de detectar todas essas variabilidades quando se comparou diferentes linhagens celulares e também foi eficiente para detectar diferenças de toxicidade e viabilidade quando se comparou concentrações e tempos de exposição diferentes numa mesma linhagem.

### **5.1.3. Comparação do efeito citotóxico da Anfotericina B entre as linhagens VERO e MDCK utilizando Vermelho Neutro**

Quando se comparou as concentrações de Anfotericina B (15, 20 e 30 µg/mL) entre as duas linhagens com 1 e 6 horas de exposição, não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ). Com isso, pode-se sugerir que as linhagens celulares VERO e MDCK foram igualmente sensíveis a essas concentrações de Anfotericina B nos referidos tempos de exposição e ambas conseguiram mostrar com apenas 1 hora de exposição os efeitos citotóxicos que a Anfotericina B provocaria nos tempos subsequentes, como demonstrado anteriormente.

Essa diferença entre ambas as linhagens só foi significativa ( $p < 0,05$ ) nos tempos de exposição 18, 24 e 48 horas. Esses resultados mostraram que com 18 horas de contato das células com Anfotericina B, a linhagem VERO apresentou maior sensibilidade para as concentrações de 15 e 20 µg/mL. Para a concentração de 30 µg/mL a linhagem MDCK foi mais sensível aos efeitos do fármaco. Com 24 e 48 horas as células VERO apresentaram maior sensibilidade para as três concentrações.

Uma possível explicação para a diferença de sensibilidade das duas linhagens frente à Anfotericina B é o fato dessas serem originadas de regiões diferentes do néfron. A VERO é uma linhagem composta por mistura de células proximais e distais,

enquanto a MDCK é formada apenas por células do túbulo distal. Como as células das porções distais do néfron são mais resistentes à deficiência de oxigênio quando comparadas a células tubulares proximais (PFALLER & GSTRANTHALER, 1998) e como a nefrotoxicidade causada pela Anfotericina B parece envolver constrição arteriolar renal, a qual reduz o fluxo sanguíneo para os rins (NASCIMENTO *et al.*, 2005) e provoca hipóxia ou isquemia, pode-se tentar explicar o perfil distinto de citotoxicidade causada pela Anfotericina B nas linhagens celulares VERO e MDCK dessa maneira.

Assim, células dos túbulos proximais são mais sensíveis à ação de fármacos, o que pode explicar a maior sensibilidade das células VERO após exposição à Anfotericina B em menor concentração (15 µg/mL) durante os cinco tempos estudados. As células MDCK só conseguiram apresentar toxicidade semelhante quando foram expostas à concentração de Anfotericina B duas vezes maior (30 µg/mL).

As células das porções distais realizam preferencialmente a glicólise aeróbica, entretanto, em situações adversas são altamente resistentes à deficiência de oxigênio pelo fato de enzimas do caminho glicolítico estarem confinadas nessas porções. Assim, a atuação de drogas que diminuam a concentração de oxigênio pode alterar o metabolismo glicólico diminuindo a produção de trifosfato de adenosina (ATP). Em contraste, as porções proximais dos néfrons utilizam os aminoácidos glutamato, glutamina,

malato e succinato, sendo a glutamina o aminoácido preferencialmente utilizado para a síntese de glicose (gliconeogênese). Esta reação é energeticamente desfavorável, pois seis moléculas de ATP são consumidas para sintetizar glicose.

Dessa forma, nas células das porções distais (MDCK) o ganho energético é maior, o que pode explicar a maior resistência dessa linhagem celular aos efeitos tóxicos da Anfotericina B.

Portanto, as diferenças anatômicas, funcionais e bioquímicas entre os vários tipos celulares ao longo do néfron sugerem que cada uma dessas células responde de maneira característica a exposição de substâncias químicas ou condições patológicas como hipóxia ou isquemia. De fato, os rins são os alvos primários de muitas drogas, primeiro por causa da alta taxa de filtração sanguínea e segundo porque a presença de sistemas de transporte celular facilita a concentração destes compostos dentro das células epiteliais do néfron.

Por causa da distribuição heterogênea dos sistemas de transporte e diferente habilidade para bioativar ou detoxificar xenobióticos, as diferentes populações celulares (e, portanto, as várias regiões dentro do rim) não possuem o mesmo grau de dano após a exposição a substâncias tóxicas. Assim, populações de células distintas podem ser particularmente susceptíveis a uma classe de

químicos e resistentes a injúria provocada por outra classe de substâncias (PFALLER & GSTRAUNTHALER, 1998). Baseado nessas informações ressalta-se a importância de padronizar várias linhagens para o estudo da nefrotoxicidade.

Outra possível explicação para a diferente sensibilidade das duas linhagens é a ocorrência de uma variação na expressão de receptores LDL. Como relatado anteriormente, a captação celular da Anfotericina B é mediada por esses receptores, o que permite dizer que quanto maior a expressão desses receptores pela célula, maior é a toxicidade da Anfotericina B (CHÉRON *et al.*, 2003). Como a linhagem VERO apresentou maior sensibilidade ao referido fármaco, pode-se sugerir que elas podem possuir um maior número de receptores LDL que as células da linhagem MDCK.

## **5.2. Estudo da sinalização celular via PKC**

Os resultados do presente estudo mostraram que as duas linhagens estudadas possuem a via de sinalização de PKC, pois em ambas a incubação com a substância X provocou alterações nessa via que foram significativas ( $p < 0,05$ ) pelo teste não paramétrico de “Mann & Whitney”.

Entretanto, pode-se sugerir que a Anfotericina B exerce seu efeito nefrotóxico nas linhagens celulares VERO e MDCK de maneira distinta. Na linhagem VERO a inibição da via PKC não alterou a ação do fármaco estudado, seja durante 1 ou 18 horas de exposição, pois não houve diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre as células incubadas com a Anfotericina B e as células incubadas com a substância X e com o fármaco. Sendo assim, a Anfotericina B não utilizou essa via preferencialmente para efetuar seu efeito citotóxico na linhagem VERO.

Entretanto, na linhagem MDCK a inibição da via PKC alterou o efeito tóxico da Anfotericina B após 18 horas de exposição, pois quando as células foram incubadas apenas com o referido fármaco ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação às células incubadas com a substância X e com a Anfotericina B. Dessa forma, pode-se sugerir que nas células MDCK a inibição da via PKC potencializou a toxicidade da Anfotericina B.

A Anfotericina B exerce seu efeito tóxico sobre as células dos mamíferos após ligação ao colesterol presente na membrana plasmática (LEMKE *et al.*, 2005). Assim, sugere-se que a Anfotericina B associada ao LDL se liga às moléculas de colesterol e provoca ativação de uma cascata que envolve proteína G e a fosfolipase C (PLC), com a subsequente produção de trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) e diacilglicerol (DAG). O  $IP_3$  produzido se liga ao receptor específico presente no retículo endoplasmático e promove a

liberação de cálcio desta organela e conseqüentemente a translocação da proteína cinase C (PKC) para a membrana. Somado a isso, têm sido postulado que o aumento do cálcio intracelular participa da toxicidade de vários compostos que formam poros nas células de mamíferos, como a Anfotericina B (MATSUO *et al.*, 2006).

Existem 13 isoformas de PKC e suas distribuições e funções dependem do tipo celular (LI & GOBE, 2006). Ativação de certas isoenzimas de PKC pode inibir proliferação ou induzir apoptose em alguns tipos celulares (YANG & KAZANIETZ, 2003). Estudos anteriores relataram que nas células epiteliais renais a ativação da PKC bloqueia apoptose (McCONKEY & ORRENIUS, 1996). Como no presente estudo a inibição da via de PKC aumentou o efeito tóxico da Anfotericina B nas células MDCK, pode-se sugerir que nessas células a inibição da via de PKC está relacionada com apoptose e também o efeito nefrotóxico do fármaco. Entretanto, esse mesmo efeito não foi observado na linhagem VERO, o que permite indagar se nessa linhagem o mecanismo de citotoxicidade da Anfotericina B não seja preferencialmente dependente da via de sinalização de PKC.



### **5.2.1. Estudo da via de sinalização celular de PKC: comparação entre as linhagens celulares VERO e MDCK**

Quando se realizou a análise comparativa da sensibilidade e da utilização da via de sinalização de PKC pela Anfotericina B nas duas linhagens, verificou-se que o estudo da sinalização celular é altamente eficiente para discriminar, nas células nefróticas, o efeito tóxico.

Verificou-se que com uma hora de incubação as duas linhagens celulares apresentaram o mesmo perfil, o que indicou a presença dessa via nas duas células. Os resultados também mostraram que a Anfotericina B não usou preferencialmente essa via para efetuar o seu efeito citotóxico nas duas linhagens.

Entretanto, ao estender este tempo de ensaio para um tempo de 18 horas (pico de ação do fármaco), verificou-se que as mesmas informações obtidas com uma hora de incubação foram mantidas, mas conseguiu-se extrair nova informação da linhagem celular MDCK. Observou-se que com 18 horas de incubação a inibição da via de sinalização de PKC pode potencializar o efeito citotóxico

da Anfotericina B, resultado esse que se torna extremamente importante no que tange a avaliação de possíveis medicamentos que interfiram nessa via de sinalização e que estejam sendo administrados conjuntamente com a Anfotericina B.

Nesse contexto, o presente trabalho conseguiu desenvolver uma nova metodologia mais eficaz e confiável para a avaliação dos efeitos tóxicos da Anfotericina B que pode ser utilizada para o estudo de outros medicamentos presentes no mercado, mas também de novas moléculas que ainda não possuem efeito nefrotóxico conhecido. Além desses avanços, foram introduzidos os estudos com sinalização celular, o que permitiu discriminar a sensibilidade do fármaco frente a diferentes linhagens celulares de um mesmo órgão.

Assim, o trabalho atual vem acrescentar importante avanço tecnológico para o estudo de medicamentos ou novas moléculas, o qual permitirá maior segurança nos resultados obtidos, assim como melhor valor preditivo quanto à toxicidade dos referidos produtos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. (Brasil). Resolução RDC nº 136 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamento novo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jun. (2003). Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/136_03rdc.htm)>. Acesso em: 27 ago. 2008.

BABICH, H.; BORENFREUND, E. Cytotoxicity of T-2 toxin and its metabolites determined with the neutral red cell viability assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.7, p. 2101-2103, July 1991.

BARTLETT, K.; YAU, E.; HARTSEL, S.C.; HAMER, A.; TSAI, G.; BIZZOTTO, D.; WASAN, K. M. Effect of heat-treated Amphotericin B on renal and fungal cytotoxicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.1, p.333-336, Jan. 2004.

BERNAUER, U.; OBEREMM, A.; MADLE, S.; GUNDERT-REMY, U. The use of *in vitro* data in risk assessment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n.3, p.176 -181, Mar. 2005.

BROADHEAD, C.L.; BETTON, G.; COMBES, R.; DAMMENT, S.; EVERETT, D.; GARNER, C.; GODSAFE, Z.; HEALING, G.; HEYWOOD, R.; JENNINGS, M.; LUMLEY, C.; OLIVER, G.; SMITH, D.; STRAUGHAN, D.; TOPHAM, J.; WALLIS, R.; WILSON, S. and BUCKLEY, P. Prospects for reducing and refining the use of dogs in the regulatory toxicity testing of pharmaceuticals. **Human & Experimental Toxicology**, v.19, n.8, p.440-447, Aug. 2000.

CHÉRON, M.; PETIT, C.; BOLARD, J.; GABORIAU, F. Heat-induced reformulation of amphotericin B-deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, n.6, p.904-910, dec. 2003.

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

CUNHA, Karinne Cristinne da Silva. **Sobrevida das células ganglionares da retina induzida pelo PMA: envolvimento da PKC $\delta$  e JNK**. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niteroi, 2006.

DESCOTES, J. From clinical to human toxicology: linking animal research and assessment in man. **Toxicology Letters**, v.140-141, p.3-10, apr. 2003.

DROSTEN,C.; GÜNTHER, S.; PREISER, W.; VAN DER WERF, S.; BRODT, H.R.; BECKER, S.; RABENAU, H.; PANNING, M.; KOLESNIKOVA, L.; FOUCHIER, R.A.M.; BERGER,A.; BURGUIÈRE, A.M.; CINATL, J.; EICKMANN, M.; ESCRIOU, N.; GRYWNA,K.; KRAMME, S.; MANUGUERRA, J.C.; MÜLLER, S.; RICKERTS, V.; STÜRMER, M.; VIETH,S.; KLENK,H.D.; ALBERT D.M.E.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; SCHMITZ, H.; DOERR, H.W. Identification of a novel Coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.348, n.20, p.1967-1976, may 2003.

DY, O.; BARR, I.G.; MOSSE, J.A.; LAURIE, K.L. MDCK SIAT-1 cells show improved isolation rates for recent human influenza viruses compared to conventional MDCK cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.7, p.2189-2194, may 2008.

EUROPEAN CENTRE FOR THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS – ECVAM. Disponível em: <<http://www.ecvam.jrc/>>. Acesso em: 15 de jun. 2008.

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

FERNÁNDEZ FREIRE, P.; LABRADOR, V.; PÉREZ MARTÍN J.M.; HAZEN, M.J. Citotoxic effects in mammalian Vero cells exposed to pentachlorophenol. **Toxicology**, v.210, n.1, p.37-44, may 2005.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA **Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry.** Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>>. Acesso em: 27 ago. 2008.

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

FRESNHEY, I. Application of cell cultures to Toxicology. **Cell Biology and Toxicology**, v.17, p.213-230, 2001.

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

GREGERSEN, J.P. A risk-assessment model to rate the occurrence and relevance of adventitious agents in the production of influenza vaccines. **Vaccine**, v.26, n.26, p.3297-3304, apr. 2008.

HASSEN, W.; AYED-BOUSSEMA, I.; BOUSLIMI, A.; BACHA, H. Heat shock proteins (Hsp 70) response is not systematic to cell stress case of the mycotoxin ochratoxin A. **Toxicology**, v.242, n.1-3, p.63-70, dec. 2007.

HENDRIKSEN, C.F. Refinement, reduction and replacement of animal use for regulatory testing: current best scientific practices for the evaluation of safety and potency of biologicals. **Institute of Laboratory Animal Resources**, v.43, p.43-48, 2002.

IMAMDI, R.; GRAAUW, M.; WATER B.V. 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 Therapeutic**, v.311, n.3, p.892 - 903, dec. 2004.

INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION – ISO. **Biological evaluation of medical devices**. Part 5. Test for cytotoxicity: in vitro methods. 10993-5. 1999.

IRVINE, J.D.; TAKAHASHI, L.; LOCKHART, K.; CHEONG, J.; TOLAN, J.W.; SELICK, H.E.; GROVE, J.R. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.88, n.1, p.28-33, jan. 1999.

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

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

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.68, n.2, p.151-162, apr. 2005.

LI, J.; GOBE, G. Protein kinase C activation and its role in kidney disease. **Nephrology**, v.11, n.5, p.428-434, oct. 2006.

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

*LUDERT, J.E.; MOSSO, C.; CEBALLOS-OLVERA, I.; DEL ANGEL, R.M. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. **Virology Journal**, v.5, n.51, p.1-8, apr. 2008.*

MATSUO, K.; HOTOKEZAKA, H.; OHARA, N.; FUJIMURA, Y.; YOSHIMURA, A.; OKADA, Y.; HARA, Y.; YOSHIDA, N.; NAKAYAMA, K. Analysis of Amphotericin B - induced cell signaling with chemical inhibitors of signaling molecules. **Microbiology and Immunology**, v.50, n.4, p.337-347, 2006.

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

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

MELO, Patrícia da Silva. **Pigmentos obtidos *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*, propriedade tripanocida da prodigiosina e estudos toxicológicos.** 1996. 92 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

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

NASCIMENTO, J.M.; FRANCHI, G.C.JR.; NOWILL, A.E.; COLLARES-BUZATO, C.B.; HYSLOP, S. Cytoskeletal rearrangement and cell death induced by *Bothrops alternates* snake venom in cultured Madin-Darby canine kidney cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v.85, n.5, p.591-605, oct. 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. Disponível em: <[www.oecd.org](http://www.oecd.org)>. Acesso em: 27 ago. 2008.

PARK, R.; BAINES, J.D. Herpes Simplex virus type 1 infection induces activation and recruitment of protein kinase C to the nuclear membrane and increased phosphorylation of lamin B. **Journal of Virology**, v.80, n.1, p.494-504, jan. 2006.

PÉREZ MARTÍN, J.M.; FERNÁNDEZ FREIRE, P.; LABRADOR, V.; HAZEN, M.J. Carbamazepine induces mitotic arrest in mammalian Vero cells. **Mutation Research**, v.637, n.1-2, p.124-133, jan. 2008.

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

PRICE, P.M.; SAFIRSTEIN, R. L.; MEGYESI, J. Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v.286, n.2, p.378-84, feb. 2004.



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

ROGERS, P.D.; JENKINS, J.K.; CHAPMAN, S.W.; NDEBELE, K.; CHAPMAN, B.A.; CLEARY, J.D. Amphotericin B activation of human genes encoding for cytokines. **Journal of Infectious Diseases**, v.178, n.6, p.1726-1733, dec.1998.

ROMERO, D.; GÓMEZ-ZAPATA, M.; LUNA, A.; GARCÍA-FERNANDEZ, A.J. Comparasion of cytopathological changes induced by mercury chloride exposure in renal cell lines (VERO and BGM). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.17, p.129-141, 2004a.

ROMERO, D.; GÓMEZ-ZAPATA, M.; LUNA, A.; GARCÍA-FERNANDEZ, A.J. Morphological characterization of renal cell lines (BGM and VERO) exposed to low doses of lead nitrate. **Histology and Histopathology**, v.19, n.1, p.69-76, jan. 2004b.

RUSSELL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The principles of humane experimental technique**. London, UK: Methuen; 1959 *apud* SPIELMANN H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M.; SEILER, A.; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.60, n.2-3, p.225-233, jan. 2008.

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

SHAH, P.; JOGANI, V.; MISHRA, P.; MISHRA, A.K.; BAGCHI, T.; MISRA, A. Modulation of ganciclovir intestinal absorption in presence of absorption enhancers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, n. 10, p.2710-2722, oct. 2007.

SPIELMANN H.; GRUNE, B.; LIEBSCH, M.; SEILER, A.; VOGEL, R. Successful validation of *in vitro* methods in toxicology by ZEBET, the National Centre for Alternatives in Germany at the BfR (Federal Institute for Risk Assessment). **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.60, n.2-3, p.225-233, jan. 2008.

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

SWANSON, S.K.; MENTO, S.J.; WEEKS, L. C.; BROCK, B.D.; KOWAL, K.J.; WALLACE, R.E.; RITCHEY, M.B.; CANO, F.R. Characterization of Vero cells. **Journal of Biological Standardization**, v.16, n.4, p.311-320, oct.1988.

TIWARI, A.; PATNAYAK, D.P.; CHANDER, Y.; GOYAL, S.M. Permissibility of different cell types for the growth of avian metapneumovirus. **Journal of Virological Methods**, v.138, n.1-2, p.80-84, dec. 2006.

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

VERTUT-DOI, A.; OHNISHI, S.; BOLARD, J. The endocytic process in CHO cells, a toxic pathway of the polyene antibiotic Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, n.10, p.2373-2379, oct.1994.

VOLPE, D.A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. **Journal of Pharmaceutical Science**, v.97, n.2, p.712-725, feb. 2008.

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

WASAN, K.M.; ROSENBLUM, M.G.; CHEUNG, L.; BERESTEIN-LOPEZ, G. Influence of lipoproteins on renal cytotoxicity and antifungal activity of Amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.38, n.2, p.223-227, feb.1994.

YANG, C.; KAZANIETZ, M.G. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v.24, n.11, p.602-608, nov. 2003.

YU, M.; TANG, Y.; GUO, M.; ZHANG, Q.; SAIF, Y.M. Characterization of a small round virus associated with the poult enteritis and mortality syndrome. [Avian Diseases, v.44, n.3, p.600-610, jul-sept. 2000.](#)

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

ZUCCO, F.; DE ANGELIS, I.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicology in vitro**, v.18, n.2, p.153 -163, apr. 2004.