UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE – UFCSPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Caroline Rodrigues da Silveira

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA BILIRRUBINA E DOS ÁCIDOS BILIARES EM CÉLULAS RENAIS CULTIVADAS

Porto Alegre

2020

Caroline Rodrigues da Silveira

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA BILIRRUBINA E DOS ÁCIDOS BILIARES EM CÉLULAS RENAIS CULTIVADAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof.ª Drª. Liane Nanci Rotta

Co-orientadora: Prof.ª Drª. Dinara Jaqueline Moura

Porto Alegre

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Silveira, Caroline Rodrigues da

Avaliação da toxicidade da Bilirrubina e dos ácidos biliares em células renais cultivadas / Caroline Rodrigues da Silveira. - 2021.
56 p. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde, 2021.

Orientadora: Liane Nanci Rotta.
Coorientadora: Dinara Jaqueline Moura.

1. Síndrome Hepatorrenal. 2. Toxicidade. 3. Bilirrubina. 4. Ácidos e sais biliares. I. Rotta, Liane Nanci. II. Moura, Dinara Jaqueline. III. Título.

UFCSPA - Biblioteca Paulo Lacerda de Azevedo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre e o PPG Ciências da Saúde pelos laboratórios, aulas, orientações e apoio para conclusão deste projeto.

Gostaria de agradecer também aos meus pais, meu irmão e irmã, cunhado e cunhada que sempre me incentivaram a continuar estudando e o mais importante, a estudar o que eu gosto. Obrigada por todas as caronas cedo para o laboratório ou para aula, pelas caronas para casa de noite depois das aulas, por sempre me dizer que ia dar certo mesmo vocês não entendendo nada dos experimentos.

Gostaria de agradecer também às minhas orientadoras, Prof.ª Dr.ª Liane Nanci Rotta e Prof.ª Dr.ª Dinara Jaqueline Moura, vocês foram indispensáveis no desenvolvimento do projeto, com dicas e ensinamentos sobre as metodologias desenvolvidas, sobre o cultivo das células e escrita da dissertação e do artigo.

Também deixo meu muito obrigada ao meu aluno de iniciação científica, Marcelo, por estar sempre disposto a me ajudar nos experimentos e nas horas que eu não pude estar presente no laboratório.

Também agradeço às minhas amigas que me apoiaram em cada etapa do projeto, dando dicas e conselhos sobre resolver dúvidas e questões, ou até mesmo na execução dos experimentos. Vocês são muito importantes para mim e tenho certeza que juntas sempre teremos muito sucesso, cada uma na sua area de especialidade, uma completando a outra.

“Na vida, não existe nada a temer, mas a entender.”

(Marie Curie)

RESUMO

Contextualização: A síndrome hepatorrenal é definida pela presença de lesão renal aguda secundária à lesão hepática. Novos *insights* sugerem que fatores tubulotóxicos não hemodinâmicos, como endotoxinas (bilirrubina) e ácidos biliares (ABs), podem mediar a lesão renal do parênquima. Em geral, a presença de um maior número de partículas urinárias (células epiteliais tubulares renais e cilindros granulares) de origem renal pode ser observada nos grupos com hiperbilirrubinemia/hiperbilirrubinúria e lesão tubular. Já se sabe também da nefrotoxicidade que alguns fármacos podem apresentar, como a cisplatina que é utilizada contra turmores sólidos, porém pode induzir à injúria nos túbulos renais. **Objetivo:** Avaliar a citotoxicidade e o potencial antioxidante da bilirrubina e ABs em cultura de células renais HEK293T, o tipo de morte celular e o potencial protetor desses compostos frente a outros compostos nefrotóxicos. **Metodologia:** A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de vermelho neutro, o estresse oxidativo foi analisado por meio da marcação mitocondrial com *mitosox* e *mitostatus*, o tipo de morte celular foi avaliado utilizando a marcação com anexina e iodeto de propídio e a concentração do tratamento intracelular e no meio de cultura de bilirrubina e ABs foi determinada por HPLC. **Resultados**: O tratamento agudo (24h) com bilirrubina reduziu a viabilidade celular, mas apresentou maior viabilidade com 100 µM (96 ± 8%, p <0,0001) e apresentou maior toxicidade no tratamento crônico (72h) com 100 µM (25,6 ± 5,6; p <0,001). ABs primários (ácido cólico - CA e quenodeoxicólico - CDCA) induzem menor toxicidade a 40 µM (CA: 150 ± 33,7%, p <0,005 CDCA: 281 ± 143%, p <0,0001) em comparação com ABs secundários e compostos (ácido desoxicólico - DCA, ursodeoxicólico - UDCA e taurocólico - TCA) a 60 µM (DCA: 87 ± 8%, p <0,001; UDCA 86 ± 8%, p <0,001; TCA 95 ± 23%, p <0,001), em 24h. Já nas concentrações maiores, 80 µM e 100 µM, os ácidos não mostraram diminuir a viabilidade celular. O tratamento celular com bilirrubina ou ABs, prévio à cisplatina (10µg), induziu aumento da viabilidade celular com CA (133 ± 62%; p <0,005), em relação ao controle positivo, indicando efeito protetor; no entanto, as células tratadas com os outros ABs e bilirrubina também mostraram viabilidade positiva (CDCA: 110 ± 61%, p = 0,01; TDCA: 99 ± 63%, p <0,005; BILI: 88 ± 27 %, p <0,005). Quando quantificados por HPLC, bilirrubina e ABs apresentaram maior concentração no meio de cultura do que nas células (tratamento 24h). Nem a bilirrubina nem os ABs mostraram produção de estresse oxidativo, em comparação ao controle positivo (células tratadas com cisplatina). O tratamento celular com bilirrubina apresentou maior quantidade de morte celular por necrose (83 ± 3%; p <0,05), enquanto os ácidos biliares não demonstraram grande morte celular significante. **Conclusão:** a bilirrubina mostrou maior ação tóxica em células HEK293T, quando comparada aos ABs. A morte celular por necrose é um fator que contribui para o desenvolvimento de lesão renal aguda em doenças hepáticas, principalmente na exposição crônica a este composto e se relaciona aos achados observados no sedimento urinário, em estudos prévios. Dependendo da estrutura dos ABs, eles podem ter ação protetora sobre as células renais, assim como a concentração de bilirrubina, que nos tratamentos agudos tem se mostrado protetora para as células e no tratamento crônico, mostrou-se tóxica.

Palavras-chave: *Síndrome Hepatorenal, Toxicidade, Bilirrubina, Ácidos Biliares.*

ABSTRACT

Background: Hepatorenal syndrome is defined by the presence of acute kidney damage secondary to liver damage. New insights suggest that non-hemodynamic tubulotoxic factors, such as endotoxins (bilirubin) and bile acids (ABs), can mediate renal injury to the parenchyma. In general, the presence of a greater number of urinary particles (renal tubular epithelial cells and granular cylinders) of renal origin can be observed in groups with hyperbilirubinemia / hyperbilirubinuria and tubular injury. It is also already known of the nephrotoxicity that some drugs can present, such as cisplatin, which is used against solid tumors, but can induce damage to the renal tubules. **Objective:** To evaluate the cytotoxicity and antioxidant potential of bilirubin and ABs in HEK293T renal cell culture, the type of cell death and the protective potential of these compounds against other nephrotoxic compounds. **Methodology:** cell viability was measured by neutral red, oxidative stress by mitosox and mitostatus assays, the type of cell death was acessed by annexin and propidium iodide and the cell and medium concentration of bilirubin and BAs was mesured by HPLC. **Results:** Acute treatment (24h) with bilirubin reduced the cell viability but showed greater viability at 100 µM (96±8%, $p<0.0001$) between the studied concentration and showed a greater toxicity in chronic treatment (72h) at 100 µM (25.6±5,6; $p<0.001$). Primary BAs (cholic and chenodeoxycholic acid) have less toxicity at 40 µM (CA: 150±33.7%, $p<0.005$ CDCA: 281±143%, $p<0,0001$) and compared with secondary and compound BAs (deoxycholic, ursodeoxycholic and taurocholic acid) at 60 µM (DCA: 87±8%, $p<0.001$; UDCA: 86±8%, $p<0.001$; TCA: 95±23%, $p<0.001$), in 24h. At higher concentrations, 80 µM and 100 µM, acids did shown to decrease cell viability. The cell treatment with bilirubin or BAs, previous to the cisplatin (10µg), shows greater cell viability with cholic acid (133±62%; $p<0,005$), compared to positive control, indicating a protective effect; however the treated cells with the other BAs and bilirubin also showed positive viability (CDCA: 110±61%, $p=0,01$; TDCA: 99±63%, $p<0,005$; BILI: 88±27%, $p<0,005$). When quantified in chromatography, bilirubin and BAs presented more concentration in the culture medium, than in the cells (24h treatment). Neither bilirubin nor BAs showed oxidative stress production, compared to positive control (cells treated with cisplatin). The cell treatment with bilirubin showed a greater amount of cell death due to necrosis (83±3%; $p<0.05$), while bile acids did not show significant significant cell death. **Conclusion:** bilirubin shows more toxic action on HEK293T cells, than BAs. The cell death by necrosis is a factor that contribute to AKI development in liver diseases, specially in chronic exposition to this compound and it is related to the findings observed in urinary sediment, in previous studies. Depending on the structure of BAs they can have a protective action on renal cells, as well as the concentration of bilirubin, which in acute treatments has shown to have a protective role for cells and in chronic treatment, it showed to be toxic.

Keywords: *Hepatorenal Syndrome, Toxicity, Bilirubin, Bile Acids*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Visão multissistêmica dos processos envolvidos na SHR do tipo 1 e interação com mecanismos de LRA na cirrose **14**
Figura 2. Modelo proposto de como acontece a evolução temporam da SHR do tipo 1 ..... **15**
Figura 3. Estrutura da bilirrubina **22**
Figura 4. Estruturas da bilirrubina conjugada com um ou dois ácidos glicurônicos. 1: diglucuronido de bilirrubina, 2: monoglucuronídeo de bilirrubina (c-12), 3: monoglucuronídeo de bilirrubina (c-8). **23**
Figura 5. Transformação da biliverdina em bilirrubina **24**
Figura 6. Degradação enzimática pela heme oxigenase **25**
Figura 7. Esquema que demonstra como são as moléculas anfipáticas dos ácidos biliares, a parte hidrofóbica, em azul, e a parte hidrofílica, em laranja **27**
Figura 8. Vias de produção dos ácidos biliares **28**
Figura 9. Etapa limitante da produção de ácidos biliares **29**
Figura 10. Estrutura dos ácidos biliares primários **30**
Figura 11. Estrutura dos aminoácidos com os quais os ácidos biliares se conjugam **30**
Figura 12. Estrutura dos ácidos biliares compostos (sais biliares) **31**
Figura 13. Estrutura dos ácidos biliares secundários: A – ácido litocólico; B – ácido desoxicólico; C – ácido ursodesoxicólico **31**
Figura 14. Reações que acontecem na geração das espécies reativas de oxigênio (ROS) **37**
Figura 15. Efeitos cardiovasculares e renais da bilirrubina **40**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definição e classificação da lesão renal aguda pelos critérios do RIFLE e AKIN **12**

Tabela 2. Classificação da doença renal crônica (DRA), causada pela síndrome hepatorrenal **17**

LISTA DE ABREVIATURAS

AB: ácidos biliares.
AKIN: rede de lesões renais agudas.
BNC: bilirrubina não conjugada.
CA: ácido cólico.
CDCA: ácido quenodesoxicólico.
CETR: células epiteliais tubulares renais.
CG: cilindros granulares.
cGMP: monofosfato cíclico de guanosina.
CPT: capilares peritubulares.
CYP: citocromo.
DCA: ácido desoxicólico.
DHEF: doença hepática de estágio final.
DNA: ácido desoxirribonucleico.
DRA: doença renal aguda.
DRC: doença renal crônica
EO: estresse oxidativo.
Hek293t: células embrionárias renais humanas.
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência.
IC50: 50% da concentração inibitória.
IHA: insuficiência hepática aguda.
LCA: ácido litocólico.
NADPH: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.
NCB: Nefropatia por Cilindros de Bile
NTA: necrose tubular aguda.
RNS: espécies reativas de nitrogênio.
ROS: espécies reativas de oxigênio.
SB: sais biliares.
SHR: síndrome hepatorrenal.
SOD: superóxido dismutase.
TRS: terapia renal substitutiva
TCA: ácido taurocólico
TUDCA: ácido tauroursodesoxicólico.
UDCA: ácido ursodesoxicólico.
VN: vermelho neutro.

SUMÁRIO

1. REFERENCIAL TEÓRICO 10
1.1 Complicações Renais Pós-Hepáticas 10
1.1.1 Fisiopatologia da Síndrome Hepatorrenal e Lesão Renal Aguda 12
1.1.2 Classificação da Síndrome Hepatorrenal 15
1.1.3 Diferenciação da Síndrome Hepatorrenal e Lesão Renal Aguda 17
1.2 Informações Diagnósticas Hepáticas e Renais Observadas na Análise de Urina de Rotina 18
1.2.1 Insuficiência Renal Aguda Hepatorrenal 20
1.2.2 Nefropatia por Cilindros de Bile 20
1.3 Metabolismo da Bilirrubina 21
1.4 Metabolismo de Ácidos Biliares 26
1.4.1 Classificação dos Ácidos Biliares 29
1.4.2 Ácidos Biliares em Doenças 32
1.5 Relação da Bilirrubina e Ácidos Biliares com a Lesão Renal 32
1.6 Estresse Oxidativo 35
1.6.1 Principais Funções das Espécies Reativas 36
1.6.2 Principais Funções dos Sistemas Antioxidantes 38
1.6.3 Bilirrubina e o Estresse Oxidativo 39
1.6.4 Ácidos Biliares e o Estresse Oxidativo 41
1.7 Tipos de Morte Celular 42
1.8 Células renais e a Cisplatina 42
2. JUSTIFICATIVA 45
3. OBJETIVOS 47
3.1 Objetivo Geral 47
3.2 Objetivos Específicos 47
4. REFERÊNCIAS 48
5. ARTIGO CIENTÍFICO 57
6. CONCLUSÃO 88
7. ANEXOS 89

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Disfunção Renal Pós-Hepática

A disfunção renal é comum e desafiadora em pacientes com doença hepática em estágio final (DHEF), decorrente principalmente de alterações hemodinâmicas observadas em pacientes com cirrose, ascite e hipertensão portal é especialmente importante quando se considera o transplante de fígado (CÁRDENAS; ARROYO, 2003; GINÈS *et. al.*, 2007; ISRAELSEN *et. al.*, 2015; IWATSUKI *et. al.*, 1973). Se estima que 20-25% dos pacientes com DHEF terão algum tipo de disfunção renal durante o curso da doença hepática e o espectro de doença renal pode variar, desde a doença renal aguda (DRA), reversível, como a azotemia pré-renal ou a necrose tubular aguda (NTA), até a doença renal crônica (DRC), irreversível (GINÈS; SCHRIER, 2009).

Pacientes com doenças hepáticas severas e falência renal têm um alto risco de morte, frequência aumentada de complicações e sobrevivência reduzida após o transplante, quando comparados com aqueles que não tem falência renal (IWATSUKI *et. al.*, 1973; MOREAU; LEBREC, 2003; SALERNO *et. al.*, 2007). Nos anos recentes, progressos substanciais têm sido feitos para o entendimento da patogênese e história natural da falência renal nas doenças hepáticas severas. Além disso, novas intervenções clínicas podem ajudar na prevenção e no manejo desta complicação (VELEZ *et. al.*, 2020).

A cirrose é uma das principais causas de insuficiência hepática e a insuficiência renal aguda (IRA) é uma complicação comum e devastadora em pacientes portadores destas patologias. O desenvolvimento da IRA está geralmente associado a complicações da cirrose (como a peritonite bacteriana espontânea) e ocorre em até 19% dos pacientes cirróticos hospitalizados. Já a Síndrome Hepatorrenal (SHR) surge como uma complicação da cirrose hepática (incidência: 8-40%), corresponde a 11% dos casos de IRA em pacientes hospitalizados com cirrose e ascite, e tem sido muito associada à mortalidade prodigiosa (BAGSHAW *et. al.*, 2006; CHAWL *et. al.*, 2008; CLAURE-DEL GRANADO *et. al.*, 2011). Caso o paciente apresente ascite, a probabilidade de que ocorra SHR aumenta, com 20% e 40% dos pacientes desenvolvendo a SHR em até um ano e até o quinto ano, respectivamente (DAMERON, 2011).

Devido à necessidade de se identificar a IRA presente em casos de pacientes cirróticos, houve incorporação da medida da concentração da creatinina sérica como uma das três variáveis (bilirrubina, creatinina séricas e tempo de protrombina – Relação Normatizada Internacional – RNI) compreendendo o modelo de *score* para doença hepática terminal (PERAZELL *et. al.*, 2008).

As causas de insuficiência renal (IR) são altamente tratáveis e não são confundidas com a SHR, uma vez que esta última é caracterizada por um processo diferente e separado das outras causas frequentes de IR. O diagnóstico de SHR é feito por exclusão, sendo que esse diagnóstico somente será conclusivo após o tratamento para as causas de IR ter falhado (DAMERON, 2011).

A IRA é comumente identificada e definida pelo declínio rápido da função glomerular, apesar de não existir um consenso na definição desta doença, fazendo com que seja difícil a obtenção de informações sobre a epidemiologia da doença. O grupo ADQI (Acute Dialysis Quality Initiative - 2004) propôs uma classificação denominada RIFLE – risk (R: risco), injury (I: injúria), failure (F: falência), loss (L: perda persistente da função renal) e o grupo *Acute Kidney Injury Network* (AKIN, 2007) propôs critérios para a doença renal em estágio final.

A utilização de diferentes definições de IRA dificulta a comparação de estudos, a análise da evolução dos pacientes, bem como a comparação de diferentes estratégias terapêuticas e de tratamentos dialíticos. Uma rede internacional de especialistas (*Kidney Disease Improving Global Outcomes* - KDIGO) propôs uma nova definição e classificação de IRA, a fim de uniformizar este conceito para efeitos de estudos clínicos e, principalmente, prevenir e facilitar o diagnóstico desta síndrome, na tentativa de diminuir a alta morbidade e mortalidade ainda encontrada atualmente (KDIGO, 2012). Este grupo multidisciplinar internacional propõe os seguintes critérios mínimos, baseados na dosagem sérica da creatinina e no volume urinário (Tabela 1):

i. Elevação da creatinina sérica em ≥ 0,3 mg/dL dentro de 48 horas; ou
ii. Elevação da creatinina sérica em ≥1,5 vezes o valor basal que for conhecido ou presumido e que tenha ocorrido dentro de 7 dias; ou
iii. Volume urinário <0,5 mL/Kg/hora por 6 horas.

Tabela 1. Definição e classificação da lesão renal aguda pelos critérios do RIFLE e AKIN. (Adaptado de STEVENS *et. al.*, 2012).

	AKIN	**DÉBITO URINÁRIO (COMUM EM AMBOS)**	**RIFLE**	
	Creatinina sérica		**Creatinina ou TFG**	
1	Elevação de 1,5 vezes o valor de creatinina ou elevação de pelo menos 0,3 mg/dL.	< 0,5 mL/Kg/h por 6h	**R**	Elevação de 1,5 vezes o valor de creatinina o redução da TFG >25%.
2	Elevação de 2 vezes o valor de creatinina.	< 0,5 mL/Kg/h por 12h	**I**	Elevação de 2 vezes o valor de creatinina ou redução da TFG >50%.
3	Elevação de 3 vezes o valor de creatinina ou creatinina >4,0 mg/dL, com elevação de pelo menos 0,5 mg/dL.	< 0,3 mL/Kg/h por 24h ou anúria por 12h.	**F**	Elevação de 3 vezes o valor de creatinina ou redução da TFG >75% ou creatinina maior que 4,0 mg/dL com elevação de pelo menos 0,5 mg/Dl.
			L	Perda de função por 4 semanas.
			E	Necessidade de diálise por mais de 3 meses.

Os diferentes estágios da lesão renal aguda (LRA) auxiliam na determinação de gravidade da doença. O estadiamento é recomendado pelo KDIGO, em virtude de o conjunto de evidências atuais associar o estágio da LRA à necessidade de terapia renal substitutiva com risco, a longo prazo, de desenvolvimento de doença cardiovascular, evolução para DRC e mortalidades intra e extra-hospitalares, mesmo após a aparente resolução da LRA.

O valor alterado da creatinina não pode ser considerado o melhor marcador, pois ele se mantém normal entre 24 e 72 horas após a lesão renal. Além disso, ele também terá influência de várias características que não estão relacionadas com lesão no rim, como idade, raça, sexo, peso corporal, ingesta de proteínas, entre outros (NEGI *et. al.*, 2018). Por isso ainda é muito difícil calcular os números de pacientes com DRA e a epidemiologia da doença.

1.1.1 Fisiopatologia da Síndrome Hepatorrenal e Lesão Renal Aguda

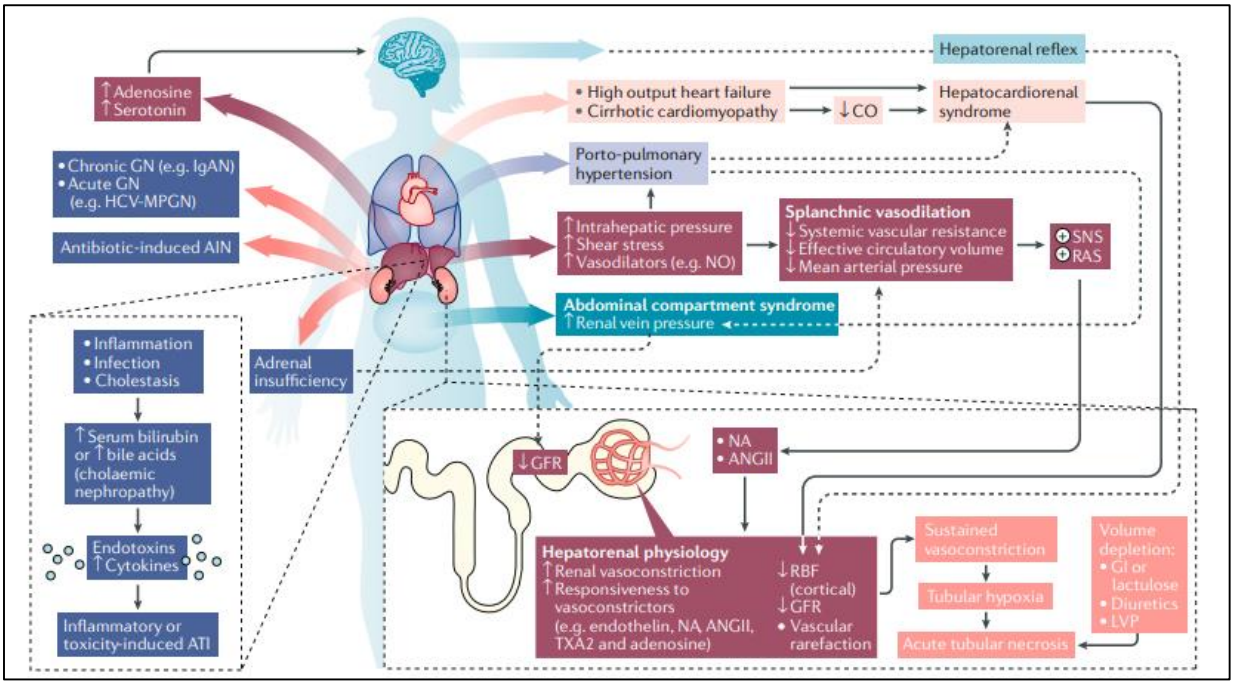
A SHR é definida pela presença de doença hepática aguda ou crônica, caracterizada por hiperbilirrubinemia, com avançada insuficiência hepática e prejuízo

na função renal (insuficiência renal oligúrica) (PERAZELL *et. al.*, 2010). A SHR pode se desenvolver na ausência de qualquer fator precipitante ou seguir-se a eventos que reduzam o volume sanguíneo efetivo, como sangramento gastrointestinal, vômitos e diarreias. Na SHR ocorre marcada vasoconstrição intrarrenal que resulta em um prejuízo funcional dos rins, sem anormalidades estruturais contributivas para a disfunção renal. É caracterizada por achados clínicos e laboratoriais de intensa hipoperfusão renal: oligúria, hiponatremia, hiponatriúria, alta osmolaridade urinária e incremento de ureia e creatinina séricas (PERAZELL *et. al.*, 2010; SALERNO *et. al.*, 2014; WONG *et. al.*, 2011).

A fisiopatologia envolvida na LRA inclui diversos fatores que podem ser associados à cirrose e à SHR. O fator mais influente pode ser as mudanças hemodinâmicas observadas em pacientes com cirrose, ascite e hipertensão portal. Também podem ocorrer diminuição do débito cardíaco, inflamação sistêmica, baixa resistência vascular, insuficiência adrenal, entre outros (ISRAELSEN *et. al.*, 2015).

O centro da SHR é a falta de fluxo sanguíneo renal, causada pela hipertensão portal e vasodilatação arterial levando à uma superativação do sistema nervoso simpático (SNS), assim como do sistema renina-angiotensina (SRA) e como consequência, leva à vasoconstrição renal (Figura 1). Isso também conduz à uma maior reatividade vascular e o reflexo hepatorrenal pode reduzir o fluxo sanguíneo e a taxa de filtração glomerular e aumento recíproco na reabsorção tubular de sódio proximal. Por fim, existem gatilhos inflamatórios como as endoxinas, e gatilhos tóxicos, como os colêmicos, que contribuem para que aconteça a lesão tubular aguda (VELEZ *et. al.*, 2020).

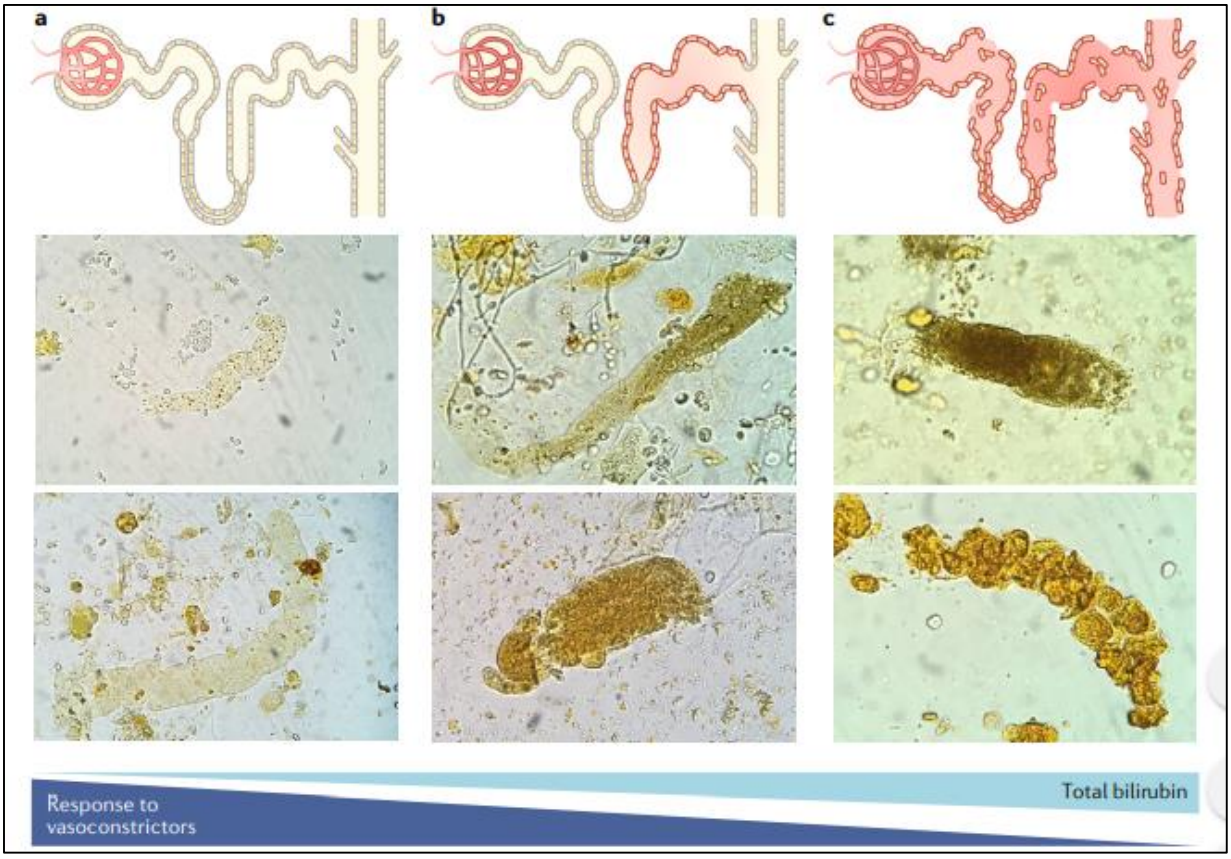
Figura 1. Visão multissistêmica dos processos envolvidos na SHR do tipo 1 e interação com mecanismos de LRA na cirrose (adaptado de VELEZ *et. al.*, 2020).



A resposta da SHR do tipo 1 ao tratamento de vasoconstrição diminui quando ocorre aumento de bilirrubina sérica (NAZAR *et. al.*, 2010), levando a uma LRA causada por mecanismos parecidos ao da nefropatia colêmica. Poloni *et. al.* (2019) mostraram que em pacientes com maiores concentrações de bilirrubina urinária apresentaram um sedimento urinário com maior número de cilindros granulosos (elementos formados intrinsecamente no rim) e de células epiteliais tubulares renais (RTECs – de origem renal), sugerindo uma associação entre hiperbilirrubinemia/hiperbilirrubinúria e injúria tubular, independente de IRA (POLONI *et. al.*, 2019).

Em modelos animais de cirrose, também se demonstrou que o desenvolvimento da doença é dependente do tempo da lesão tubular intrínseca (VARGA *et. al.*, 2018). Todos estes estudos apontam para que a patogênese da SHR do tipo 1 seja melhor entendida como uma evolução da insuficiência renal, que se sobrepõem a distúrbios funcionais (Figura 2).

Figura 2. Modelo proposto de como acontece a evolução temporal da SHR do tipo 1. A: demonstra túbulos em condição normal; B: demonstra túbulo com pequena lesão; C: demonstra túbulo com lesão por toda extensão (Adapado de VELEZ *et. al.*, 2020).



1.1.2 Classificação da Síndrome Hepatorrenal

A disfunção renal é um acontecimento comum nos pacientes que apresentam doença avançada no fígado, como cirrose ou hipertensão portal. Apresentar a disfunção renal, secundária à patologia hepática, está também associada ao aumento na mortalidade e na morbidade da SHR. Por ser de causa multifatorial, o tratamento da disfunção renal fica mais complicado e limitado. Geralmente os pacientes que têm o diagnóstico de disfunção renal, sem uma doença renal intrínseca, são considerados como tendo SHR com dano agudo renal (ADEL AMIN *et. al.*, 2019).

A SHR é classificada em dois tipos: 1 e 2. A SHR tipo 1 tem um curso rápido, com a concentração sérica de creatinina >2,5 mg/dL dentro de duas semanas, enquanto a SHR tipo 2 se desenvolve durante meses (progressão lenta, com um moderado declínio da taxa de filtração glomerular, e creatinina sérica entre 1,5 e 2,5 mg/dL). A SHR do tipo 1 irá acontecer quando o paciente possui tanto hipertensão

portal, quanto cirrose avançada, sendo associada à uma alta mortalidade. Esse tipo de LRA pode ser descrita como um distúrbio funcional, podendo afetar até mesmo a vasculatura renal.

O atual paradigma da disfunção renal na SHR é primariamente atribuído à marcada vasodilatação esplênica/sistêmica, que resulta em uma redução da taxa de filtração glomerular e consequente aumento na reabsorção tubular de sódio (CÁRDENAS; ARROYO, 2003; PERAZELL, 2008). Atualmente, fatores tóxicos aos túbulos (não hemodinâmicos) tais como endotoxinas e ácidos biliares, são relacionados com lesão parenquimatosa. Isso indica que fatores geralmente associados à SHR (hemodinâmicos) e fatores não tradicionais, podem contribuir em conjunto para o desenvolvimento de LRA nestes pacientes com cirrose (VELEZ *et. al.*, 2020).

Assim, é necessário incorporar a influência dos cilindros pigmentados por bilirrubina (fator tóxico) neste contexto clínico. Não se sabe quando os cilindros pigmentados pela bilirrubina se formam durante este processo de dano, porém, a probabilidade aumenta com a exposição prolongada a altas concentrações de bilirrubina sérica, que pode ser superior 20 mg/dL (PERAZELL, 2010). Além disso, a classificação tradicional tem utilizado o *cut off* de 1% para a excreção fracionada de sódio (Na+) a fim de diferenciar entre injúria pré-renal (incluindo a SHR) e injúria renal intrínseca, especialmente aquela causada por NTA (ALSAAD; WADEI, 2016). Entretanto, este teste tem baixa sensibilidade e especificidade para diferenciar SHR e LRA.

Em estudo avaliando 2.675 pacientes com diferentes concentrações de bilirrubina urinária (Grupo 1 (negativo) – 1.500 pacientes; Grupo 2 (1+) – 566 pacientes; Grupo 3 (2+) – 318 pacientes e Grupo 4 (3+) – 291 pacientes), Poloni *et. al.* (2019) observaram que quanto maior a concentração de bilirrubina sérica e urinária, menor a concentração sérica de sódio e albumina, e os biomarcadores hepáticos (AST, ALT, ALP, GGT, LDH, bilirrubina direta e bilirrubina total) séricos mostraram uma relação direta com a detecção de bilirrubina urinária.

Atualmente a classificação da LRA em pacientes com SHR baseia-se apenas na concentração de creatinina sérica, porém outros fatores (como massa corporal e hidratação) podem influenciar esse parâmetro (ADEL AMIN *et. al.*, 2019). Em função disso, foi criado um novo sistema de classificação do estadiamento da doença renal

em pacientes com SHR, que leva em consideração qualquer alteração na concentração de creatinina sérica num dado período de tempo (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação da DRA causada pela SHR.

Definição	Aumento da creatinina sérica ≥ 0,3mg/dL dentro de 48 horas, ou aumento de ≥ 50% de creatinina sérica da linha de base ocorrida em sete dias.
Estágios da disfunção renal aguda (DRA) em pacientes com SHR	1: aumento de creatinina sérica ≥ 0,3 mg/dL (26,5 mmol/L) ou aumento ≥ 1,5 até 2 vezes da linha de base. 2: aumento de creatinina sérica > 2 até 3 vezes da linha de base. 3: aumento de creatinina sérica > 3 vezes, da linha de base, ou ≥ 4,0 mg/dL (353,6 mmol/L) com início da terapia de substituição renal.

1.1.3 Diferenciação de Síndrome Hepatorrenal e Lesão Renal Aguda

No diagnóstico diferencial de SHR deve-se considerar a ocorrência de insuficiência renal aguda (IRA) pré-renal ou necrose tubular aguda (NTA). Ainda hoje, a diferenciação entre SHR e NTA permanece difícil e as terapias e prognóstico para IRA pré-renal e NTA, diferem substancialmente. Assim, a diferenciação clínica precoce e a correta identificação são importantes. A biópsia renal permanece como o método padrão-ouro para identificar doença renal parenquimatosa, entretanto este procedimento pode ser perigoso visto que os pacientes apresentam coagulopatias e trombocitopenia (GINÈS *et. al.*, 2007; GINÈS; SCHRIER, 2009; MOREAU; LEBREC, 2003; SALERNO *et. al.*, 2007).

Até o momento não existe um exame padrão-ouro para definição e diferenciação da NTA e da SHR. O que se tem na literatura (BETJES; BAJEMA, 2006) é:

NTA

i. História de uso corrente ou recente de drogas nefrotóxicas ou meios de contraste;

ii. Presença de choque;
iii. Cilindros granulosos ou debris no sedimento urinário;
iv. Proteinúria > 500 mg/ dia.

SHR

i. História de desidratação, excesso de diuréticos ou infecções bacterianas;
ii. Presença de sedimento urinário normal;
iii. Proteinúria <500 mg/dia;
iv. Ultrassom renal normal.

Se, após a retirada dos diuréticos e da expansão do volume plasmático com albumina não houver resposta, classifica-se como SHR.

A biópsia renal seria, de fato, o melhor método para identificar a ocorrência ou não de NTA, entretanto, este procedimento raramente é feito nos doentes hepáticos devido à grande frequência de coagulopatias. Sem esta análise não há como provar ou excluir NTA de maneira definitiva.

1.2 Informações Diagnósticas Hepáticas e Renais Observadas na Análise de Urina de Rotina

A análise de urina de rotina, nomeada como Exame Qualitativo de Urina (EQU) (no Rio Grande do Sul) compreende a análise das amostras de urina por meio do uso de tira reativa, associada à avaliação microscópica do sedimento urinário (sedimentoscopia). É um exame com baixo custo e de simples execução que, no entanto, demanda grande tempo de treinamento do analista clínico na aquisição dos conhecimentos básicos para correta identificação dos elementos do sedimento, bem como para correta interpretação e correlação das informações que observadas na análise da tira reativa e na sedimentoscopia urinária.

A análise microscópica urinária é um dos testes que mais comumente é utilizado para o diagnóstico diferencial de doença LRA. O diagnóstico de LRA é primariamente baseado na medida da concentração de creatinina sérica, nitrogênio ureico sanguíneo e medida do volume urinário. Adicionalmente, a bioquímica e a microscopia urinária fornecem informação vital para diferenciar DRA nas categorias

tradicionais de azotemia pré-renal (BOCK, 1998; CHAWLA *et. al.*, 2008; MILLER *et. al.*, 1978).

Em pacientes com doença hepática subjacente, os cilindros urinários de qualquer tipo (hialinos, granulares, cerosos ou celulares) podem ser corados pela cor amarela típica da bilirrubina, normalmente em excesso na SHR. Os cilindros pigmentados de bilirrubina são observados na urina de pacientes com icterícia, associados ao aumento da bilirrubina direta (conjugada) (FOGAZZI, 2010).

No contexto do doente hepático, a análise físicoquímica do que por meio de tiras reagentes apresenta, basicamente, áreas reativas para três informações que podem ser de grande utilidade: proteínas, bilirrubina e urobilinogênio (caracter isticamente positivos). Neste contexto, a sedimentoscopia urinária, de forma complementar pode auxiliar tanto em situações onde não se observam elementos de origem renal (como por exemplo células epiteliais tubulares renais e cilindros) assim excluindo assim a presença de dano intrínseco ao parênquima renal, como com a observação e quantificação de elementos oriundos dos rins ajudando assim na identificação de dano ao epitélio renal (POLONI *et. al.*, 2019).

Células epiteliais tubulares renais (CETR) livres e no interior de cilindros, contendo cristais de bilirrubina (muito pequenos) podem ser observados no sedimento urinário de pacientes com hiperbilirrubinemia/hiperbilirrubinúria (ELSOM, 1937). O uso de filtros de luz polarizada auxilia na identificação destas estruturas, especialmente quando se move o condensador para uma posição superior.

Em estudo anterior de nosso grupo, um perfil particular do sedimento urinário (consistindo de cilindros granulares, cilindros contendo CETR, e CETR livres), foi associado com um aumento na concentração de bilirrubina urinária. Além disso, cilindros hialinos (indicativos de hipoperfusão sem injúria renal) foram observados no grupo com menor concentração de bilirrubina, sugerindo que o grupo com maior concentração de bilirrubina sofreu alterações estruturais renais, decorrentes da toxicidade relacionada à bilirrubina e/ou ácidos biliares (isquemia, toxicidade direta, formação de cilindros biliares) enquanto no grupo com menor concentração de bilirrubina, a função tubular foi preservada, mesmo na presença de hipoperfusão (POLONI *et. al.*, 2019).

Para verificar o conteúdo intracelular das CETR contendo cristais (observadas no sedimento urinário) foi realizada a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) onde foi possível observar, no interior das CETR, estruturas

intracitoplasmáticas fortemente elétron-densas no interior das CETR. Entretanto, não foi possível determinar a real composição química dos cristais observados no estudo (POLONI *et. al.*, 2019).

1.2.1 Insuficiência Renal Aguda Hepatorrenal

A IRA Hepatorrenal é caracterizada por perda de função renal (Clearance de Creatinina<60mL/min ou Creatinina sérica >1,5 mg/dL), associada à ausência de outras causas de IRA, ausência de melhora após expansão plasmática, ausência de melhora após suspensão de diuréticos, proteinúria < 500 mg/dia, ausência de obstrução urinária e ausência de IRA parenquimatosa (MILLER, 1978).

Todos os critérios acima citados devem estar presentes para a definição do diagnóstico. Os seguintes critérios adicionais podem compor o quadro (podem estar presentes ou não): diurese < 500 mL/dia; sódio urinário < 10 mEq/L; osmolalidade urinária > plasmática; sódio sérico < 130 mEq/L; hemácias na urina > 50 p/campo microscópico (MILLER, 1978).

1.2.2 Nefropatia por Cilindros de Bile

A condição clínica “Nefropatia por Cilindros de Bile” (NCB) é considerada rara e pouco compreendida. É caracterizada por insuficiência renal progressiva na presença de níveis elevados de sais biliares e hiperbilirrubinemia. Níveis elevados de bilirrubina total (>20 mg/dL) são reportados nos casos de NCB. Ambas bilirrubinas (direta e indireta) podem estar envolvidas, sugerindo uma disfunção hepatocelular primária. Biópsias renais nestes pacientes tipicamente mostram a formação de cilindros de bile na presença de níveis séricos elevados de bilirrubina e creatinina (ESSON; SCHRIER, 2002; KLAHR; MILLER, 1998).

Esta condição clínica representa um grande espectro de doenças, envolvendo desde mudanças leves e reversíveis em pacientes sem disfunção renal e hiperbilirrubinemia de curta duração, até doença progressiva irreversível naqueles com insuficiência renal associada à hiperbilirrubinemia severa e prolongada. O mecanismo exato como a bile e os sais biliares causam dano renal agudo em nível tubular permanece desconhecido, entretanto, vários mecanismos são considerados (KLAHR; MILLER, 1998). Durante a colestase, os hepatócitos exportam ácidos biliares

para prevenir dano intracelular, através da indução das bombas basolaterais de ácidos biliares. Os rins, de maneira similar, promovem mudanças no túbulo proximal para excretar o excesso de bile. Além disso, a inibição das bombas de Na-H, Na-K, Na-Cl por sais biliares sulfatados, nos túbulos proximais e na alça de Henle, resultam em mudanças de pH que podem aumentar a deposição de cristais de sais biliares, contribuindo para a formação de cilindros de bile, além de causarem toxicidade e dano tubular (FOGAZZI, 2010; JOHN; THULUVATH, 2015; KIDGO, 2012; KLAHR; MILLER, 1998; SINELLA *et. al.*, 2016).

Adicionalmente, acredita-se que a bilirrubina (em excesso nesta condição clínica) cause dano oxidativo nas membranas celulares das células dos túbulos e desacoplamento da fosforilação mitocondrial em nível celular (KLAHR; MILLER, 1998; NEEDHAM, 2003; SINGRI *et. al.*, 2003). É hipotetizada a existência de um limite para o transporte da bilirrubina nos túbulos proximais, onde ocorre a formação dos cilindros e consequente obstrução tubular (KLAHR; MILLER, 1998; KRITMETAPAK *et. al.*, 2018; PERAZELL, 2010).

Os achados primários na NCB incluem hipertrofia renal tubular, presença de cilindros pigmentados por bile dentro dos túbulos renais e ausência de patologia glomerular (KLAHR; MILLER, 1998, MOHAPATR *et. al.*, 2016; ROMAN *et. al.*, 2015). Outros achados incluem dano tubular com evidência de dilatação do lúmen e vacuolização citoplasmática, assim como a presença de cilindros granulosos (KLAHR; MILLER, 1998; MOHAPATR *et. al.*, 2016). Os achados na microscopia eletrônica incluem dilatação das cristas mitocondriais e acúmulo de ácidos biliares nos lisossomos. A presença de cilindros de bile é mais pronunciada nos segmentos distais dos néfrons, mas foi encontrada nos túbulos proximais com o aumento da severidade da hiperbilirrubinemia (ESSON; SCHRIER, 2002; KLAHR; MILLER, 1998). A deposição dos cilindros de bile foi observada em ambos túbulos (proximais e distais) juntamente com mudanças isquêmicas (KLAHR; MILLER, 1998).

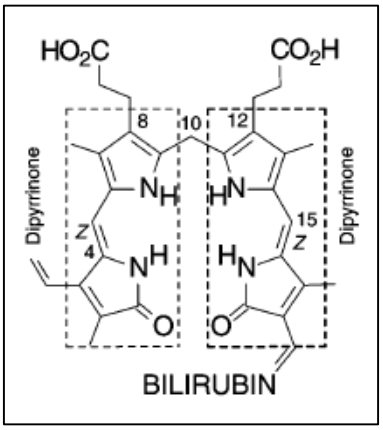
1.3 Metabolismo da Bilirrubina

A bilirrubina (Figura 3) é um pigmento amarelo solúvel em diversos solventes orgânicos, porém em soluções aquosas com pH fisiológico ela é pouco solúvel. Por ser um composto lipossolúvel, ela consegue atravessar a membrana de vários tecidos, causando interferência nos processos metabólicos. Por causa das ligações do ácido

propiônico com os grupos carboxila, a bilirrubina possui um pH em torno de 8, tornando-a fracamente ácida e assim, solúvel em base (SCHMID, 1972).

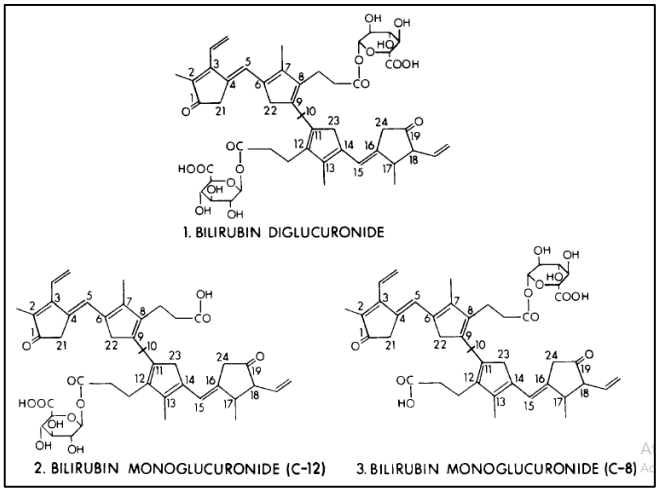
Existem dois tipos de bilirrubina: conjugada e não conjugada. A primeira é solúvel em água e excretada via bile, encontrada na urina apenas quando há dano hepático e é conjugada com ácido glicurônico nos hepatócitos. A segunda é insolúvel em solventes polares, como a água, e não é encontrada na urina, pois acontece ligação com a albumina, assim que é liberada, para transporte até o fígado (AGRAWAL *et. al.*, 2016).

Figura 3. Estrutura da Bilirrubina (Adaptado de DEY; LIGHTNER, 2008)



A conjugação acontece em dois passos: inicialmente a enzima UGT1A1 (glucuronosil transferase de uridina 1A1) catalisa a transferência de uma molécula do ácido glicurônico para um grupo carboxila da bilirrubina, formando o monoglicuronídeo de bilirrubina e posteriormente ocorre adição de outra molécula do ácido glicurônico em outro grupo carboxila, formando o diglicuronídeo de bilirrubina. Ambos os conjugados são solúveis em água, podendo ser excretados pela bile (Figura 4) (MENON *et. al.*, 2016).

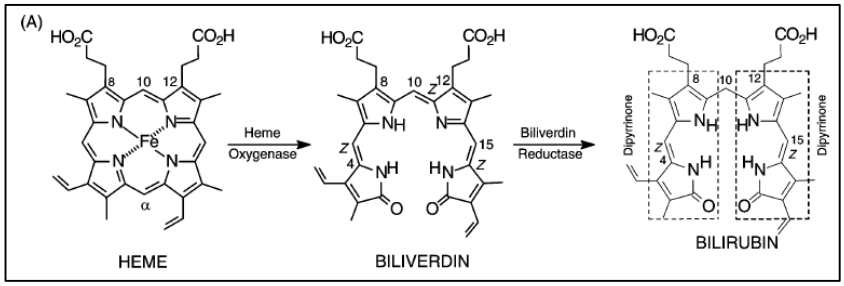
Figura 4. Estruturas da bilirrubina conjugada com um ou dois ácidos glicurônicos. 1: diglucuronido de bilirrubina, 2: monoglucuronídeo de bilirrubina (c-12), 3: monoglucuronídeo de bilirrubina (c-8) (Adaptado de CHOWDHURY *et. al.*, 1983).



Esse grupo enzimático que catalisa a reação de conjugação da bilirrubina, faz parte de uma família de enzimas encontradas no retí culo endoplasmático e envelope nuclear dos hepatócitos. Porém, elas também são encontradas no intestino e nos rins, além do fígado (STICOVA; JIRSA, 2013).

A bilirrubina possui uma estrutura com um ácido tetrapirrol dicarboxílico lipofílico. Tanto a bilirrubina, quanto seu precursor biliverdina, são formados em humanos saudáveis pelo catabolismo do heme, e outras proteínas heme, sendo eliminados da circulação pelo fígado (DEY; LIGHTNER, 2008). A biliverdina é um composto polar, excretado pelo fígado, sem mudanças na estrutura. Já a bilirrubina, é um composto apolar, precisando da glicuronidação, para assim poder ser transportada pela via trans-hepática (DEY; LIGHTNER, 2008). O metabolismo do precursor da bilirrubina, a biliverdina, acontece por meio de várias reações, com auxí lio do sistema heme-oxigenase como etapa de limitação na produção da bilirrubina (Figura 5). A indução da heme oxigenase acontece por substrato e fornece o mecanismo para se adaptar ao aumento da degradação do heme (GOLLAN; KNAPP, 1985).

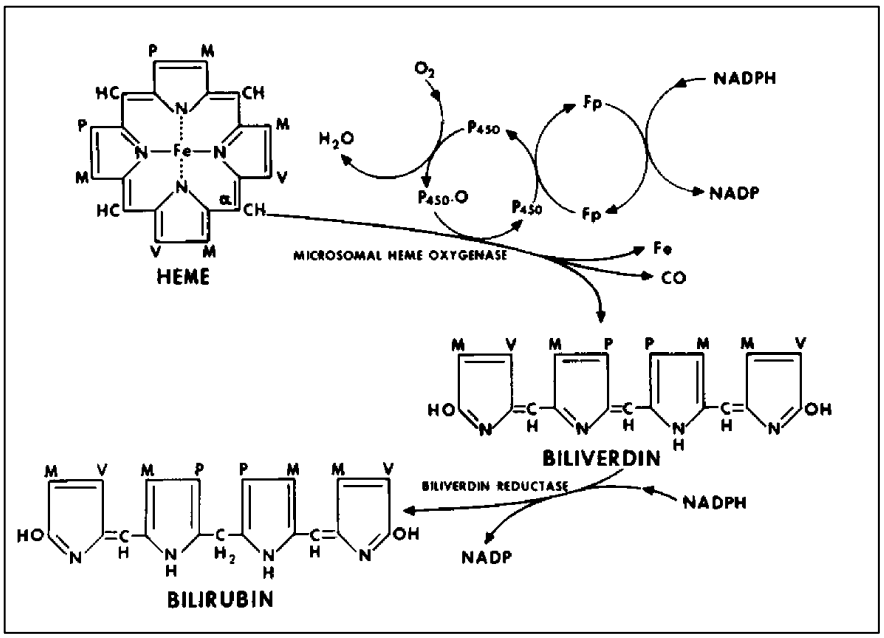
Figura 5. Transformação da Biliverdina em Bilirrubina. (Adaptado de DEY; LIGHTNER, 2008).



Normalmente, em adultos são produzidos entre 250 e 350 mg de bilirrubina por dia. Essa produção ocorre, principalmente, pela degradação da hemoglobina-heme (derivada dos glóbulos vermelhos senescentes) pelo sistema reticuloendotelial (principalmente baço e medula óssea). Isso equivale a aproximadamente 75% do metabolismo da bilirrubina, sendo que os outros 25% consistem na transformação hepática do heme em hemeproteínas, como por exemplo o citocromo P-450 e a catalase (GOLLAN; KNAPP, 1985; DEY; LIGHTNER, 2008).

A conversão do heme em bilirrubina acontece em pelo menos dois passos complexos, inciando pela clivagem do anel de ferroprotoporfirina na ponte α-meteno pela heme oxigenase, produzindo uma molécula de biliverdina, um CO e ferro (Figura 6). Para que a reação aconteça, a heme oxigenase precisa de cofatores, sendo eles o NADPH e o O_2. Esse sistema da heme oxigenase é mais ativo nos órgaos onde existe mais degradação do heme, principalmente o baço e o fígado (SCHMID, 1972). O grupamento heme é convertido em bilirrubina nesses locais. A produção de bilirrubina só será afetada caso o paciente esteja em estado hemolítico (aumentando) ou com ineficácia na eritropoese, diminuindo a produção de bilirrubina (DEY; LIGHTNER, 2008).

Figura 6. Degradação enzimática da bilirrubina pela enzima hemexigenase (Adaptado de SCHMID, 1972).



O fígado é muito importante no processo, pois nele está concentrada a maior parte de tecido com enzimas heme, sendo que as citocromo P450 são as mais importantes. Essas enzimas são caracterizadas como hemoproteínas ligadas à membrana, com função principal de desintoxicação de xenobióticos, metabolismo celular e homeostase. O termo CYP está relacionado com uma proteína que contém heme, além de ter uma absorção máxima de 450 nm, no estado reduzido, na presença de monóxido de carbono (MANIKANDAN; NAGINI, 2018).

No trato intestinal inferior, as bactérias ali presentes são responsáveis pela redução da bilirrubina conjugada a um grupo chamado cromogênio, também conhecido como urobilinogênio. Sabe-se que no homem, uma parte do urobilinogênio ainda é conjugado. A maior parte desse urobilinogênio formado no cólon, será eliminado pelas fezes e apenas uma pequena parte será absorvida para que seja mais tarde eliminado pela bile (SCHMID, 1972).Quando o urobilinogênio aparece em grandes quantidades na urina, pode indicar que tenha algum problema no fígado ou obstrução dos ductos biliares extra-hepáticos. Ao contrário do aumento do urobilinogênio na urina, quando acontece total obstrução dos ductos biliares, esse composto desaparece da urina, pois nenhuma quantidade de bilirrubina chega no intestino, sendo assim, não terá conversão em urobilinogênio (SCHMID, 1972).

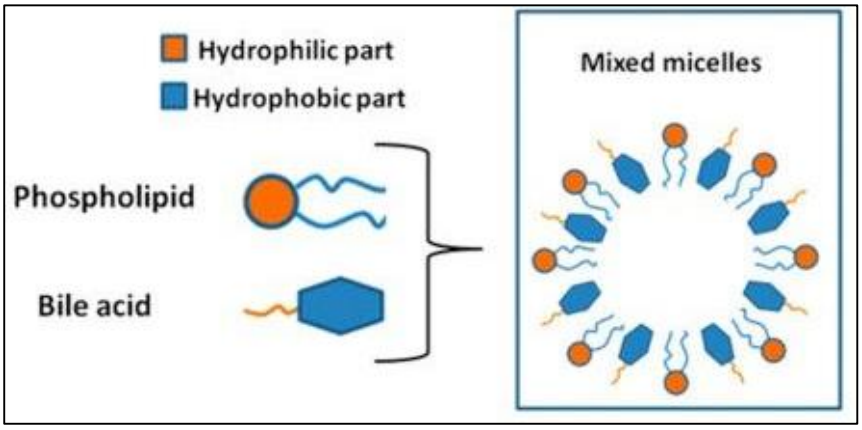
Existem outras rotas de eliminação da bilirrubina, porém elas são menos eficazes e serão utilizadas quando as vias normais não estiverem funcionando corretamente, como em casos de danos hepáticos, gerando a hiperbilirrubinemia com uma grande quantidade do pigmento não conjugado no plasma (DEY; LIGHTNER, 2008).

A hiperbilirrubinemia não conjugada pode ser causada por três anormalidades: comprometimento hepático, aumento da produção do pigmento e conjugação defeituosa da bilirrubina. As três anormalidades levam à hiperbilirrubinemia não conjugada no plasma, e isso acontece sem a presença de bilirrubinúria. O defeito na conjugação como causa principal geralmente é raro e hereditário. A hiperbilirrubinemia conjugada, associada à bilirrubinúria indica comprometimento da secreção de bile intra-hepática ou obstrução do fluxo de bile extra-hepática (SCHMID, 1972).

1.4 Metabolismo dos Ácidos Biliares

Os sais biliares (SB), nos quais podemos incluir os ácidos biliares (AB) e os alcoóis biliares, possuem anéis esteroides como estrutura comum. Os AB são caracterizados como moléculas anfipáticas (Figura 7) que apresentam um grupo hidroxila (hidrofílico) e grupos metil (hidrofóbicos), com polaridade e solubilidade dependendo da estrutura de cada ácido. Como exemplo, em baixas concentrações os ácidos conseguem ser dissolvidos em água, mas em maiores quantidades, eles formam agregados conhecidos como micelas. Essa agregação acontece, pois as faces hidrofóbicas dos ácidos ficarão juntas para repelir a água, enquanto as faces hidrofílicas ficam orientadas para dentro (MCGLONE; BLOOM, 2018).

Figura 7. Esquema que demonstra como são as moléculas anfipáticas dos ácidos biliares: parte hidrofóbica, em azul, e a parte hidrofílica, em laranja (Adaptado de BAIOCCI *et. al.*, 2019).



Tanto os AB, quanto o colesterol e os fosfolipídeos devem ter concentrações equilibradas entre si, caso contrário, o colesterol pode precipitar formando cálculos na vesícula, causando obstrução e transtorno digestivo. Acontece também má absorção lipídica pela falta de bile, acúmulo de ácidos biliares no lúmen intestinal e nenhum dos dois cumprindo seu papel de emulsificação das gorduras e formação de micelas (RIBEIRO, 2010).

Em humanos, os AB são produzidos pelo fígado, sendo excretados 200-600 mg diariamente. Além das funções no trato digestivo, os AB também atuam na excreção do colesterol, e atuam como emulsificantes (com auxílio da lipase pancreática) (MCDONALD *et. al.*, 2010). A secreção da bile no trato intestinal acontece com estímulo da colecistoquinina, sendo necessária tanto no periodo pós-prandial quanto no jejum (GUYTON; HALL, 2006).

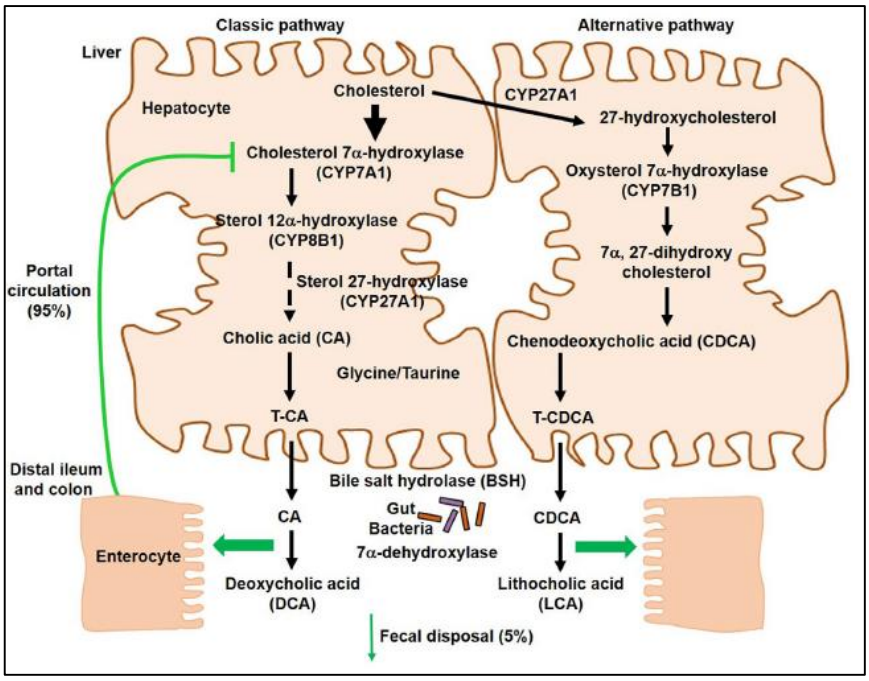
Os AB primários serão os produtos finais do catabolismo do colesterol e são considerados a maior mudança na porção maior do colesterol. Os AB geram fluxo de bile e secreção biliar de ácidos, fosfolipídios, colesterol, drogas e outros metabólitos tóxicos (CHIANG, 2013).

A conversão do colesterol em AB envolve 17 enzimas diferentes localizadas no citosol, retículo endoplasmático, mitocôndria e peroxidase. As enzimas catalisam a modificação do anel esteróide, além de clivar carbonos da cadeia lateral do colesterol, assim formando ácidos biliares. Para produzi-los, existem duas vias principais (Figura 8). A via clássica consiste na modificação do anel esteroide anteriormente à clivagem da cadeia lateral, enquanto na via ácida a clivagem acontece antes das modificações

no anel esteróide (CHIANG, 2013). Essa via é iniciada pela colesterol 7α-hidroxilase (CYP7A1), com função de limitação da produção dos AB, além da produção dos ácidos biliares primários: ácido cólico (CA) e ácido quenodesoxicólico (CDCA). Para a síntese de CA é necessária a enzima esterol microssomal 12α-hidroxilase (CYP8B1) e sem essa enzima, acontece a produção de CDCA (CHIANG, 2013).

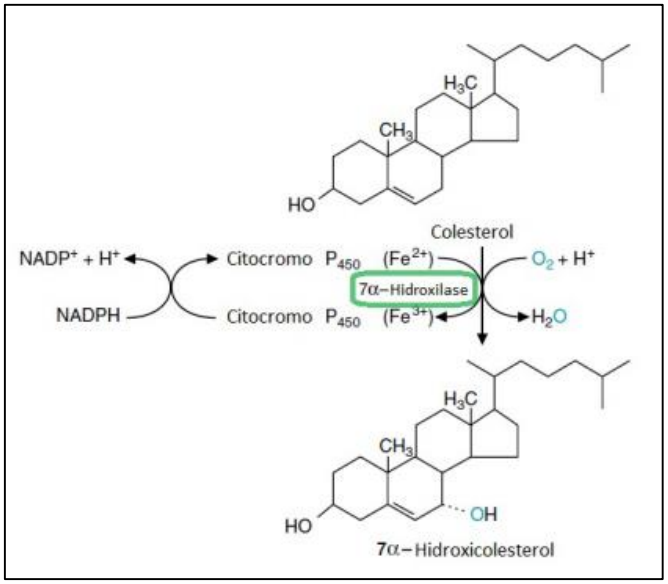
A via ácida, ou alternativa, é iniciada pelo esterol 27-hidroxilase (CYP27A1), uma enzima mitocondrial do citocromo P450, largamente distribuída pelos tecidos e macrófagos. Essa via contribui com aproximadamente 9% da síntese de AB pelos hepatócitos humanos, sendo importante para pacientes com doenças hepáticas e em neonatos (DUANE *et. al.*, 1999).

Figura 8. Vias de produção dos ácidos biliares (Adaptado de CHIANG *et. al.*, 2020).



Os sais biliares mistos, com fosfolipídios e colesterol, ficam armazenados na vesícula biliar, em seguida são secretados no intestino, onde facilitam a digestão e reabsorção de nutrientes. Por fim, eles são reabsorvidos no íleo, de onde serão transportados de volta para o fígado, pela circulação portal e ali eles inibem a produção de outros ácidos. Essa etapa limitante (Figura 9) acontece pela grande produção de ácidos biliares que, catalisada pela 7α-hidroxilase, inibe o grupo hidroxila na posição 7 do colesterol (LIEBERMAN; MARKS, 2013).

Figura 9. Etapa limitante da produção dos ácidos biliares. (Adaptado de LIEBERMAN; MARKS, 2013)



A ligação entre o fígado e a vesícula biliar se dá por pequenos canalículos, que se juntam formando ductos, que posteriormente formam o ducto hepático, levando a bile até a vesicula (SAMUELSON, 2007). A bile é formada principalmente por colesterol biliar, lecitina, bilirrubina e na maior parte, ácidos e sais biliares (GUYTON; HALL, 2006). Os AB possuem propriedades tanto de emulsificação, quanto de solubilização direta dos lipídios. Podem agir também como moléculas para sinalização de outros receptores, tendo diversos efeitos no metabolismo. Pode ser citado o receptor nuclear FXR e o receptor de membrana acoplado à proteína G TGR5, como os mais estudados atualmente (MCGLONE; BLOOM, 2018).

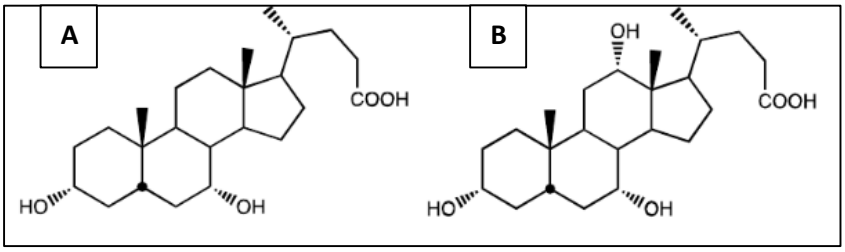
Existem diferentes capacidades dos AB de se ligar ou estimular receptores. Por existirem diversos AB circulantes, realizando um processo dinâmico da síntese, ciclagem e modificação pela resposta de fatores ambientais, existe uma modulação nas respostas estimuladas pelos AB (MCGLONE; BLOOM, 2018).

1.4.1 Classificação dos Ácidos Biliares

Os ácidos são divididos em: primários, secundários e compostos. Os primários são o ácido cólico (CA) e o ácido quenodesoxicólico (CDCA). As diferenças estruturais desses dois ácidos têm relação com as posições dos grupos α-hidroxil. No CA os

grupos α-hidroxil estão posicionados nas posições 3, 7 e 12, enquanto no CDCA eles aparecem nas posições 3 e 7 (Figura 10) (LIEBERMAN; MARKS, 2013).

Figura 10. Estrutura dos ácidos biliares primários: A – ácido quenodesoxicólico (CDCA); B – ácido cólico (CA). (Adaptado de FIAMONCINI, 2016)



As duas vias de produção dos AB podem ter intermediários metabólicos que sofrem modificações no fígado, como o oxysterol. Quando há presença da CYP8B1 (12α-hidroxilase), o oxysterol é convertido em ácido cólico (CA) e na ausência da CYP8B1, será convertido em ácido quenodesoxicólico (CDCA). Essa enzima tem como função a regulação da proporção dos AB primários e assim, controla a hidrofobicidade no pool de AB (MCGLONE; BLOOM, 2018.).

Os ácidos primários são sintetizados no fígado e, para serem excretados, são conjugados com taurina e glicina (Figura 11) e geralmente serão sintetizados pela via clássica. Essa conjugação dá origem aos AB compostos: ácido taurocólico, ácido taurodesoxicólico e ácido glicocólico (Figura 12). Como eles permanecem na forma ionizada no intestino, são denominados de sais biliares. Quanto mais aquosos, menor a absorção ativa no intestino e trato biliar (LIEBERMAN; MARKS, 2013).

Figura 11. Estrutura dos aminoácidos com os quais os ácidos biliares se conjugam. A – taurina; B – glicina. (Adaptado de FIAMONCINI, 2016)

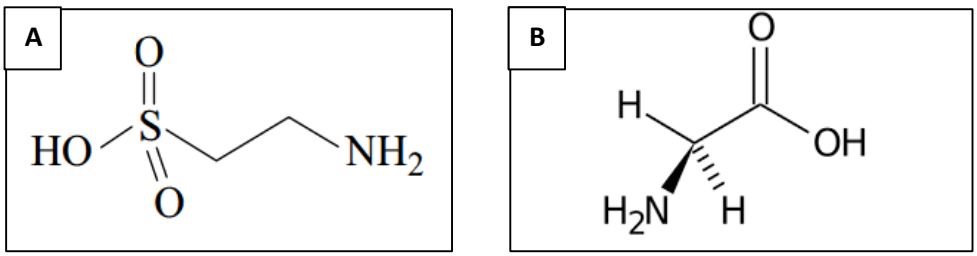
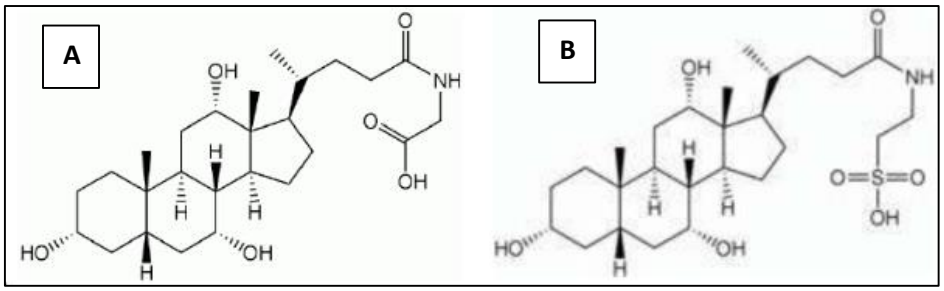


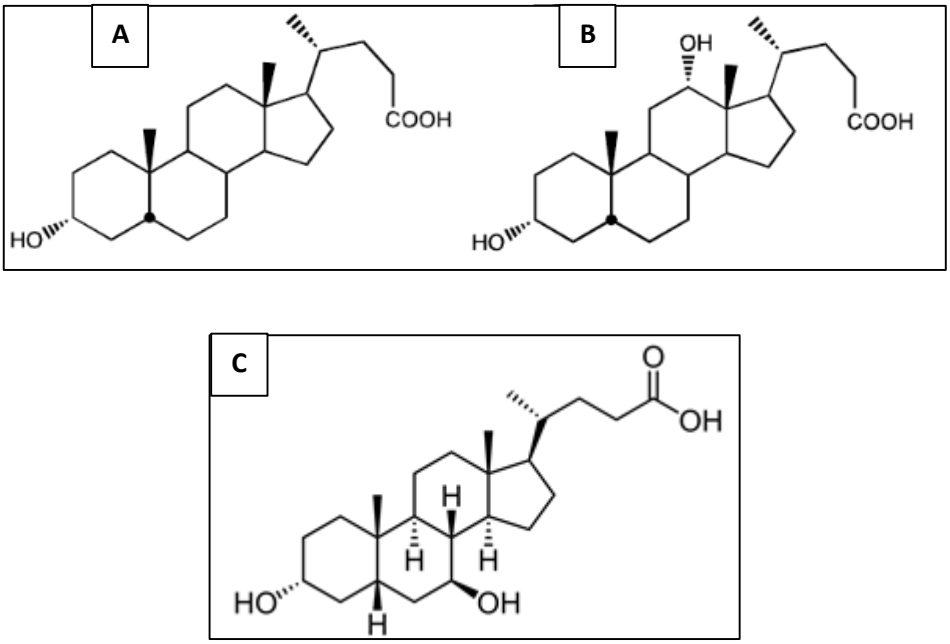
Figura 12. Estrutura dos ácidos biliares compostos (sais biliares): A – ácido glicocólico; B – ácido taurocólico (Adaptado de FIAMONCINI, 2016).



Depois da conjugação, os AB são então secretados na bile e armazenados na vesícula biliar, até serem liberados no duodeno. A glicina é preferivelmente usada nos humanos, para conjugação, e a taurina em roedores, também para conjugação e eliminação (FIAMONCINI, 2016).

Também podem ser citados os AB secundários, sintetizados a partir dos AB primários. Os principais são: ácido litocólico (LCA), o ácido desoxicólico (DCA) e o ácido ursodesoxicólico (UDCA). O ácido cólico tem origem do ácido quenodesoxicólico, enquanto o ácido desoxicólico tem origem no ácido cólico (Figura 13).

Figura 13. Estrutura dos ácidos biliares secundários: A – ácido litocólico; B – ácido desoxicólico; C – ácido ursodesoxicólico (Adaptado de FIAMONCINI, 2016).



1.4.2 Ácidos Biliares em Doenças

Foram identificados erros inatos no metabolismo (EIM) dos AB pela análise de metabólitos anormais em pacientes, e identificação de mutações ou enzimas deficientes do metabolismo dos ácidos. A diminuição da síntese pode ser causada pelo defeito de enzimas que fazem parte da via dos AB. Nesse caso, os erros inatos podem produzir metabólitos anormais, podendo conter tanto cadeias esteroides laterais ou ainda, estruturas de núcleos esteroidais (CHIANG, 2013). Os EIM podem causar doença hepática colestática na infância, progredindo para doença neurológica na adolescência ou na fase adulta e podem se apresentar com vários fenótipos, dependendo da enzima defeituosos. Os sinais clínicos incluem icterícia, hiperbilirrubinemia, células hepáticas gigantes, disfunções neurológicas, cálculos biliares de colesterol, doença cardíaca prematura, e doença hepática colestática, entre outros. No caso destas doenças, o tratamento pode ser feito pela reposição de AB, se diagnosticadas precocemente. Atualmente já foram descritas nove doenças relacionadas com os erros inatos na síntese dos AB (CHIANG, 2013).

A doença hepática colestática intra ou extrahepática pode acontecer pela interrupção do fluxo biliar (tumores, cálculos), levando à falta de bile no intestino e acúmulo tóxico dos AB e metabólitos no fígado e no sangue. Também podem ocorrer defeitos congênitos ou adquiridos no transporte dos AB, ocasionando icterícia, baixa absorção de vitaminas e consequente diminuição do crescimento, entre outras características. Os defeitos de fluxo também podem aparecer, causando colestase obstrutiva, ocasionando falta de AB no intestino (CHIANG, 2013).

Por fim, podemos citar o ácido ursodesoxicólico usado no tratamento de cirrose biliar primária, mostrando ativação das vias anti-inflamatórias das células hepáticas, melhorando sua função. Outro ácido que tem ação em doenças, é o ácido quenodesoxicólico, usado para diminuir o peso e melhorar tolerância à glicose (MCGLONE; BLOOM, 2018.).

1.5 Relação da Bilirrubina e Ácidos Biliares com a Lesão Renal

O mecanismo associado à lesão renal causada por bilirrubina parece ser maior que a lesão causada por distúrbios hemodinâmicos, que incluem vasodilatação sistêmica e esplâcnica. O insulto isquêmico causado pela hiperbilirrubinemia estimula

uma resposta inflamatória com aumento da expressão de moléculas de adesão que atraem os leucócitos. Restos intraluminais de células tubulares danificadas por isquemia prejudicam a reabsorção de sódio, que polimeriza as proteínas de Tamm-Horsfall formando uma substância gelatinosa (cilindro) que oclui o lúmen tubular, causando aumento da pressão de retorno e vazamento. A lesão endotelial afeta o tônus arteriolar aferente, ativa a cascata de coagulação e libera a endotelina, o que causa mais vasoconstrição intrarrenal, comprometendo a microcirculação. Um período de reperfusão danificada pode seguir, devido à depleção de ATP, a qual libera proteases com substâncias oxidativas que posteriormente danificam o citoesqueleto dos túbulos. Esta patogênese talvez explique a natureza não-responsiva desta condição, quando identificada tardiamente em seu curso clínico (POLONI *et. al.*, 2019; SLACK *et. al.*, 2010).

A fisiologia cirrótica indubitavelmente contribui para a injuria renal, mas uma alta concentração de ácidos biliares também contribui para a injúria tubular nas células que tenham sofrido isquemia renal. Os AB são reabsorvidos nas células tubulares (primariamente nas proximais) e células tubulares esfoliadas (inchadas e vacuolizadas, vistas na microscopia) e células tubulares com mitocôndrias distorcidas foram observadas em biópsia renal. Assim, a combinação de hipoperfusão renal, tubulotoxicidade direta dos ácidos biliares, e obstrução por cilindros de bile conduz à IRA e é descrita mais apropriadamente como “nefropatia de ácidos biliares ou nefropatia colêmica” (LECLERC *et. al.*, 2016; LUCIANO *et. al.*, 2014; RAFAT *et. al.*, 2013).

A bilirrubina e os AB que possuem baixa solubilidade em água, podendo chegar a causar “formação de gesso” em consequência ao pH baixo no microambiente dos néfrons distais. Desde 1953 são reportadas nefroses colêmicas ou biliares e estudos posteriores analisaram a lesão tubular em coelhos (WU et al, 2020). ELIAS *et. al.* (1987), observaram que células renais expostas à bilirrubina indireta (não conjugada) *in vitro*, sofreram efeito na estrutura mitocondrial, com declínio do ATP celular e perturbação das membranas plasmáticas, provocando alteração no volume celular e no conteúdo eletrolítico.

Desde o ano 2000 existem estudos avaliando a possível nefrotoxicidade dos AB e da bilirrubina. Porém, a bilirrubina por agir como antioxidante endógeno tem como função proteger o rim de danos, além de apresentar papel antiinflamatório e propriedades hipolipemiantes. STEVENS *et. al.* (2012) relataram que a

hiperbilirrubinemia pode ser considerada um fator de risco para a doença renal terminal, independente da taxa de filtração glomerular. De forma diferente, outro estudo já descreveu o papel protetor da hiperbilirrubinemia em funções renais (WU *et. al.*, 2020).

Apesar destes estudos, o papel da bilirrubina em alguns sistemas e tecidos permanece controverso, não existindo consenso sobre a ação tóxica ou protetora da bilirrubina sobre as células renais. Ainda, mesmo que a toxicidade ou a proteção sejam relatadas, o valor de corte para hiperbilirrubinemia permanece incerto, bem como o efeito da hiperbilirrbinemia na insuficiência renal. Em estudo recente é mostrado que a hiperbilirrubinemia (bilirrubina total >2.0 mg/dL, em pacientes com cirrose ou carcinoma) é um fator de risco independente para DRA induzida por contraste, diálise e para a mortalidade após tomografia computadorizada com contraste (WU *et. al.*, 2020).

Em estudo clinicopatológico de 44 pacientes com icterícia e análise histológica (41 autópsias e 3 biópsias renais) VAN SLAMBROUCK *et. al.* (2013) demonstraram que 24 pacientes apresentavam cilindros biliares envolvendo o néfron distal e em seis, com extensão para os túbulos proximais. A lesão tubular aguda foi observada em 77% dos casos no grupo nefropatia por bile, caracterizada por epitélio tubular com citoplasma diminuído ou perda de bordas em escova nas células tubulares proximais. Os autores concluíram que a nefropatia por cilindros biliares é uma entidade histológica comprovada, com mais da metade dos pacientes propensos à deposição de bile nos túbulos renais.

SHIMIZU *et. al.* (2013) observaram que, durante a progressão da insuficiência hepática aguda (IHA) e hiperbilirrubinemia, na rejeição do enxerto hepático, a insuficiência renal associada à IHA se desenvolveu gradualmente. Degeneração celular e presença de células apoptóticas eram aparentes dentre as células epiteliais tubulares renais (CETR), com acúmulo de pigmento biliar e degeneração mitocondrial. A DRA associada à IHA parece ser mediada por lesão das CETR, com acúmulo de pigmento biliar, comprometimento da microcirculação causada pela lesão de células endoteliais dos capilares peritubulares (CPT), com depleção da síntese do óxido nítrico endotelial e fatores angiogênicos, e pela inflamação renal. Múltiplos mecanismos, incluindo lesões tubulares e injúrias nos CPT, e inflamação renal, podem estar envolvidos no desenvolvimento de DRA associada à IHA.

1.6 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo (OS) decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante. A geração de espécies reativas de (ROS) e nitrogênio (RNS) (radicalares ou não) constitui um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Por exemplo, durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. A produção contínua de ROS e RNS durante os processos metabólicos culminou no desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante que têm o objetivo de limitar os níveis intracelulares de tais espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O OS surge pela geração de ROS/RNS ou pela degradação da capacidade antioxidante dos sistemas endógenos, que deveriam combater o ataque oxidativo em biomoléculas-alvo. Sua severidade pode aumentar de acordo com a ocorrência de doenças cardiovasculares, câncer, envelhecimento, entre outras (PISOSCHI, 2015).

Existem quatro grandes caminhos para a geração de ROS no organismo e todos se relacionam à gênese das doenças renais: a principal fonte geradora de ROS é a mitocôndria, na transferência de elétrons, durante o processo de fosforilação oxidativa, que tem como aceptor final de elétrons o oxigênio (O_2). Em face da redução univalente do O_2 são gerados os radicais superóxido (O_2•), hidroxila (OH•) e, ainda, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse processo se dá mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre (PISOSCHI, 2015).

Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases). Essas se referem a proteínas transmembrana que têm a função de transferir os elétrons através das membranas celulares. Geralmente, o aceptor de elétrons é o O_2 e, dessa forma, em decorrência desse processo, gera-se o radical O_2• (HALLIWEL; GUTTERIDGE, 1990). Na via do óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima catalisa a L-arginina para produzir o óxido nítrico (NO) e O_2^-, e transferindo elétrons para o O_2, que irá reagir com o NO e produzir o peroxinitrito ($ONOO^-$). Por último, a quarta via é a da xantina oxidase (OX) que também é uma produtora de ROS; nessa via a hipoxantina é oxidada em ácido úrico e xantina (SU *et. al.*, 2019).

Na doença renal aguda (DRA), várias vias de ROS são implicadas; na isquemia ou nefrotoxicidade induzida, a disfunção mitocondrial é a maior fonte de produção de ROS. Isso acontece antes que os níveis de creatinina sérica sejam alterados, considerado um evento inicial da DRA. Enquanto acontece esta variação na produção de ROS mitocondrial, a atividade de enzimas antioxidantes está diminuída. Na DRA mediada por sepse, além da disfunção mitocondrial, a NOS induzida vai ser altamente regulada (up-regulated), o que leva a maior produção do NO (SU *et. al.*, 2019).

São conhecidas diversas substâncias antioxidantes que podem proteger o tecido e as células renais do estresse oxidativo induzido por ROS ou por RNS, dentre as quais cita-se a enzima superóxido dismutase (SOD). Suas três isoformas são encontradas no rim e localizadas na mitocôndria, citoplasma ou espaço extracelular. A SOD2 (Mn-SOD) está principalmente na mitocôndria, enquanto a SOD1 (CuZn-SOD) está no citoplasma e a SOD3 (CuZn-SOD) no espaço extracelular. Em mamíferos, 80% da atividade de SOD se dá em razão da SOD1. A inibição da enzima SOD mostrou aumento renal de ROS, fazendo com que aconteça redução de fluxo sanguíneo, excreção de sódio e diminuição da filtração glomerular, podendo levar à hipertensão (RATLIFF *et. al.*, 2016).

A catalase, outra enzima importante nas defesas antioxidantes, é presente em células aeróbicas, com alta expressão renal e tem um papel importante na redução de ROS e na prevenção de peroxidação lipídica. Deficiência desta enzima leva ao acúmulo mitocondrial de ROS e consequente redução da sua função (RATLIFF *et. al.*, 2016). Os sistemas enzimáticos que envolvem as enzimas do ciclo redox da glutationa, particularmente a glutationa peroxidase, glutationa redutase e glicose-6-fosfato-desidrogenase, também atuam na neutralização de ROS (WELLS *et. al.*, 1997).

1.6.1 Principais Espécies Reativas

Existem dois grandes grupos de espécies reativas: de oxigênio e de nitrogênio. As primeiras (ROS) são caracterizadas por apresentarem, ou não, elétrons desemparelhados em sua última camada. As que apresentam elétrons desemarelhados são chamadas de radicais livres. Os principais exemplos são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-), oxigênio-singlete (1/2 O_2) e o radical hidroxila (OH•) (Figura 14). O estresse oxidativo e o comprometimento do equilíbrio

redox são as principais consequências de suas presenças. Quando em baixas quantidades, têm função de sinalização (como a regulação da proliferação celular, apoptose ou expressão de genes que geram os fatores de transcrição). Na geração de ROS por fagócitos, as espécies são utilizadas nos mecanismos de defesa contra bactérias ou fungos (PISOSCHI, 2015).

Figura 14. Reações que acontecem na geração das espécies reativas de oxigênio (ROS). (Adaptado de PISOSCHI, 2015).

$$O_2 + e^- + H^+ \rightarrow HO_2\cdot$$

$$HO_2\cdot \rightarrow H^+ + O_2^{\bullet -}$$

$$O_2^{\bullet -} + 2H^+ + e^- \rightarrow H_2O_2$$

$$H_2O_2 + e^- \rightarrow HO^- + HO\cdot$$

O ânion superóxido (O_2^-) é formado a partir da doação de elétrons de algumas moléculas, para o oxigênio. As enzimas SOD catalisam a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2, em níveis importantes para processos fisiológicos. A maior função biológica do superóxido é a eliminação do NO (RATLIFF *et. al.*, 2016).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é gerado da dismutação do O2• pela SOD, além da atividade de algumas oxidases, com liberação mitocondrial. Constitui fator importante na regulação de mecanismos de sinalização, e possui propriedades de difusão e transporte, tornando essa espécie uma molécula de sinalização versátil entre as células e os compartimentos. Além disso, o metabolismo do peróxido a partir da heme peroxidase específica, na presença do nitrato ou cloreto, pode formar nitrogênio dióxido ou ácido hipocloroso, na mesma ordem (RATLIFF *et. al.*, 2016).

As RNS são produzidas quando o O_2 reage com óxido nítrico (NO) gerando o peroxinitrito ($ONOO^-$). A partir disso, é possível que sejam formados outros tipos de espécies, como dióxido de nitrogênio (NO_2) e nitrosoperoxicarbonato ($ONOOCOO^-$) (PISOSCHI, 2015).

O óxido nítrico (NO) é produzido pelas enzimas NOS, em quantidades que garantem que ele seja usado para processos fisiológicos, como mecanismos de sinalização, produzidas principalmente como resultado da regulação da atividade das

NOS1 e NOS3. E em processos inflamatórios, acontece a indução da expressão da NOS2 e a produção de NO em uma maior escala. A principal função do NO é o controle de respiração mitocondrial e produção de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina). Isso acontece porque o NO se liga à guanilato ciclase solúvel e ao citocromo C oxidase. Também tem papel importante quando sua quantidade aumenta e compete com as enzimas SOD, sendo que essa reação gera peroxinitrito (RATLIFF *et. al.*, 2016).

1.6.2 Principais Funções de Sistemas Antioxidantes

Existem diversos tipos de antioxidantes, podendo ser citadas as vitaminas antioxidantes, como tocoferol, tocotrienol e ascorbato, e também os antioxidantes diretos, como os ubiquinóis e o GSH. Além deles, outros nutrientes auxiliam nesses sistemas antioxidantes tais como: Se, Fe, Cu, Zn, vitaminas B, riboflavinas, entre outros. Existem, também, os compostos que afetam diretamente o estresse e o metabolismo oxidativo como os carotenóides, compostos por luteínas e licopeno, os flavonoides, os flavonois, os flavanois, etc. É muito difícil que seja feita apenas uma definição para cada componente, em função da variabilidade de dose de exposição, pelas interações com outras moléculas e pelas diversas vias metabólicas (DENNIS, 2019).

Os maiores metabólitos de antioxidantes conhecidos, são compostos-chave que podem interagir diretamente com as ROS, sendo os mais importantes os tocoferóis e os carotenóides. Enquanto os tilacóides recolhem pouco os oxigênio-singlete, os carotenoides são mais importantes para que não haja acúmulo desse composto. Adicionalmente, eles também podem se ligar as essas ROS para produzir outros metabólitos que podem ser usados no processo de sinalização (NOCTOR, 2016).

Os antioxidantes mais presentes em fase solúvel são o ascorbato e a glutationa, porque esses compostos são capazes de eliminar as ROS quimicamente, sendo também cofatores para enzimas antioxidantes que atuam no processamento de peróxidos. O ascorbato, além de agir como redutor, também atua como cofator redutor da APX (peroxidase de ascorbato), enquanto a glutationa vai ser o substrato de peroxidases, contribuindo para o processamento das ROS. A glutationa também está envolvida na regeneração do ascorbato, obtido a partir da DHA

(desidroascorbato), tanto na parte química, quanto catalisando a reação das DHA. Esses dois compostos também já foram descritos como marcadores do estado redox da célula, através de estudos medindo a forma oxidada e a forma reduzida deles (NOCTOR, 2016).

1.6.3 Bilirrubina e o Estresse Oxidativo

A bilirrubina é o produto final do catabolismo do grupamento heme, possuindo propriedades citoprotetoras e citotóxicas (KAPITULNIK, 2004). Esse pigmento circula no sangue ligado à albumina (bilirrubina não-conjugada ou BNC) com somente uma mínima fração livre (bilirrubina livre), a qual determina as propriedades fisiopatológicas da bilirrubina (OSTROW *et. al.*, 2003).

Quando a concentração plasmática está elevada, a bilirrubina livre difunde-se livremente pelas membranas celulares. O sítio mais vulnerável à toxicidade da BNC é o Sistema Nervoso Central, no qual a bilirrubina produz um amplo espectro de deficiências neurológicas, conhecidas como encefalopatia bilirrubínica ou *Kernicterus* (SHAPIRO et al, 2006), porém o mecanismo molecular pelo qual a bilirrubina livre induz à injúria celular não está completamente esclarecido e permanece desconhecido o porquê somente certos tipos de células (por exemplo: células de Purkinje) são mais suscetíveis à toxicidade da BNC, quando comparado a outras células (CONLEE; SHAPIRO, 1997).

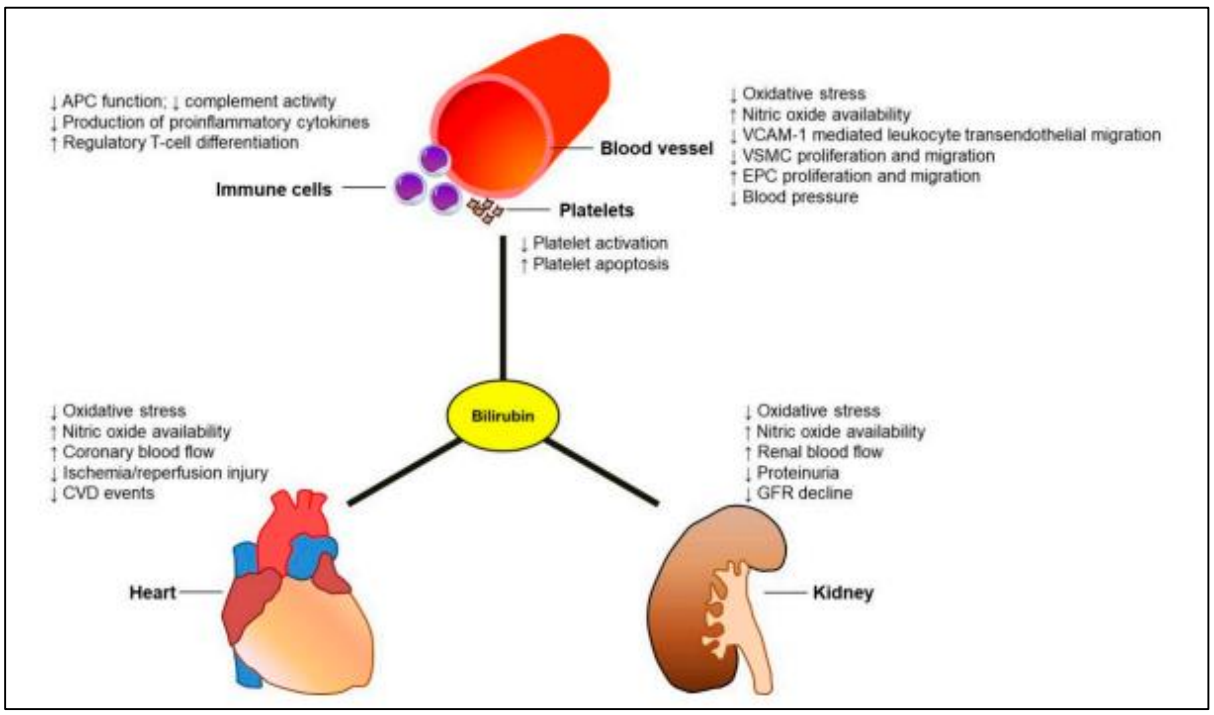
O estresse oxidativo (EO) tem sido implicado na progressão de muitas doenças, e evidências sugerem que o EO é uma marca da toxicidade induzida pela bilirrubina. As EROS (principalmente na forma de radical superóxido e peróxido de hidrogênio) têm um importante papel na iniciação e progressão de doenças cardiovasculares e renais (ITOH, 2004), especialmente no processo de injúria tubular renal (MOINOVA; MULCAHY, 1988). Os achados da literatura são muito controversos a respeito do papel da bilirrubina no desenvolvimento da injúria renal (ROMANO; VIEIRA JUNIOR, 2015). Estudos sugerem que a bilirrubina pode ser um agente endógeno com atividade citoprotetora contra injúria causada pelo EO (FUJII *et. al.*, 2010; MAZZA *et. al.*, 2003), porém não há estudos comparando os efeitos da bilirrubina em diferentes concentrações (normais e anormalmente elevadas).

É conhecido que o EO gera diferentes danos graves em macromoléculas, especialmente no DNA. RAWAT *et. al.* (2018) mostrou que o dano ao DNA no SNC

foi desencadeado pela hiperbilirrubinemia no periodo neonatal e que isso acontece na ativação dos mecanismos que reparam o DNA. Ele estudou modelos de estudos em ratos com hiperbilirrubinemia neonatal, demonstrando o dano tóxico ao DNA ocorrendo *in vivo* principalmente no cerebelo. Além disso, foram estudados os mecanismos associados à toxicidade da bilirrubina no DNA, dessa vez em modelos *in vitro*. Os resultados mostraram que houve aumento significativo do dano ao DNA, quando comparando células neuronais e não neuronais, tratadas com bilirrubina. Por outro lado, a bilirrubina também ativou as principais vias de reparo do DNA, por recombinação homóloga ou união não-homóloga, se mostrando como resposta adaptativa para reparar os danos no DNA, induzidos pela própria bilirrubina.

DANI *et. al.* (2019) mostraram que recém-nascidos podem apresentar resultados contraditórios em relação ao papel da bilirrubina sobre o estresse oxidativo, e TSAI; TANG (2019) realizaram uma revisão descrevendo as características fisológicas da bilirrubina, como ela interfere no curso clínico e também nos resultados da doença renal e seu efeito sobre eventos cardiovasculares atuando como antioxidante, imunomoduladora, antiinflamatória, antitrombótica (Figura 15).

Figura 15. Efeitos cardiovasculares e renais da bilirrubina (Adaptado de RAWAT *et. al.*, 2018).



A bilirrubina inibe a toxicidade da NADPH oxidase, além de suprimir a geração de SOD nas células endoteliais vasculares e nas células tubulares renais, também induzindo o EO e aumentando os níveis de óxido nítrico, com intuito de manter a homeostase cardiovascular (Figura 16) (RAWAT *et. al.*, 2018).

O estudo de OH *et. al.* (2013) mostrou que, em ratos, a BNC administrada intraperitonealmente (exógena) protegeu contra a nefropatia (injúria tubular) induzida por ciclosporina, via inibição do EO e reduzindo a apoptose que, em células tubulares renais causa dilatação e atrofia tubulara , em casos de injúria renal (BÖTTINGER; BITZER, 2002). FUJII *et. al.* (2010) demonstraram o efeito protetor da bilirrubina em danos renais, quando estudada na nefropatia diabética em ratos Gunn (ratos hiperbilirrubinêmicos deficientes de UGT1A1).

Mesmo que a bilirrubina possua baixa concentração intracelular, a sua atividade antioxidante pode ser amplificada em função do ciclo redox bilirrubina-biliverdina, que consegue regenerar a bilirrubina através da biliverdina redutase (RAWAT *et. al.*, 2018)

1.6.4 Ácidos Biliares e o Estresse Oxidativo

Ácidos biliares e seu receptor nuclear (receptor farnesoide X) são encontrados em muitos tecidos, incluindo o rim. A ativação deste receptor diminui a quantidade de ácido desoxicólico e atenua a calcificação vascular observada na doença renal crônica (MIYAZAKI *et. al.*, 2013).

Os AB podem induzir a apoptose em colonócitos por meio de diferentes mecanismos. Em contraste aos hepatócitos, a via apoptótica extrínseca parece ter baixa relevância em relação à citotoxicidade do AB no cólon. Alguns AB, como o UDCA (ácido ursodeoxicólico) ou baixas concentrações de AB hidrofóbicos, podem proteger as células do cólon contra a apoptose induzida por altas concentrações de AB citotóxicos, sugerindo um comportamento duplo desses agentes (como moléculas pró-sobrevivência ou pró-morte celular) (BARRASA *et. al.*, 2013). Ácidos biliares tóxicos podem ativar diretamente os receptores de morte de hepatócitos, e induzir dano oxidativo, causando disfunção mitocondrial e induzindo estresse do retículo endoplasmático. Quando esses compostos são absorvidos e se acumulam dentro das células biliares, eles também podem causar apoptose (PEREZ; BRIZ, 2009).

Existem indícios de que os AB podem estar ligados ao diagnóstico de câncer e que essa situação pode levar a estresse oxidativo, dano no DNA e instabilidade no genoma, apoptose, ativação de receptores nucleares, entre outras consequências. Apesar destas características poderem ser influenciadas por outros fatores, estudos sugerem que os AB podem agir como benéfico agente anticâncer, enquanto também podem estar envolvidos com toxicidade, apoptose, processos oxidativos, entre outros (DI CIAULA *et. al.*, 2017).

O ácido tauroursodesoxicólico (TUDCA) mostrou pontencial terapêutico benéfico em diversos modelos de estudo em diferentes doenças, como a diabetes, obesidade e algumas doenças degenerativas, devido a um efeito crioprotetor. Além desse efeito, o TUDCA mostrou que reduz o estresse oxidativo, diminui a apoptose e a inflamação, tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo*. Outros estudos (SONG *et. al.*, 2011; PEREZ; BRIZ, 2009) mostraram que o TUDCA também possui um papel como modulador epigenético, atuando como agente terapêutico em alguns tipos de câncer. Porém, mesmo que ele mostre esses efeitos positivos, é preciso restringir seu uso nos pacientes.

Como os AB têm propriedades tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas, estes compostos podem ter ações diferentes em decorrência de suas diferenças estruturais. Por exemplo, AB mais hidrofílicos podem ser menos tóxicos e nas células hepáticas e gastrointestinais podem agir com um papel protetivo. Já os AB mais hidrofóbicos se mostram mais citotóxicos, podendo gerar EO e dano no DNA, esses dois sendo considerados como fatores de pré-disposição para câncer. Nesta situação, podemos citar como principal consequência o aumento de produção intracelular de ROS e RNS, além da alteração dos genes de supressão tumoral (DI CIAULA *et. al.*, 2017)

Os ABs quenodesoxicólico e desoxicólico (primário e secundário, respectivamente) conseguem se solubilizar na membrana das células, produzindo imunossupressão e danos teciduais. O estudo de Song *et. al.* (2011) que administrou AB diferentes em células hepáticas de ratos mostrou a seguinte ordem de toxicidade: UDCA<CA<CDCA<DCA<LCA. Ou seja, AB primários se mostraram menos citotóxicos do que os secundários, com exceção do ácido ursodesoxicólico (UDCA) que mesmo sendo classificado como secundário, apresentou menor citotoxicidade em células hepáticas.

1.7 Tipos de Morte Celular

Diversos compostos podem induzir algum tipo de morte celular nas células. Essa morte celular pode ser induzida de diversas maneiras e por diversos mecanismos. É importante que se saiba qual o tipo de morte celular que o composto induz na célula, a fim de entender os mecanismos de dano deste composto.

Entre os tipos de morte celular podemos citar a necrose e a apoptose. O termo apoptose foi utilizado pela primeira vez em 1972, descrevendo um tipo de morte celular morfologicamente diferente (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972). Nesse tipo de morte, a célula é caracterizada pelo encolhimento e condensação da cromatina (KERR *et. al.*, 2002). Ela é denominada de morte celular acompanhada pela ativação de protease de caspase (GALLUZZI *et. al.*, 2012).

Já a necrose, que pode ser considerada um tipo de morte celular por processo tóxico, a célula é considerada uma “vítima” e se refere ao processo degradente que acontece após a morte celular. É caracterizada pelo inchaço da célula e ruptura da membrana plasmática, levando também a perda de organelas e condensação da cromatina (GREEN *et. al.*, 2015). Os mecanismos dos dois tipos de morte diferem, além da morfologia, podendo acontecer uma sobreposição nos processos de morte celular por necrose ou apoptose. Por exemplo, a diminuição da disponibilidade de caspases e ATP intracelular (LEIST *et. al.*, 1997; DENECKERS *et. al.*, 2001), podem ser dois fatores que levam uma célula em apoptose ao processo de necrose (ELMORE *et. al.*, 2007).

Para a célula morrer, tanto por necrose, como por apoptose, vai depender do tipo de sinalização, do tipo de tecido, do estágio de desenvolvimento desse tecido e até do meio fisiológico (FIERS *et. al.*, 1999; ZEISS, 2003). Para a morte por apoptose, existem duas vias de sinalização: a mitocondrial (intrínseca) e por receptor de morte (extrínxica). A necrose geralmente ocorre como consequência de dano celular irreversível, porém pode ser citado pelo menos uma via de sinalização de necrose. Essa sinalização pode acontecer pela ativação do receptor que interage com a proteínaquinase 3. Para a morte por receptor de morte, exise a clássica ligação de receptor na superfície da célula. (GREEN *et. al.*, 2015).

1.8 Células renais e a Cisplatina

A cisplatina é um composto metálico, com geometria plana quadrada, apresentando cor branca ou amarela em temperatura ambiente, temperatura na qual fica estável. É um pó pouco solúvel em água, mas solúvel em dimetil-primanida e dimetil formamida (DASARI *et. al.*, 2014). É um fármaco usado amplamente contra tumores sólidos, de diversos órgãos, como cabeça e pescoço, testículo, cérvice e ovários, dentre outros. Apesar do amplo uso, foram encontradas evidências de que os efeitos adversos do uso da cisplatina incluem nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade (CAO *et. al.*, 2018).

O mecanismo de ação a cisplatina é mediado pelo transportador de cobre CTR1 e quando a cisplatina entra em contato com as células, dispara rapidamente a degradação deste transportador, causando assim a resistência ao medicamento, como já foi mostrado em estudos que o silenciamento genético da CTR1 causa resistência à cisplatina *in vivo*. Células que apresentam aumento da presença do CTR1, na maioria dos casos apresentam sensibilidade à cisplatina (DASARI *et. al.*, 2014).

A cisplatina é ativada no momento que entra na célula, levando ao deslocamento imediato das moléculas de cloro da cisplatina, por moléculas de água, no citoplasma da célula. Esse deslocamento gera um produto hidrolisado, que é um potente agente eletrofílico que pode reagir com qualquer nucleófilo. A cisplatina consegue se ligar no centro N7 dos resíduos de purina e assim, causa danos ao DNA das células cancerígenas, impedindo a divisão e levando a célula cancerígena à morte (DASARI *et. al.*, 2014).

O rim tem o importante papel de filtrar o sangue, absorver minerais, produzir hormônios e também tem a função de manter a hemostasia corporal da água e do sódio (DU *et. al.*, 2017). Neste órgão, ela se acumula especialmente nos túbulos proximais, em maior quantidade do que em qualquer outro tecido do corpo (ZUCCO *et. al.*, 2004). A fisiopatologia do dano renal causado pela cisplatina pode ser explicada por alguns processos: dano aos túbulos renais proximais, estresse oxidativo, inflamação e dano vascular renal, podendo causar danos no DNA e interferir em sua replicação, em função da grande habilidade de ligação da cisplatina ao DNA.

Esses danos podem causar apoptose, autofagia disfuncional e regulação anormal das proteínas do ciclo celular, entre outros. A necrose também está presente

na toxicidade induzida pela cisplatina. A quantidade de cisplatina vai indicar o tipo de morte celular: >800 μmol/L está associada à necrose e <800 μmol/L conduz à apoptose das células (PARK *et. al.*, 2002). A nefrotoxicidade induzida por cisplatina pode ser caracterizada pela grande morte de células do túbulo proximal, tanto por necrose quanto por apoptose, ocasionando insuficiência renal (RAMESH; REEVES, 2003). O aumento em parâmetros de EO também mostrou ser um sinal de toxicidade da cisplatina (MILLER *et. al.*, 2010).

2 JUSTIFICATIVA

A Insuficiência renal aguda (IRA) secundária à doença hepática severa ocasiona aumento na morbidade e na mortalidade, e é uma condição clínica que pode progredir para necrose tubular aguda (NTA) ou síndrome hepatorrenal (SHR). A síndrome hepatorrenal (SHR) é uma complicação que acontece geralmente em pacientes que têm cirrose hepática e a disfunção renal é um acontecimento comum nos pacientes com doença hepática avançada. Estima-se que cerca de 20-25% dos pacientes em estágio final da doença hepática terão algum tipo de disfunção renal durante o curso da doença. O espectro da doença renal pode variar desde IRA, como azotemia pré-renal ou NTA, até a doença renal crônica e permanente. A diferenciação entre SHR e NTA permanece difícil de ser realizada, sendo a biópsia (contra indicada nesses pacientes em função do comprometimento no processo de coagulação sanguínea) o padrão-ouro.

Por ser de causa multifatorial, o tratamento da disfunção renal fica mais complicado e limitado, pois geralmente os pacientes têm o diagnóstico de disfunção renal sem uma doença renal intrínseca, e são considerados como tendo síndrome hepatorrenal (SHR), com dano renal agudo. As terapias e o prognóstico para IRA pré-renal e NTA, um tipo de IRA, diferem substancialmente. Entretanto, a diferenciação clínica precoce e a correta identificação são importantes.

O mecanismo da injúria renal a partir de severa hiperbilirrubinemia parece ser mais do que um distúrbio hemodinâmico, tais como vasodilatação sistêmica e esplâncnica. O insulto isquêmico estimula uma resposta inflamatória com aumento da expressão de moléculas de adesão e debris renais intraluminais, formando cilindros no interior dos túbulos renais. Os cilindros podem obstruir o lúmen tubular, ocasionando elevação da pressão retrógrada no interior do rim. A injúria endotelial afeta os tônus da arteríola aferente, ativa a cascata de coagulação e libera endotelina, a qual causa vasoconstrição intra-renal, assim comprometendo a microcirculação.

Em estudo recente de nosso grupo (Poloni *et. al.*, 2019) observamos que o sedimento urinário hiperpigmentado de amarelo (hiperbilirrubinúria) revelou um perfil particular consistindo de cilindros granulares, cilindros contendo células epiteliais tubulares renais (CETR) e CETR livres, que foi associado a uma elevação na concentração de bilirrubina urinária. Adicionalmente, cilindros hialinos, indicativos de hipoperfusão renal sem injúria renal (função renal preservada) foram observados no

grupo contendo baixa concentração urinária de bilirrubina. Isto sugere que em condições de hiperbilirrubinemia/hiperbilirrubinúria houve dano renal estrutural causado por toxicidade associada à bilirrubina e/ou ácidos biliares (isquemia, toxicidade direta, formação de cilindros biliares).

A fisiopatologia cirrótica contribui para a injúria renal, mas uma alta concentração de ácidos biliares filtrados também pode contribuir para a injúria tubular, provavelmente em células renais que tenham sofrido isquemia. Ácidos biliares são reabsorvidos pelas células tubulares (primariamente as proximais) e provavelmente podem prejudicar a função e estrutura celular. Isso é evidenciado pela presença de células tubulares esfoliadas observadas na análise microscópica urinária e também células tubulares com mitocôndrias distorcidas, observadas na biópsia renal. Resumidamente, a combinação de hipoperfusão renal, tubulotoxicidade direta dos ABs e a obstrução por cilindros biliares conduzem à doença renal aguda. Esta entidade patológica é denominada mais apropriadamente como “nefropatia biliar ou nefropatia colêmica”. No estudo do nosso grupo (Poloni *et. al.*, 2019) os cristais intracelulares foram observados, porém não foi possível determinar a composição química dos mesmos.

Os danos renais podem estar relacionados à elevação na concentração de bilirrubinas na urina e no plasma, e/ou à presença de AB. Porém, há divergências na literatura sobre um possível efeito protetor ou citotóxico da bilirrubina em diferentes tipos celulares e utilizando diferentes modelos experimentais. Os mecanismos associados a estes possíveis efeitos citotóxicos ou citoprotetores, ainda não são completamente estabelecidos, especialmente em células renais. Assim, nesse estudo avaliamos a toxicidade da bilirrubina e de AB primários e secundários, e os seus compostos, em linhagem celular renal HEK293T (células embrionárias renais).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os possíveis efeitos citotóxicos, o potencial antioxidante/oxidante e o tipo de morte celular associados aos efeitos da bilirrubina e dos AB em cultura de células HEK293T (células embrionárias renais).

3.2 Específicos

i. Avaliar a viabilidade das células HEK293T após o tratamento com bilirrubina ou AB;
ii. Avaliar o potencial antioxidante (oxidação do superóxido e mitocôndrias ativas) da bilirrubina e dos AB em cultura de células HEK293T;
iii. Determinar o tipo de morte celular em células HEK293T expostas a bilirrubina ou AB;
iv. Quantificar os compostos nas células HEK293T tratadas com AB ou bilirrubina;
v. Avaliar o efeito protetor dos AB e da bilirrubina sobre os efeitos nefrotóxicos da cisplatina.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL *et. al*. Evaluation of abnormal liver function tests. **Postgrad Med J**. v.92, p.223-34, 2016.

ALSAAD; WADEI. Fractional excretion of sodium in hepatorenal syndrome: Clinical and pathological correlation. **World J Hepatol**. v.8, p.1497-1501, 2016.

AMIN *et. al*. Epidemiology, Pathophysiology, and Management of Hepatorenal Syndrome. **Semin Nephrol**. v.39, p.17-30, 2019.

BAGSHAW *et. al.* Urinary biochemistry and microscopy in septic acute renal failure: a systematic review. **Am J Kidney Dis**. v.48, p.695-705, 2006.

BARRASA *et. al.* Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. **Toxicol In Vitro**. v.27(2), p.964-77, 2013.

BERTOCCHIO *et. al.* Mineralocorticoid receptor activation and blockade: an emerging paradigm in chronic kidney disease. **Kidney Int**. v.79, p.1051-1060, 2011.

BETJES; BAJEMA. The pathology of jaundicerelated renal insufficiency: cholemic nephrosis revisited. **J Nephrol**. v.19, p.229-233, 2006.

BOCK. Pathophysiology of acute renal failure in septic shock: From prerenal to renal failure. **Kidney Int Suppl**. v.64, p;15–18, 1998.

BÖTTINGER; BITZER. TGF-beta signaling in renal disease. **J Am Soc Nephrol**. v.13(10), p.2600-10, 2002.

BUL *et. al.* Renal function studies in acute tubular necrosis. **Clin Sci**. v.9, p.379-404, 1950.

CAO *et. al.* Renal protective effect of polysulfide in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Redox Biol**. v.15, p.513-521, 2018.

CÁRDENAS; ARROYO. Mechanisms of water and sodium retention in cirrhosis and the pathogenesis of ascites. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**. v.17, p.607-622, 2003.

CHAWLA *et. al.* Urinary sediment cast scoring index for acute kidney injury: a pilot study. **Nephron Clin Pract**. v.110(3), p.145-150, 2008.

CHIANG. Bile Acid Metabolism and Signaling. **Compr Physiol**. v.3, p.1191-1212, 2013.

CHIANG *et. al*. Bile Acid Biology, Pathophysiology and Therapeutics. **Clinical Liver Disease**. v.15, p.91-94, 2020.

CHOWDHURY *et. al*. Conjugation and Excretion of Bilirubin. **Semin Liver Dis**. v.3, p.11-23, 1983.

CLAURE-DEL GRANADO *et. al*. Urine microscopy in acute kidney injury: time for a change. **Am J Kidney Dis**. v.57, p.657-660, 2011.

CONLEE; SHAPIRO. Development of cerebellar hypoplasia in jaundiced Gunn rats: a quantitative light microscopic analysis. **Acta Neuropathol**. v.93(5), p.450-60, 1997.

DAMERON. Hepatorenal Syndrome: Progressive Renal Failure in Patients With Cirrhosis. **JAAPA**. v.24, p.30-3, 2011.

DANI *et. al*. Bilirubin and oxidative stress in term and preterm infants. **Free Radic Res**. v.53, p.2-7, 2019.

DASARI *et. al*. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**. v.740, p.364-78, 2014.

DENECKER *et. al*. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. **Cell Mol Life Sci**. v.58, p.356–370, 2001.

DENNIS *et. al.* Redox Systems Biology of Nutrition and Oxidative Stress. **J Nutr**. v.149, p.553-65, 2019.

DEY; LIGHTNER. Toward an Amphiphilic Bilirubin: The Crystal Structure of a Bilirubin E-Isomer. **J Org Chem**. v.73, p.270414, 2008.

DI CIAULA *et. al*. Bile Acids and Cancer: Direct and Environmental-Dependent Effects. **Ann Hepatol**. v.16, p.87-105, 2017.

DU *et. al*. MiR-30c regulates cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells by targeting Bnip3L and Hspa5. **Cell Death Dis**. v.8, p.2987, 2017.

DUANE *et. al*. 27-hydroxycholesterol. Production rates in normal human subjects. **J Lipid Res**. v.40, p.1194–1199, 1999.

ELIAHOU; BATA. The diagnosis of acute renal failure. **Nephron.** v.2, p.287–295, 1965.

ELÍAS *et. al*. Possible mechanism of unconjugated bilirubin toxicity on renal tissue. Comp Biochem Physiol A Comp Physiol. v.87(4), p.1003-7, 1987.

ELMORE. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol**. v.35, p.495-516.

ELSOM. Renal function in obstructive jaundice. Arch Intern Med (Chic). v.60, p.1028-1033, 1937.

ESSON; SCHRIER. Diagnosis and treatment of acute tubular necrosis. **Ann Intern Med**. v.137, p.744-752, 2002.

FERREIRA; MATSUBARA. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **RAMB**. v.43, p.61-8, 1997.

FIAMONCINI *et. al*. Metabolism of bile acids in the post-prandial state. **Essays Biochem**. v.60, p.409-418, 2016.

FIERS *et. al*. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. Oncogene. v.18, p.7719–7730, 1999.

FOGAZZI. The Urinary Sediment. **Elsevier**. v.3, 2010.

FUJII *et. al*.Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD(P)H oxidase. **Kidney Int**. v.78(9), p.905-19, 2010.

GALLUZZI *et. al*. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**. v.14, p.1237–1243, 2007.

GINÈS *et. al*. Liver disease and the kidney. **Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins**. v.8, p.2179-205, 2007.

GINÈS; SCHRIER. Renal Failure in Cirrhosis. **N Engl J Med**. v.361, p.1279-1290, 2009.

GOLLAN; KNAPP. Bilirubin Metabolism and Congenital Jaundice. **Hosp Pract (Off Ed)**. v.20, p.83-87, 1985.

GREEN et.al. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. v.7, p.12, 2015.

GUYTON; HALL. Funções secretoras do tubo alimentar. **GUYTON, A. C.; HALL, J. E.** Tratado de fisiologia médica. 11 ed. Elsevier. p. 617-631, 2006.

HALLIWELL; GUTTERIDGE. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.** v.186, p.1-85,1990.

HAESSLER *et. al*. The renal elimination of bilirubin. **J Exp Med**. v.35, p.533-552, 1922.

ISRAELSEN *et. al*. Acute Kidney Injury and Hepatorenal Syndrome in Cirrhosis. **J Gastroenterol Hepatol**. v.30, p.236-43, 2015.

ITOH *et. al*. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. **Free Radic Biol Med**. v.36(10), p.1208-13, 2004.

IWATSUKI *et. al*. Recovery from “hepatorenal syndrome” after orthotopic liver transplantation. **N Engl J Med**. v.289, p.1155-1159, 1973.

JOHN;TH ULUVATH. Hyponatremia in cirrhosis: pathophysiology and management. **World J Gastroenterol**. v.21, p.3197-3205, 2015.

KAPITULNIK. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties. **Mol Pharmacol**. v.66(4), p.773-9, 2004.

KERR, WYLLIE, CURRIE. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. v.26, p.239–257, 1972.

Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**. v.181, p.471–474, 2002.

Kidney Disease Improving Global Outcome. (KDIGO 2012). Section 2: AKI definition. **Kidney Int Suppl**. v.2, p.19-36, 2012.

KLAHR; MILLER. Acute oliguria. **N Engl J Med**. v.338, p.671-675, 1998.

KRITMETAPAK *et. al*. Bile cast nephropathy in a patient with cholangiocarcinoma: a case report. Clin Case Rep. v.6, p.779-783, 2018.

LAMEIR *et. al*. Acute renal failure. **Lancet**. v.365, p.417-430, 2005.

LIEBERMAN; MARKS. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. 4 ed. **Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins**. v.1014, 2013.

LECLERC *et. al*. Néphropathie à cristaux biliaires/néphropathie cholémique. **Nephrol Ther**. v.12, p.460-462, 2016.

Leist M *et. al*. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **J Exp Med**. v.185, p.1481–1486, 1997.

LUCIANO *et. al*. Bile acid nephropathy in a bodybuilder abusing an anabolic androgenic steroid. **Am J Kidney Dis**. v.64, p.473-476, 2014.

MANIKANDAN; NAGINI. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. **Curr Drug Targets**. v.19, p.38-54, 2018.

MAZZA *et. al*. Heme oxygenase-1 gene expression attenuates angiotensin II-mediated DNA damage in endothelial cells. **Exp Biol Med (Maywood)**. v.228(5), p.576-83, 2003.

MCDONALD *et. al*. Animal nutrition. 7 ed. **Pearson Canada**. v.712, 2010.

MCGLONE; BLOOM. Bile Acids and the Metabolic Syndrome. **Ann Clin Biochem**. v.56, p.326-337, 2018.

MENON *et. al*. Inherited Disorders of Bilirubin Clearance. **Pediatr Res**. v.79, p.378-386, 2016.

MILLER *et. al*. Urinary diagnostic indices in acute renal failure: A prospective study. **Ann Intern Med 89**. p.47–50, 1978.

MILLER *et. al*. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. **Toxins**. v.2, p.2490-518, 2010.

MIYAZAKI *et. al.* Deoxycholic acid contributes to chronic kidney diseases-dependent vascular calcification. **[abstract] Circulation**. v.128A, p.14937, 2013.

MOHAPATR *et. al*. Urinary bile casts in bile cast nephropathy secondary to severe falciparum malaria. **Clin Kidney J**. v.9, p.644-648, 2016.

MOINOVA; MULCAHY. An electrophile responsive element (EpRE) regulates beta-naphthoflavone induction of the human gamma-glutamylcysteine synthetase regulatory subunit gene. Constitutive expression is mediated by an adjacent AP-1 site. **J Biol Chem**. v.273(24), p.14683-9, 1998.

MOREAU; LEBREC. Acute renal failure in patients with cirrhosis: perspectives in the age of MELD. **Hepatology**. v.37, p.233-43, 2003.

NAZAR *et. al*. Predictors of response to therapy with terlipressin and albumin in patients with cirrhosis and type 1 hepatorenal syndrome. **Hepatology**. v.51, p.219-226, 2010.

NEEDHAM. Management of acute renal failure. **Am Fam Physician**. v.72, p.1739-1746, 2005.

NEGI *et. al*. Acute kidney injury: Epidemiology, outcomes, complications, and therapeutic strategies. **Semin Dial**. v.31, p.519-527, 2018.
NOCTOR *et. al*. Oxidative stress and antioxidative systems: recipes for successful data collection and interpretation. **Plant Cell Environ**. v.39, p.1140-60, 2016.

OH *et. al*. Bilirubin attenuates the renal tubular injury by inhibition of oxidative stress and apoptosis. **BMC Nephrol**. v.14, p.105, 2013.

OSTROW *et. al*. New concepts in bilirubin encephalopathy. **Eur J Clin Invest**. v.33(11), p.988-97, 2003.

PARK *et. al*. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. **J Am Soc Nephrol**. v.13, p.858–865, 2002.

PERAZELL *et. al*. Diagnostic value of urine microscopy for differential diagnosis of acute kidney injury in hospitalized patients. **Clin J Am Soc Nephrol**. v.3, p.1615-1619, 2008.

PERAZELL *et. al*. Urine microscopy is associated with severity and worsening of acute kidney injury in hospitalized patients. **Clin J Am Soc Nephrol**. v.5, p.402-408, 2010.

PEREZ; BRIZ. Bile-acid-induced cell injury and protection. **World J Gastroenterol**. v.15(14), p.1677-89, 2009.

PERLMUTTER *et. al*. Urine serum urea nitrogen ratio: Simple test of renal function in acute azotemia and oliguria. **JAMA**. v.170, p.1533–1537, 1959.

PISOSCHI; POP. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur J Med Chem**. v.97, p.55-74, 2015.

POLONI *et. al*. Utility of a urine sediment score in hyperbilirubinemia/hyperbilirubinuria. **Clin Nephrol**. v.92, p.141-150, 2019.

RAFAT *et. al*. Bilirubin-associated acute tubular necrosis in a kidney transplant recipient. **Am J Kidney Dis**. v.61, p.782-785, 2013.

RAMESH; REEVES. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. **Am. J. Physiol. Ren. Physiol**. v.285, p.610-618, 2003.

RATLIFF *et. al*. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. **Antioxid Redox Signal**. v.25, p.119-46, 2016.

RAWAT *et. al*. Bilirubin-Induced Oxidative Stress Leads to DNA Damage in the Cerebellum of Hyperbilirubinemic Neonatal Mice and Activates DNA Double-Strand Break Repair Pathways in Human Cells. **Oxid Med Cell Longev**. 2018.

RIBEIRO. Nutrição animal. **Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. v.93, 2010.

ROMAN *et. al*. Do biliary salts have role on acute kidney injury development? **J Clin Med Res**. v.7, p.667-671, 2015.

ROMANO; VIEIRA JUNIOR. Do Biliary Salts Have Role on Acute Kidney Injury Development?. **J Clin Med Res**. v.7(9), p.667-671, 2015.

SALERNO *et. al*. Diagnosis, prevention and treatment of hepatorenal syndrome in cirrhosis. **Gut**. v.56, p.1310-8, 2007.

SAMUELSON. Tratado de histologia veterinária. Elsevier. v.527, 2007.

SCHMID. Bilirubin Metabolism in Man. **N Engl J Med**. v.287, p.703-9, 1972.

SHAPIRO *et. al*. Hyperbilirubinemia and kernicterus. **Clin Perinatol**. v.33(2), p.387-410, 2006.

SHIMIZU *et. al*. Renal inflammatory changes in acute hepatic failure-associated acute kidney injury. **Am J Nephrol**. v.37(4), p.378-88, 2013.

SIES. Oxidative stress: from basic research to clinical application, **Am. J. Med**. v.91, p.31-38, 1991.

SINGRI *et. al*. Acute renal failure. **JAMA**. v.289, p.747-751, 2003.

SLACK *et. al*. Renal dysfunction in chronic liver disease. **Critical Care**. v. 14, p.214, 2010.

SONG *et. al*. Dose-Response of Five Bile Acids on Serum and Liver Bile Acid Concentrations and Hepatotoxicty in Mice. **Toxicol Sci**. v.123, p.359-67, 2011.

SPINELLA *et. al*. Albumin in chronic liver disease: structure, functions and therapeutic implications. **Hepatol Int.** v.10, p.124-132, 2016.

STEVENS *et. al*. Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease: Synopsis of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2012 Clinical Practice Guideline. **Ann Intern Med**. v.158, p.825-830, 2012.

STICOVA; JIRSA. New insights in bilirubin metabolism and their clinical implications. **World J Gastroenterol**. v.19, p.6398-6407, 2013.

SU *et. al*. Oxidative Stress and Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies. **Adv Exp Med Biol**. v.1165, p.585-604, 2019.

THERMO FISHER CIENTIFIC, Massachusetts, USA. **MitoSOX™ Red**. Disponível em: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M36008#/M36008. Acesso em: 08 jan. 2020.

TSAI; TARNG. Beyond a Measure of Liver Function—Bilirubin Acts as a Potential Cardiovascular Protector in Chronic Kidney Disease Patients. **Int J Mol Sci**. v.20, p.117, 2018.

VAN SLAMBROUCK *et. al*. Bile cast nephropathy is a common pathologic finding for kidney injury associated with severe liver dysfunction. **Kidney Int.** v.84(1), p.192-197, 2013.

VARGA *et. al*. Disruption of renal arginine metabolism promotes kidney injury in hepatorenal syndrome in mice. **Hepatology**. v.68, p.1519-1533, 2018.

VELEZ *et. al*. Reappraising the Spectrum of AKI and Hepatorenal Syndrome in Patients With Cirrhosis. **Nat Ver Nephrol**. v.16, p.137-155, 2020.

WELLS *et. al*. Oxidative damage in chemical teratogenesis. **Mutat Res/Fundam Mol Mech Mutag**. v.396, p.65-78, 1997.

WONG *et. al*. Working Party Proposal for a Revised Classification System of Renal Dysfunction in Patients With Cirrhosis. **Gut**. v.60, p.702-709, 2011.

WU *et. al*. Severe hyperbilirubinemia is associated with higher risk of contrast-related acute kidney injury following contrast-enhanced computed tomography. **Plos One**. v.15, p.4, 2020.

ZEISS. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice**. Vet Pathol**. v.40, p.481–95, 2003.

ZUCCO *et. al*. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. **Toxicol In Vitro**. v.18, p.153-163, 2004.

ARTIGO CIENTÍFICO

A ser submetido para Toxicology and Applied Pharmacology

Evaluation of Bilirubin and Bile Acids Effects in Cultivated Kidney Cells

Caroline Rodrigues Silveira[a]; Marcelo Affonso Begossi Martins[b]; Keli Cristine Reiter[d]; José Antonio Tesser Poloni[e]; Tiago Franco de Oliveira[a,c]; Dinara Jaqueline Moura[f,*]; Liane Nanci Rotta[a,*].

[a]Post Graduation Program in Health Sciences, Federal University of Life Sciences of Porto Alegre (UFSCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

[b]Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFSCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

[d]Bioanalytic Unit, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFSCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

[e]Health School, University of Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil.

[f]Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFSCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding authors:

Liane N. Rotta and Dinara J. Moura

Sarmento Leite, 245 – Centro Histórico - Porto Alegre/RS – 90.050-170 - Brasil

e-mail: lnrotta@ufcspa.edu.br and dinaram@ufcspa.edu.br

Phone +55 51 3303 8889 - Fax number: +55 51 3303 8810

Abstract

Acute kidney injury (AKI) secondary to liver damage characterizes hepatorenal syndrome. Non-hemodynamic tubulotoxic factors, such as the endotoxins bilirubin and bile acids (BAs) might mediate parenchymal renal injury. Indeed, a greater number of renal tubular epithelial cells and granular casts, with a renal origin, is observed in patients with hyperbilirubinemia/hyperbilirubinuria and tubular injury. **Objective:** Assess the cytotoxicity and oxidative potential of bilirubin and BAs in renal cells (HEK293T), besides the protective effect in the co-treatment with cisplatin. Methodology: Cell viability, oxidative stress, cell death, and cell/medium concentration were measured by neutral red, mitosox and mitostatus assays, annexin and propidium iodide, and HPLC, respectively. **Results:** Acute treatment with bilirubin does not alter significantly the cell viability, while the chronic treatment reduces it (100 µM, 25.6±5.6%; $p<0.001$). Primary BAs: cholic (CA: 150±33.7%, $p<0.005$) and chenodeoxycholic acid (CDCA: 281±143%, $p<0.0001$) showed less toxicity (40 µM) compared with secondary and compound BAs (60 µM): deoxycholic (DCA: 87±8%, $p<0.001$), ursodeoxycholic (UDCA: 86±8%, $p<0.001$) and taurocholic acid (TCA: 95±23%, $p<0.001$). Bilirubin and BAs treatment prevents the cytotoxicity induced by cisplatin (Bilirubin: 88±27%, $p<0.005$; CA:133±62%; $p<0.005$; CDCA: 110±61%, $p=0.01$; TCA: 99±63%, $p<0.005$) and not produced oxidative stress. Higher bilirubin and BAs concentration were found in the culture medium when compared to the intracellular compartment (24h) and bilirubin causes renal cell death mainly by necrosis (83±3%; $p<0.05$). Conclusion: Bilirubin induced higher cytotoxicity on HEK293T cells than BAs. Cell death by necrosis could be a contributing factor to AKI development in liver diseases, especially in chronic bilirubin exposition.

Keywords: bilirubin, bile acids, toxicity, renal cells.

Abbreviations:

CA: cholic acid; DCA: deoxycholic; CDCA: chenodeoxycholic acid; UDCA: ursodeoxycholic acid; TCA: taurocholic acid; TUDCA: tauroursodeoxycholic acid.

Introduction

The occurrence of AKI in patients with end-stage liver disease constitutes one of the most challenging clinical scenarios in hospital and critical care medicine (Velez *et al.*, 2020). Hepatorenal Syndrome (HRS) is a complication that occurs in patients with cirrhosis and portal hypertension, with an incidence of 20% in hospitalized patients. Besides, when it is accompanied by ascites has up to a 40% probability of developing HRS-1, a severe form of AKI, which is associated with considerable mortality, within 5 years (Weil *et al.*, 2017).

The pathogenesis of HRS-1 is characterized as a functional disorder, which affects renal vasculature tone, with renal blood flow absence/reduction, caused by portal hypertension and arterial vasodilation. New insights suggest that non-hemodynamic tubulotoxic factors, such as endotoxins and bile acids (BA), might mediate parenchymal renal injury in patients with cirrhosis, suggesting that concurrent mechanisms, including those traditionally associated with HRS-1 (reduction in renal blood flow, portal hypertension and maladaptive arterial vasodilation) and non-traditional factors, contribute to AKI development in these patients (Velez *et al.*, 2020).

Serum bile and bilirubin levels increase in the setting of liver failure (Van Slambrouck *et al.*, 2013). Patients with HRS show yellow urine as consequence of conjugated bilirubin increase (Fogazzi, 2010). Therefore, severe hyperbilirubinemia may lower pre-renal perfusion by decreased intraglomerular pressure, predisposing to AKI, associated with direct tubular damage caused by bilirubin. Bile acids (BAs) or bilirubin with low water solubility can cause cast formation within the low pH microenvironment of distal nephrons (Wu *et al.*, 2020). Poloni *et al.* (2019) show that

patients with higher urinary bilirubin levels present the urine sediment consistent with tubular injury independent of AKI or non-AKI.

Cirrhotic physiology undoubtedly contributes to kidney injury, but a high load of filtered BAs also can contribute to tubular injury, perhaps in cells that have been primed by kidney ischemia. This is evidenced by the presence of exfoliated tubular cells (swollen and vacuolated) seen on urine microscopy and tubular cells with distorted mitochondria on kidney biopsy. The BAs can elicit tubular damage, tubulointerstitial inflammation, lipid peroxidation and oxidative stress in the kidney (Fickert *et al.*, 2013; Kaler *et al.*, 2004). Overall, the combination of kidney hypoperfusion, direct BA tubular toxicity and obstructing bile casts leads to AKI and is described most accurately as "cholemic nephropathy" (Leclerc *et al.*, 2016; Rafat *et al.*, 2013). The likelihood of bile cast formation increases with prolonged exposure to high levels of bilirubin (Van Slambrouck *et al.*, 2013). In a clinicopathological study on patients with jaundice, histological analysis in renal autopsies shows tubular bile casts, besides higher serum bilirubin levels. The acute tubular injury was observed in 77% of the cases in the bile casts nephropathy group, with the patients prone to bile deposition in the kidney (Van Slambrouck *et al.*, 2013).

In the HRS, the injury caused by hyperbilirubinemia is greater than that caused by hemodynamic disorders, including systemic and splanchnic vasodilation (Slack *et al.*, 2010). At middle concentration, but within the reference value, bilirubin can act either as a circulating antioxidant (Boon *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2013) protecting the kidneys (Huang *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2018; Tsai *et al.*, 2017), or as an anti-inflammatory compound (Keshavan *et al.*, 2005). Several studies present the unquestionable toxicity of bilirubin at high concentrations, with cytotoxic effects (Fuji *et al.*, 2010; Poloni *et al.*, 2019; Qaisiya *et al.*, 2017; Rawat *et al.*, 2018). However, the effect of serum or urine

bilirubin and BAs on HRS and renal failure is still uncertain, since the cutoff value for bilirubinemia is not fully described, as well as how much bilirubin affects the kidney (Wu *et al.*, 2020).

Considering the condition of the bilirubin and BAs accumulation in the HRS pathophysiology, this study aims to evaluate the cytotoxicity and potential to alter the redox state, the production of oxidative stress, the cell viability and death caused by bilirubin and BAs on renal cell line (HEK293T), collaborating to the comprehension of the bilirubin and BAs roles in the injury in the renal cells.

Materials and methods

Materials

The human embryonic kidney cell line (HEK-293T) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) bank. DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), FBS (fetal bovine serum), PBS (phosphate-buffered saline), trypsin-EDTA, L-glutamine and penicillin/streptomycin were obtained from Gibco (Grand Island, NY, USA). Bilirubin, BAs such as cholic acid (CA), chenodeoxycholic acid (CDCA), deoxycholic acid (DCA), lithocholic acid (LTCA), taurodeoxycholic acid (TDCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA), neutral red and cisplatin were obtained from Sigma Aldrich (San Luis, Missouri, EUA). Annexin V-PI (propidium iodide) was purchased from BD Biosciences (San Diego, CA). Mitosox and mitostatus were acquired from Thermo Fischer (Waltham, Mass, EUA).

Mammalian Cell culture and Treatment

HEK-293T cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FBS, 0.2 mg/mL glutamine, 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL of streptomycin. The cells were kept in tissue culture flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 and grown until 80% confluence was obtained for all experiments. The neutral red assay was performed in a 96-well plate, with 1.6 x 10^4 cells per well. The remaining assays were performed with 1x10^5 cells per well, in 12-well plates. The stock solutions of bilirubin or primary, secondary and compound BAs were made by diluting in 2% ethanol and culture medium. Negative control experiments were carried out with exposure of the cells to the same concentration of 2% ethanol in the medium. When reached 80–90% confluency, cells were treated with bilirubin or BAs (40, 60, 80 and 100 µM) (Shellman et al., 2017) for 24h (acute treatment) or 72h (chronic treatment).

Cell Viability Analysis

To analyze the cell viability, we performed neutral red uptake (NRU) assay. The assay was carried out according to Borenfreund; Puerner (1985), with some modifications. Briefly, after treatment, cells were washed with 250 µL of PBS before the addition of 250 µL neutral red dye (25 µg/mL) dissolved in serum-free media and incubated for 3 h at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator. Cells were washed with PBS, and 125 µL of a desorb solution (ethanol:acetic acid:water, 50:1:49) was added, followed by gentle shaking for 30 min for complete dissolution. Absorbance was measured at 540 nm using a microtiter plate reader. Cell viability was expressed as the percentage of the negative control.

Co-treatment of Bilirubin or Bile Acids with Cisplatin

Four groups were used: (1) negative control; (2) cells treated only with cisplatin; (3) cells treated with cisplatin and bilirubin or BA; (4) cells treated only with bilirubin or BAs. The cells were pre-treated with bilirubin (60 μM) or BA (CA, CDCA and TDCA: 100 μM) during 6 h for the compounds to enter the cells and after the cells received treatment with cisplatin (10 μM) until completing 24 h of treatment. The cell viability after the treatment was assessed.

Chromatography Quantification of Bilirubin and BAs

The cells were treated with IC50 value of CDCA (292 μM), UDCA (612 μM), TCA (178 μM) and bilirubin (60 μM). The treatment medium, as well as the cells, were analyzed by chromatography (two samples of each well of the treatment). The medium samples were collected, resuspended in methanol 60% and frozen in liquid nitrogen. Before the chromatography, the samples were centrifuged (10 min; 15000 rpm) and the supernatant was used. The determination of BAs was achieved by the dilution of 10 μL of cell culture media in 990 μL of dimethyl sulfoxide. After the complete solubilization, aliquots of 10 μL of solution were injected in a Nexera UFLC system coupled to an LCMS-8040 triple quadrupole mass spectrometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The electrospray parameters were set as follows: desolvation line temperature, 250°C; heating block temperature, 400°C; drying gas, 18 L/min; and nebulizing gas, 2 L/min. Collision-induced dissociation was obtained with 230 kPa argon pressure. The detection of DCA (m/z 391.20 → 345.35), TDCA (m/z 514.20 → 124.00) and UDCA (m/z 391.20 → 391.40) were conducted with ionization in the

negative mode (ESI−, [M-H]−). Concomitantly, positive ionization (ESI+, [M+H]+) was used to determine bilirubin (m/z 585.30 → 299.20). The chromatographic separation was achieved with a 75 × 2.0 mm i.d., 2.2 µm, Shim-pack XR-ODS II column (Shimadzu, Kyoto, Japan) eluted with a flow rate of 500 µL min−1 and 50°C with a gradient of 0.2% acetic acid in water (A) and acetonitrile (B) as follows: 0 – 1.5 min, 10 – 100% of B; 1.5 – 3.0 min, 100% of B; 3.0 – 3.1 min, 100 – 10% of B; 3.1 – 6.5 min, 10% of B. For data evaluation, LabSolutions software (Shimadzu, Kyoto, Japan) was used for data treatment.

Oxidative Stress Parameters

Mitosox

The Mitosox assay is used to identify oxidation of superoxide, through a reagent that acts on living cells selectively reaching mitochondria. This dye is oxidized by superoxide exclusively (Thermo Fischer Scientific, Mass, USA). After the treatments with bilirubin and BAs, in the presence or absence of cisplatin, the cell content was centrifuged (10 min; 2000 rpm). The pellets were resuspended in PBS and the Mitosox dye was added, the samples were incubated at 37ºC for 30 min, protected from light. Then, the samples were washed with PBS and centrifuged for 10 minutes/2000 rpm; the cells were resuspended with PBS and the analysis was performed on the flow cytometer, FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) was used to calculate the median fluorescence, and 10,000 events were counted in each experiment.

Mitostatus (Mitochondrial Membrane Potential Assay)

The mitochondrial membrane potential assay was executed using MitoStatus® TMRE following the manufacturer's recommendations. MitoStatus® is a cationic and lipophilic fluorescent dye that is readily sequestered by active mitochondria. When the mitochondrial membrane is depolarized, the fluorescence shows diminished levels. After treatment, an aliquot of suspension cell was incubated with MitoStatus® (57 nM) for 30 min at 37°C, protected from light. The samples were then analyzed in the FACS Calibur Cytometer with Cell Quest software (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). A total of 10,000 events were measured per sample and the percentage of mitochondrial depolarization was determined.

Cell Death

The type of cell death was assessed by staining with Annexin and PI. After the treatment (with bilirubin or BAs), cells were trypsinized, collected and resuspended in 40 µL of binding buffer with 2 µL Annexin V-PE. Cells were incubated for 15 min in the dark at room temperature. After incubation, 160 µL of binding buffer and 2 µL of PI were added. Cells were incubated for 5 min and additional 200 µL of binding buffer were added (BD Biosciences, San Diego, CA). Data were collected using FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) and analyzed by the CellQuest Pro software (Becton Dickinson), in a total of 10,000 events per sample; fluorescence was measured and the percentage of viable, recent apoptotic, late apoptotic and necrotic cells was determined.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Turkey, Bonferroni or Sidak's post-hoc Linear regression, IC50 results, one-sample t test and the results of the experiments in the flow cytometer were analyzed by Graphpad 8.0. Data were considered statistically different when $p< 0.05$.

Results

The viability after acute and chronic treatments with bilirubin indicates a slight decrease in viability after 24h of bilirubin treatment, whereas, there is a significant decrease in cell viability after 72h of treatment (Figure 1). It is interesting to note the significant decrease in viability after treatments with bilirubin at concentrations of 80 and 100 µg/mL at 24 and 72 hours. The treatments with primary BAs (CA and CDCA), secondary BAs (DC and UDCA), TCAc and TDCA compounds are shown in Figure 2, and showed that none of the compounds induces decreased viability at any of the tested concentrations and times. When we compared the BAs between each other, in the 24h cell treatment the primary BAs showed a higher percentage of viable cells at 40 and 60 µM, which indicates that primary BAs are less toxic to the cells than the secondary ones. When compared to the negative control, only CDCA showed a greater difference. With 72h treatment, there was only one difference in viability between the treatments with the primaries BAs (CA and CDCA) at 40 µM. When compared to the negative control, none of the BAs showed a significant difference.

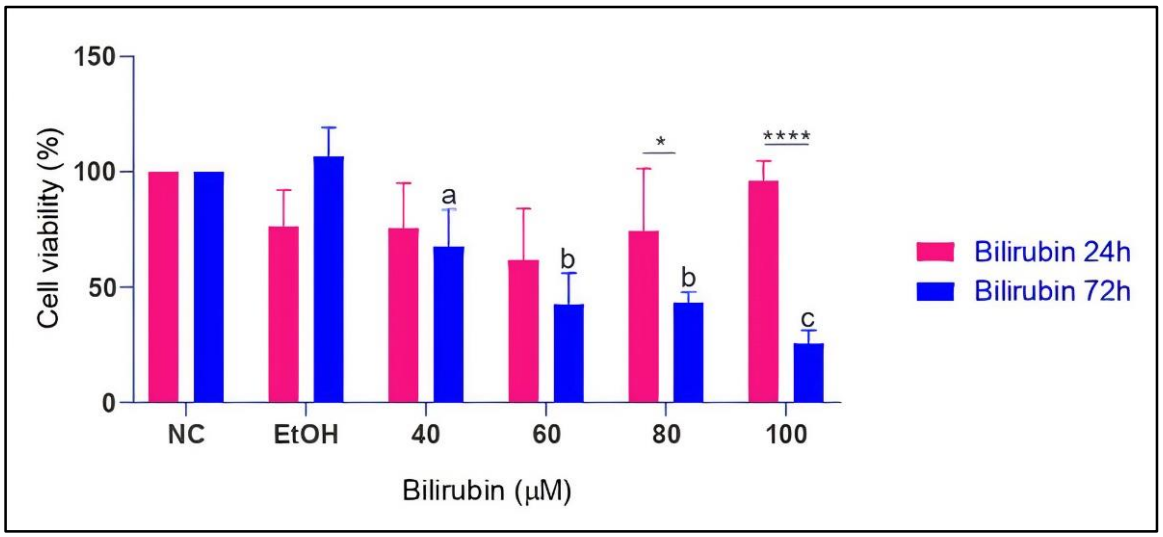


Figure 1. Effect of bilirubin on the HEK293T cell viability following 24 and 72h of treatment. Bars represent mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments, in triplicate. ****p<0.0001; *p<0.05 comparing 24h to 72h and a: p<0.05; b: p<0.001; c: p<0.0001 comparing 72h to negative control (NC: represent a cell culture without bilirubin). Statistical analyses were carried out using two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test.

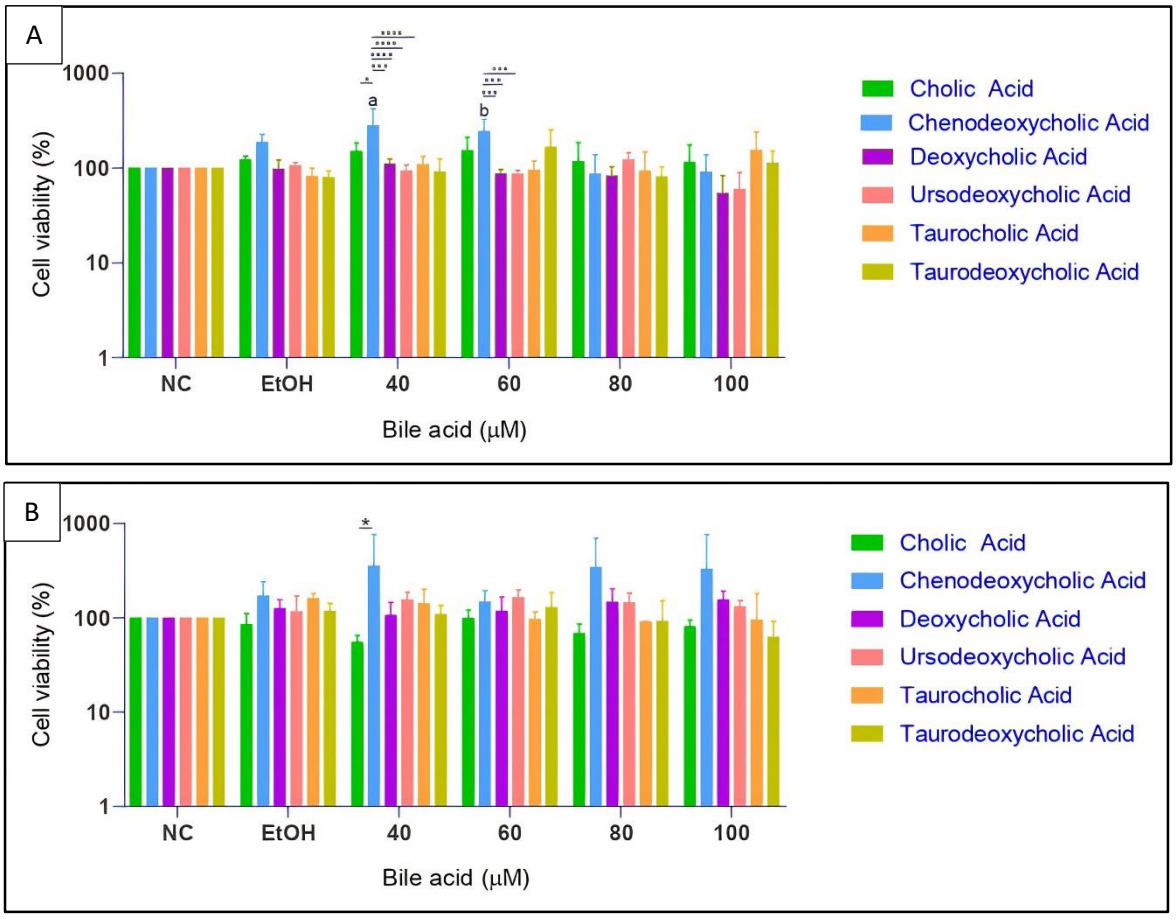


Figure 2. Effect of BAs on the HEK293T cell viability upon 24h (A) and 72h (B) of cell treatment. Bars represent mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments, in triplicate. ****p<0.0001, ***p=0.001 and *p<0.05 comparing the BAs between each other, and a: p<0.0001; b: p<0.05 compared to the negative control. (NC: represent a cell culture without BAs). Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

The effects of bilirubin and BAs in co-treatment with cisplatin were also evaluated, for that, the IC50 of bilirubin and BAs was calculated. Based on the cell viability results, it was possible to calculate the IC50 of bilirubin (60 µM) and make a theoretical extrapolation for the secondary DCA (292 µM) and UDCA (612 µM), and the compound TCA (178 µM). The BAs that were not possible to obtain an IC50 value were the primary CA and CDCA and the compound TCA. To determine the IC50,

HEK293T cells were treated with cisplatin at 1, 2.5, 5, 10, 15, and 20 µM for 24h. The IC50 value found for cisplatin was 10 µM (Figure 3).

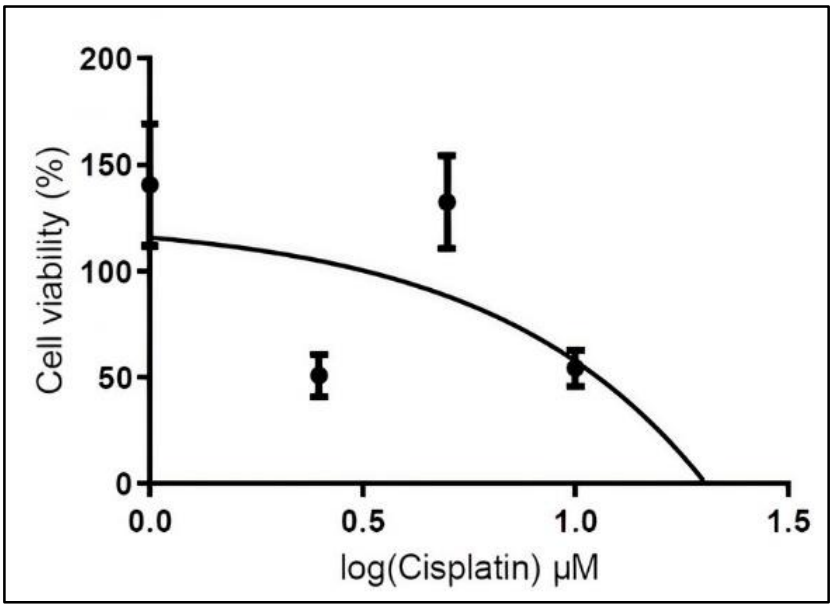


Figure 3. IC50 Cisplatin curve. The treatment of the HEK293T cells was in four independent experiments, in quadruplicate. The results present mean±SD of the values of cisplatin (linear regression).

The compounds (bilirubin or BAs) that showed an IC50 value were quantified by HPLC showing its concentration in the medium and the culture cells (Table 1), to know, in the shorter incubation time, if the compounds are entering in the cells.

Table 1 shows that the compounds were detected in the medium and in the cells. Also, there is a pattern that repeats between the bilirubin and the BAs samples, with the medium presenting a higher concentration than the cells samples.

	Concentration (µg/mL)
Bilirubin (cells)	2.8
Bilirubin (medium)	4.7
Deoxycholic (cells)	2.5
Deoxycholic (medium)	330.8
Ursodeoxycholic (cells)	26.7
Ursodeoxycholic (medium)	682.6
Taurocholic (cells)	7.4
Taurocholic (medium)	80.1

Table 1. Bilirubin and BAs concentration by HPLC, with 24h treatment.

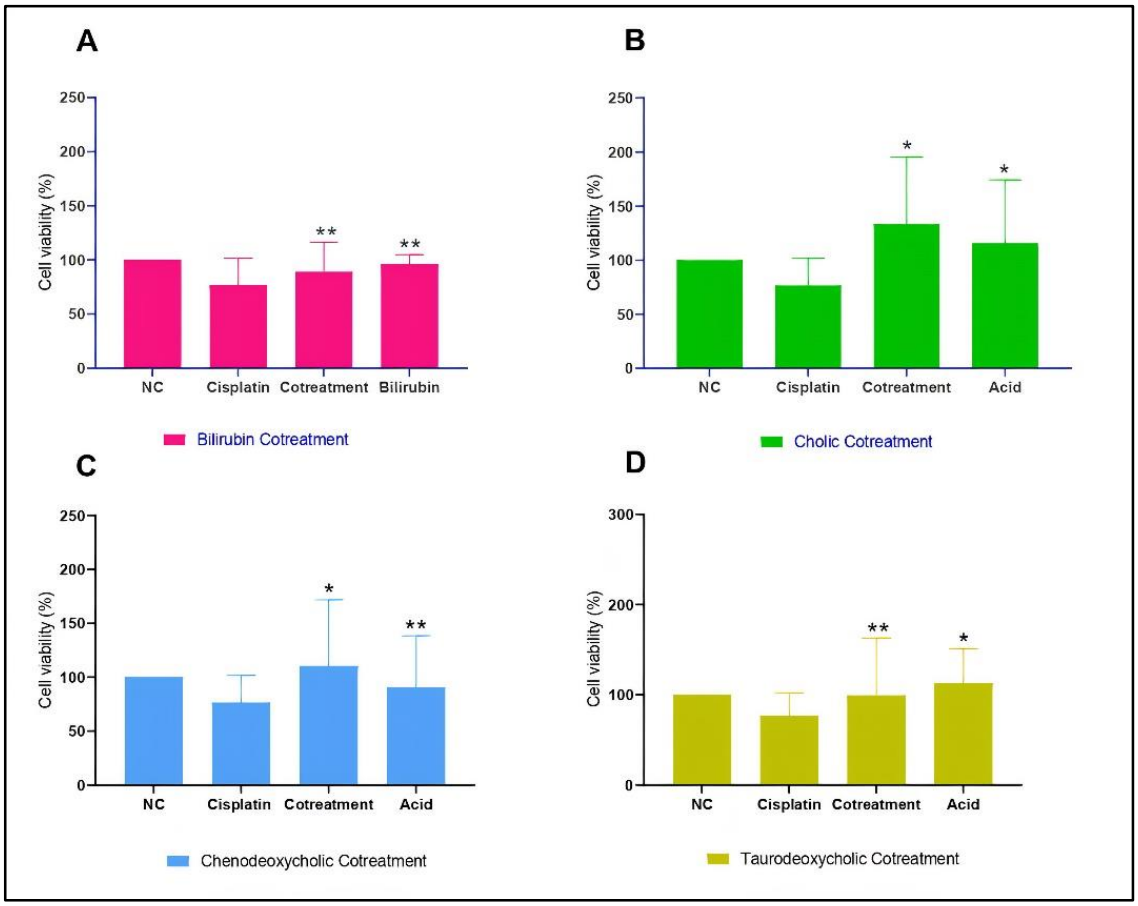


Figure 4. Effect of bilirubin or bile acids on the HEK293T cells, along with the nephrotoxicity induced by cisplatin. The cells were pre-incubated with Bilirubin (A - 60 µM) or BAs (100 µM): CA (B), CDCA (C) and TDCA (D) during 6h and posteriorly treated with cisplatin (10µM) until completing 24 hours of treatment. Bars represent mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments, in quintuplicate. *p<0.05 and **p<0.01 compared cisplatin treatment (Statistical analyses were carried out using one sample T test).

TDCA, CA, CDCA and bilirubin showed to improve the nephrotoxic effect of cisplatin, presenting values similar to NC (Figure 4). The greater cell viability (133.4%; p<0.01) was observed with the primary CA pretreatment, followed by CDCA (110.35%; p<0.01) indicating a protective action to the nephrotoxic action of cisplatin.

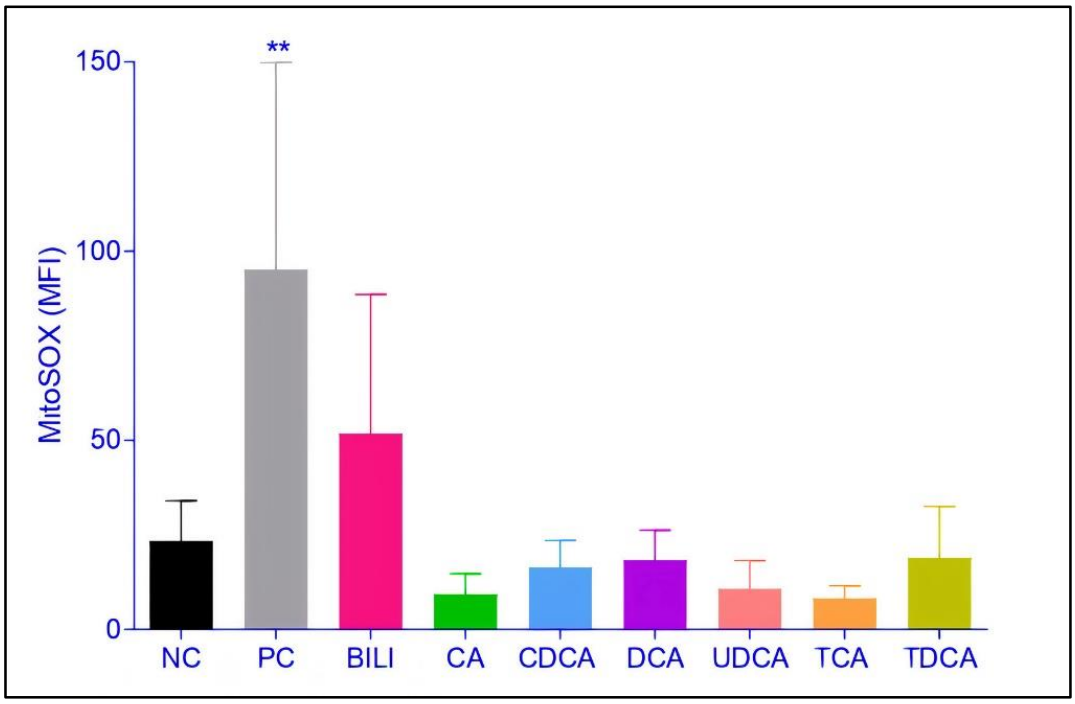


Figure 5. Measurement of the production of oxidative stress in HEK-293T cells, treated for 24h with a positive control (cisplatin,10 µM), bilirubin (60 µM) or BAs (CA and CDCA: 100 µM; DCA: 292 µM; UDCA: 612 µM; TCA: 178 µM; TDCA: 100 µM), analysed with Mitosox reagent, followed by flow cytometry analysis.

Results are presented as mean±standard deviation (SD) of three independent experiments, in triplicate. **p<0.01 (in comparison to negative control). Statistical analyses were carried out using one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc.

To observe if the compounds were capable of producing oxidative stress in the renal cells, they were treated with bilirubin or with BAs: primary (CA and CDCA), secondary (DCA and UDCA), and TCA and TDCA compounds. After that, they were subjected to the mitosox (Figure 5) and mitostatus (Figure 6) assay for 24h. The results showed that only the positive control (treatment with cisplatin) induces a significant result ($p<0.05$) increasing the production of superoxide anion (Figure 5) and changing the mitochondrial membrane potential (Figure 6). Bilirubin and BAs do not induce oxidative stress in the renal cell.

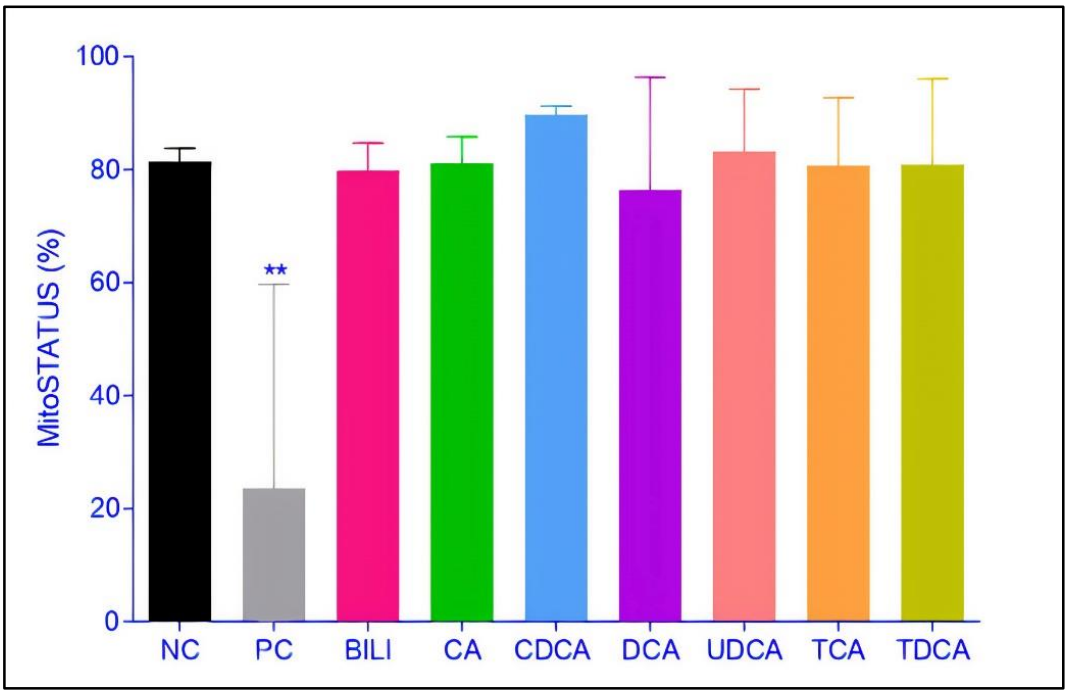


Figure 6. Measurement the production of oxidative stress in HEK293T cells, treated for 24h with a positive control (cisplatin), bilirubin or BAs. Analyzed with Mitostatus reagent, followed by flow cytometry analysis. Results are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments, in triplicate. **p<0.01 (in comparison to negative control). Statistical analyses were carried out using one-way ANOVA and Bonferroni post-hoc.

As a significant decrease in bilirubin-induced cell viability was observed (Figure 1), this study also investigated the type of cell death induced by this compound and BAs. A calculation using the percentage of positive cells, separating into viable cells (negative for Annexin and PI), cells with recent apoptosis (negative for PI and positive for Annexin), cells in late apoptosis (positive for PI and Annexin), and cells in necrosis (negative for Annexin and positive for PI) indicate that bilirubin induced significant necrosis (Figure 7). No difference was observed after treatment with BAs compared to the negative control.

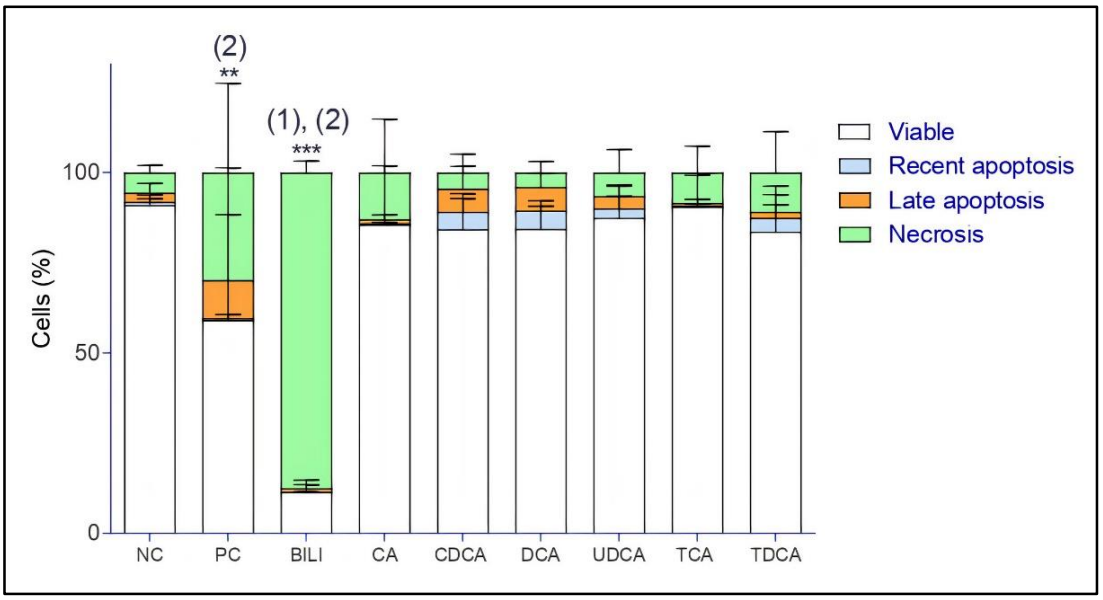


Figure 7. Cell death in HEK293T cells, treated for 24h with cisplatin (positive control), bilirubin or BAs. Analysed with Annexin and PI reagents, followed by flow cytometry analysis. Results are presented as mean ± standard deviation (SD) of three independent experiments, in triplicate. (1) and ***p<0.001 in

Discussion

This study aimed to analyze the effects of bilirubin and bile acids (BA) on the cytotoxicity, the nephrotoxicity induced by cisplatin, the oxidative stress production and to identify the type of cell death in a renal cell line (HEK-293t), considering the accumulation of these compounds in pathological conditions such as hepatorenal syndrome (HRS) or acute kidney injury, among others. Initially, the viability of the renal cell line was analyzed when exposed to bilirubin and BAs. Like BAs, bilirubin also has an uncertain role, existing studies do not allow the establishment of a single role for

these compounds, given the different experimental models or tissue evaluated, thus defining the protective or toxic role of bilirubin.

Wu *et al*. (2020) describe the role of bilirubin as a protector of renal cells in hyperbilirubinemia, but there is still no consensus on the cutoff value of hyperbilirubinemia and its effect on renal failure, showing that serum total bilirubin concentrations >2.0 mg/dL, in cirrhosis or carcinoma, is a risk factor for acute kidney disease. Van Slambrouck *et al*. (2013), in a clinicopathological study of 44 patients with jaundice and renal histological analysis (41 autopsies and 3 biopsies), showed that 24 patients had bile casts involving the distal nephron and in 6, with extension to the proximal tubules. The authors concluded that more than half of patients are prone to deposition of bile in the renal tubules.

During the progression of acute liver failure (ALF) and hyperbilirubinemia, in the rejection of the liver graft, renal failure associated with ALF developed gradually (Shimizu *et al*., 2013). Acute renal disease (ARD) associated with ALF appears to be mediated by damage to renal tubular epithelial cells (RTEC) with an accumulation of bile pigment and renal inflammation. Then, the multiple mechanisms, including tubular injury and renal inflammation, may be involved in the AKI development associated with ALF.

Our results suggest that the cells' acute exposure to bilirubin does not show a toxic role of this compound for renal cells, however in chronic exposure (72h), bilirubin showed greater toxicity, decreasing cell viability. The exposure of renal cells to primary BAs (CA and CDCA), secondary (DCA, UDCA and lithocholic acid - LTA) and compound BAs (TCA and TDCA) was also studied. Due to the difference in BAs structures, they can act differently in the body (Chiang *et al*., 2013). Conjugated BAs are more hydrophobic (Di Ciaula *et al*., 2017) and the conjugations to glycine or taurine

give rise to TCA, TDCA, and glycocholic acid (Smith *et al*., 2013). The hydrophobicity of BAs in the liver is UDCA <CA <CDCA <DCA <LCA also influencing liver toxicity with primary BAs showing less toxicity than secondary ones (Song, 2011). According to this, in our study, we observed that the secondary BAs proved to be more toxic, followed by TCA, with primary BAs and the compound TDCA showed the highest cell viability (compared to negative controls); thus, the BAs toxicity order in renal cells would be as follows: DCA> UDCA> TCA> TCDA> CA> CDCA. However, in studies using liver cells from rats, DCA caused more toxicity than LCA (compared to other BAs), indicating that perhaps hydrophobicity does not always influence the toxicity degree (Delzenne *et al*., 1992).

Few studies are pointing to the intracellular bilirubin/BAs concentration, especially focusing on renal effects, in conditions with the accumulation of these compounds and, therefore, the role is inconclusive. We measured the bilirubin/BAs cell and medium concentration to know the concentration of the compounds that reaches the cells or stay in the culture medium. We observe a fewer compounds concentration in the cells (compared to medium), showing that is necessary a great extracellular concentration to observe the intracellular studied effects, especially BAs (with a higher medium/cell relation to DCA, UDCA and TCA), which is in according to the toxicity in renal cells. Bilirubin was the compound that reached more easily the cells, as we can see in the treatment that the concentration of the compound in the cells was more than half of what we can see in the medium.

Cisplatin is widely used against solid tumors, but its adverse effects include nephrotoxicity, neurotoxicity and ototoxicity (Cao *et al*., 2018). Cisplatin-induced nephrotoxicity can be characterized by the great death of cells in the proximal tubule, both by necrosis and apoptosis, inducing renal failure with increased serum creatinine

and urea (Ramesh; Reeves, 2003). Cisplatin accumulates especially in the proximal tubules in higher quantity than in any other tissue in the body (Zucco *et al*., 2004). Miller *et al*. (2010) demonstrated that OS is a sign of cisplatin toxicity that acts both by the extrinsic pathway, generating ROS (reactive oxygen species) (Gupta *et al*., 2012) and by intrinsic route, using ROS to facilitate the release of cytochrome c, activating pore-stabilizing generating genotoxic stress, which activates pathways that contribute to apoptosis and resistance to chemotherapy (Dasari *et al*., 2014; Martindale *et al*., 2002).

Bilirubin could attenuate cyclosporine-induced nephropathy of tubular injury by inhibiting OS and apoptosis in HK-2 cells with higher levels of bilirubin, and the greater suppression of OS might attenuate the progression of CKD (Boon *et al*., 2014; Markan *et al*., 2008; Oh *et al*., 2013). Importantly, all the above clinical studies are in support of renal protection by bilirubin and were based on the mild elevation of serum bilirubin levels often within a normal range (<1.2 mg/dL). Indeed, due to the toxic characteristics to renal cells, cisplatin was used for co-treatment with bilirubin and BAs for analysis of its possible protective effect. The results of this study indicate that the BAs analyzed (only those that did not obtain an LD50 value after the neutral red test) maintained the cell viability, when compared to the negative control and among themselves, especially the CA, demonstrating greater viability among all compounds. Indeed, bilirubin shows reduced renal cell viability (compared to negative control) but it protects the cisplatin-treated cells (compared to cisplatin-treated cells). Lv *et al.* (2016) showed that biliverdin (a cytotoxic metabolic waste product of bilirubin) can protect against cisplatin-induced cell apoptosis through the anti-oxidative effects.

Evidence suggests that OS is a hallmark of bilirubin-induced toxicity. EROS (mainly in the form of superoxide radical and hydrogen peroxide) has an important role

in the initiation and progression of renal diseases especially in the process of renal tubular injury (Itoh, 2004). The literature findings are very controversial regarding the role of bilirubin in the development of renal injury (Romano; Junior, 2015) and studies suggest that bilirubin may be an endogenous agent with cytoprotective activity against injury caused by OS (Fuji *et al*., 2010; Mazza *et al*., 2003). In our study, OS was analyzed by mitosox and mitostatus experiments, showing that bilirubin was not capable of generating OS in HEK-293T cells (observed only in positive control).

Toxic BAs, especially secondary ones, can activate hepatocyte death receptors directly and induce oxidative damage, causing mitochondrial dysfunction and inducing endoplasmic reticulum stress. When these compounds are absorbed and accumulate within the bile cells, they can also cause apoptosis (Perez; Briz, 2009). TUDCA (tauroursodeoxycholic acid) has been shown to reduce OS, and decrease apoptosis and inflammation (in vitro and in vivo) and also plays a role as an epigenetic modulator, a therapeutic agent in some types of cancer (Kusaczuk, 2019).

In structural differences, more hydrophilic BAs can be less toxic, and in the liver and gastrointestinal cells, they can act with a protective role. On the other hand, the more hydrophobic BAs show more cytotoxicity, being able to generate OS and DNA damage. In this situation, we can cite as a main consequence the increase of intracellular production of ROS, besides the alteration of the tumor suppression genes (Di Ciaula *et al*., 2017). In this study, BAs were also analyzed using the mitosox and mitostatus technique and none of them generated any type of OS when compared with positive and negative controls, as well as bilirubin.

Finally, the type of cell death caused by bilirubin and BAs was analyzed after treatment of renal cells. It is known that hydrophobic BAs induce apoptosis in hepatocytes, while hydrophilic BAs increase intracellular cAMP, activating the MAPK

and PI3K pathways to protect liver cells from apoptosis (Amaral *et al*., 2009). Also, BAs have been shown to increase cell proliferation and apoptosis in the liver and intestine (Sola *et al*., 2006). When analyzing the results of this study, it is observed that even though BAs present low toxicity to renal cells, most of them caused death by necrosis in cultured renal cells.

Although there are studies that show that unconjugated bilirubin initially induces apoptosis in primary cultures of rodent cerebellar and cortical neurons (Rodrigues *et al*., 2002), in rodent astrocytes (Silva *et al*., 2001) or even murine hepatoma (Seubert *et al*., 2002), it is not yet known whether bilirubin induces only necrosis or apoptosis, or even both. Apoptosis and necrosis represent extremes of a spectrum of morphological and biochemical possibilities (Leist *et al*., 1998). There are also not many studies pointing to the type of cell death caused by bilirubin in renal cells, but when we analyze the results of this study we can see that more death from necrosis than apoptosis occurred when compared to the negative and positive controls.

Necrosis was the type of cell death predominantly induced by bilirubin. This is according to the findings observed in the urine microscopy (Poloni *et al*., 2019) showing that patients with higher bilirubinuria present the urine sediment with a greater number of markers of acute tubular necrosis such as granular casts (GCs) and renal tubular epithelial cells (RTECs), showing higher urine sediment scores consistent with tubular damage (acute tubular necrosis). The presence of a larger number GCs and RTECs, originating in the kidneys, suggests an association between hyperbilirubinemia/hyperbilirubinuria and tubular injury, independent of AKI. In our study, the bilirubin induces death by necrosis, while the BAs were not associated with this mechanism, suggesting that the bilirubin can be a death-causing agent of RTECs.

This occurs especially at a high level and in a long time of cell exposition. The cell death markers are observed independently of AKI development. The cell death of RTECs by necrosis is a factor that contributes to AKI development in liver diseases, however, only the RTECs death is not sufficient to the AKI development, being necessary other factors to promote the kidney function (Poloni *et al*., 2019).

Interestingly, using transmission electron microscopy (MET) Poloni *et al*. (2019) observed RTECs (free and within casts) containing intracytoplasmic strong electron-dense structures, but it was not possible to determine the chemical composition that underlies the observed crystals. Shimizu *et al*. (2013) show that during the progression of acute hepatic failure (AHF) and hyperbilirubinemia in liver graft rejection, AHF-associated AKI gradually developed. Degeneration and apoptotic cells were apparent in RTECs with bile pigment accumulation and mitochondrial degeneration. In acute kidney disease (AKD) several ROS pathways are involved: in ischemia or induced nephrotoxicity, the mitochondrial dysfunction is the major source of ROS production (Su *et al*., 2019).

Conclusion

This study contributes to better understand the action of bilirubin and BAs on kidney cells in situations of HRS or acute kidney disease. Depending on the BA structure, it can be more or less toxic to the renal cell, as well as for bilirubin, depending on the concentration of the compound in the cells and the exposure time. The compounds studied do not cause significant production of OS to cause damage to cells. Cell death by necrosis is an important factor that contributes to kidney damage and is compatible with the findings observed in urine sediment of

hyperbilirubinemia/hyperbilirubinuria patients, independent of AKI development in liver diseases, especially in chronic exposition to this compound.

Funding

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgments

The authors thank Jeferson Henn and Matheus Bernardes, for the technical assistance, and Drª Isarita Martins Sakakibara, for the gentle donation of BAs.

Author contribution

Liane N. Rotta and Dinara J. Moura: Conceptualization, Methodology, Supervision; Writing-Reviewing and Editing. **Caroline R. Silveira**: Data curation, Writing-Original draft preparation. **José Antonio T. Poloni**: Conceptualization, Visualization, Writing-Reviewing. **Tiago F. Oliveira**: Validation, Investigation. **Marcelo A. B. Martins:** Validation, Investigation and **Kelli C. Reiter:** Investigation.

References

Amaral, J.D., Viana, R.J.S., Ramalho, R.M., Steer, C.J., Rodrigues, C.M.P., 2009. Bile acids: Regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. J. Lipid. Res. 50, 1721–1734. https://doi.org/ 10.1194/jlr.R900011-JLR200

Boon, A., Bulmer, A.C., Coombes, J.S., Fassett, R.G., 2014. Circulating bilirubin and defense against kidney disease and cardiovascular mortality: mechanisms contributing to protection in clinical investigations. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 307, 123–136. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00039.2014.

Borenfreund E., Puerner J.A., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicol. Lett. 24, 119-124. https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3.

Cao, X., Nie, X., Xiong, S., Cao, L., Wu, Z., Moore, P.K., Bian, J.S., 2018. Renal protective effect of polysulfide in cisplatin-induced nephrotoxicity. Redox. Biol. 15, 513-521. https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.012.

Dasari, S., Tchounwou, P.B., 2014. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. Eur. J. Pharmacol. 740, 364-378. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025.

Delzenne, N.M., Calderon, P.B., Taper, H.S., Roberfroid, M.B., 1992. Comparative hepatotoxicity of cholic acid, deoxycholic acid and lithocholic acid in the rat: in vivo and in vitro studies. Toxicol. 61, 291–304. https://doi.org/10.1016/0378-4274(92)90156-E.

Di Ciaula, A., Wang, D.Q.H., Molina-Molina, E., Baccetto, R.L., Calamita, G., Palmieri, V.O., Portincasa, P., 2017. Bile Acids and Cancer: Direct and Environmental-Dependent Effects. Ann. Hepatol. 16, 87-105. https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.5501.

Fickert, P., Krones, E., Pollheimer, M.J., Thueringer, A., Moustafa, T., Silbert, D., et. al., 2013. Bile acids trigger cholemic nephropathy in common bile-duct-ligated mice. Hepatology. 58, 2056–2069. https://doi.org/10.1002/hep.26599.

Fogazzi, G.B., 2010. The Urinary Sediment. Elsevier, third ed. Oxford, England. https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfq186.

Fuji, M., Inoguchi, T., Sasaki, S., Maeda, Y., Zheng, J., Kobayashi, K., Takayanagi, R., 2010. Bilirubin and biliverdin protect rodents against diabetic nephropathy by downregulating NAD(P)H oxidase. Kidney Int. 78, 905-919. https://doi.org/10.1038/ki.2010.265.

Huang, S., Huang, P., Wu, T., Chen, J., Lin, S., 2012. Association of serum bilirubin with contrast-induced nephropathy and future cardiovascular events in patients undergoing coronary intervention. PloS One. 7, 1-18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042594.

Itoh, K., Tong, K.I., Yamamoto, M., 2004. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. Free Radic. Biol. Med. 36, 1208-1213. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.075.

Kaler, B., Karram, T., Morgan, W.A., Bach, P.H., Yousef, I.M., Bomzon, A., 2004. Are bile acids involved in the renal dysfunction of obstructive jaundice? An experimental study in bile duct ligated rats. Ren. Fail. 26, 507–516. https://doi.org/10.1081/JDI-200031753.

Keshavan, P., Deem, T.L., Schwamberger, S.J., Babcock, G.F., Cook-Mills, J.M., Zucker, S.D., 2005. Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leukocyte migration. J. Immunol. 174, 3709–3718. https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.6.3709.

Kusaczuk, M., 2019. Tauroursodeoxycholate-Bile Acid with Chaperoning Activity: Molecular and Cellular Effects and Therapeutic Perspectives. Cells. 8, 1471. https://doi.org/10.3390/cells8121471.

Leclerc, M., Lanot, A., Béchade, C., Naoures, C.L., Comoz, F., Lobbedez, T., 2016. Néphropathie à cristaux biliaires/néphropathie cholémique. Nephrol. Ther. 12, 460-462. https://doi.org/10.1016/j.nephro.2016.03.002.

Leist, M., Nicotera, P., 1998. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. Exp. Cell. Res. 239, 183–201. https://doi.org/10.1006/excr.1997.4026.

Li, M., Li, X., Liu, Y., Liu, X., Song, Y., Zhao, J, et. al., 2018. Relationship between serum bilirubin levels s and the progression of renal function in patients with chronic kidney disease and hyperuricemia. Clin. Chim. Acta. 486, 156-161. https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.07.045.

Markan, S., Kohli, H.S., Sud, K., Ahuja, M., Ahluwalia, T.S., Sakhuja, V., Khullar, M., 2008. Oxidative stress in primary glomerular diseases: a comparative study. Mol. Cel. Biochem. 311, 105-110. https://doi.org/10.1007/s11010-008-9701-0.

Martindale, J.L., Holbrook, N.J., 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J. Cell. Physiol. 192, 1–15. https://doi.org/10.1002/jcp.10119.

Mazza, F., Goodman, A., Lombardo, G., Vanella, A., Abraham, N.G., 2003. Heme oxygenase-1 gene expression attenuates angiotensin II-mediated DNA damage in endothelial cells. Exp. Biol. Med. 228, 576-583. https://doi.org/10.1002/jcp.10119.

Miller, R.P., Tadagavadi, R.K., Ramesh, G., Reeves, W.B., 2010. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. Toxins. 2, 2490-2518. https://doi.org/10.3390/toxins2112490.

Oh, S.W., Lee, E.S., Kim, S., Na, K.Y., Chae, D.W., Kim, S., Chin, H.J., 2013. Bilirubin attenuates the renal tubular injury by inhibition of oxidative stress and apoptosis. BMC Nephrol. 14, 105-130. https://doi.org/10.1186/1471-2369-14-105.

Perez, M.J., Briz, O., 2009. Bile-acid-induced cell injury and protection. World J. Gastroenterol. 15, 1677-1689. https://doi.org/10.3748/wjg.15.1677.

Poloni, J.A.T., Perazella, M.A., Keitel, E., Marroni, C.A., Leite, S.B., Rotta, L.N., 2019. Utility of a urine sediment score in hyperbilirubinemia/hyperbilirubinuria. Clin. Nephrol. 92, 141-150. https://doi.org/10.5414/CN109673.

Lv. Q.; Yao, Y.; Wang, W.; Xiong, W.; Wen-hui, L., 2016. Biliverdin protects against cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 36(1):48-52. https://doi.org/10.1007/s11596-016-1540-8.

Qaisiya, M., Mardešić, P., Pastore, B., Tiribelli, C., Bellarosa, C., 2017. The activation of autophagy protects neurons and astrocytes against bilirubin-induced cytotoxicity. Neurosci. Lett. 661, 96-103. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.056.

Rafat, C., Burbach, M., Brochériou, I., Zafrani, L., Callard, P., Rondeau, E., Hertig, A., 2013. Bilirubin-associated acute tubular necrosis in a kidney transplant recipient. Am. J. Kidney Dis. 61, 782-785. https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2012.11.046.

Ramesh, G., Reeves, W.B., 2003. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. Am. J. Physiol. Ren. Physiol. 285, 610-618. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00101.2003.

Rawat, V., Bortolussi, G., Silvia, Gazzin, S., Tiribelli, C., Muro, A.F., 2018. Bilirubin-Induced Oxidative Stress Leads to DNA Damage in the Cerebellum of Hyperbilirubinemic Neonatal Mice and Activates DNA Double-Strand Break Repair Pathways in Human Cells. Oxid. Med. Cell. Longev. 2018, 1-11. https://doi.org/10.1155/2018/1801243.

Rodrigues, C.M.P., Solá, S., Brites, D., 2002. Bilirubin induces apoptosis via the mitochondrial pathway in developing rat brain neurons. Hepatology. 35, 1186–1195. https://doi.org/10.1053/jhep.2002.32967.

Romano, T.G., Junior, J.M.V., 2015. Do Biliary Salts Have Role on Acute Kidney Injury Development? J. Clin. Med. Res. 7, 667-671. http://doi.org/10.14740/jocmr2261w.

Seubert, J.M., Darmon, A.J., El-Kadi, A.O.S., D'Souza, S.J.A., Bend, J.R., 2002. Apoptosis in murine hepatoma Hepa 1c1c7 wild-type, C12, and C4 cells mediated by bilirubin. Mol. Pharmacol. 62, 257–264. https://doi.org/10.1124/mol.62.2.257.

Shellman, Z., Aldhahrani, A., Verdon, B., Mather, M., Paleri, V., Wilson, J., Pearson, J., Ward, C., Powell, J., 2017. Bile Acids: a potencial role in the pathogenesis of pharyngeal malignancy. Clin. Otolaryngol. 42, 969-973. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4327-4

Shimizu, A., Ishii, E., Masuda, Y., Sato, A., Piao, H., Kunugi, S., et. al., 2013. Renal inflammatory changes in acute hepatic failure-associated acute kidney injury. Am. J. Nephrol. 37, 378-388. https://doi.org/10.1159/000348567.

Silva, R.F., Rodrigues, C.M., Brites, D., 2001. Bilirubin-induced apoptosis in cultured rat neural cells is aggravated by chenodeoxycholic acid but prevented by

ursodeoxycholic acids. J. Hepatol. 34, 402–408. https://doi.org/10.1016/S0168-8278(01)00015-0.

Slack, A., Yeoman, A., Wendon, J., 2010. Renal dysfunction in chronic liver disease. Critical Care. 14, 214-242. https://doi.org/10.1186/cc8855.

Smith, C., Marks, A.D., Lieberman, M.A., 2013. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. Biochem. Mol. Biol. Educ, second ed. Philadelphia, Pennsylvania. https://doi.org/10.1002/bmb.2006.494034052660.

Solá, S., Amaral, J.D., Aranha, M.M., Steer, C.J., Rodrigues, C.M.P., 2006. Modulation of hepatocyte apoptosis: cross-talk between bile acids and nuclear steroid receptors. Curr. Med. Chem. 13, 3039–3051. https://doi.org/10.2174/092986706778521823.

Song, J., Chang, A., 2009. Jaundice-associated acute kidney injury. NDT Plus. 2, 82–83. https://doi.org/10.1093/ndtplus/sfn149.

Su, H., Wan, C., Song, A., Qiu, Y., Xiong, W., Zhang, C., 2019. Oxidative Stress and Renal Fibrosis: Mechanisms and Therapies. Adv. Exp. Med. Biol. 1165, 585-604. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8871-2_29.

Tsai, M., Tarng, D., 2019. Beyond a Measure of Liver Function - Bilirubin Acts as a Potential Cardiovascular Protector in Chronic Kidney Disease Patients. Int. J. Mol. Sci. 20, 117. https://doi.org/10.3390/ijms20010117.

Van Slambrouck, C.M., Salem, F., Meehan, S.M., Chang, S., 2019. Bile cast nephropathy is a common pathologic finding for kidney injury associated with severe liver dysfunction. Kidney Int. 84, 192-197. https://doi.org/10.1038/ki.2013.78.

Velez, J.C.Q., Therapondos, G., Juncos, L.A., 2020. Reappraising the Spectrum of AKI and Hepatorenal Syndrome in Patients with Cirrhosis. Nat. Rev. Nephrol. 16, 137-155. https://doi.org/10.1038/s41581-019-0218-4.

Weil, D., Levesque, E., McPhail, M., Cavallazzi, R., Theocharidou, E., Cholongitas, E, et. al., 2017. Prognosis of cirrhotic patients admitted to intensive care unit: a meta-analysis. Ann. Intensive Care. 7, 2-14. Digite a equação aqui.https://doi.org/10.1186/s13613-017-0249-6.

Wu, Y., Wu, C., Cheng, C., Tsai, S., 2020. Severe hyperbilirubinemia is associated with higher risk of contrast-related acute kidney injury following contrast-enhanced computed tomography. PLoS One. 15, 1-17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231264.

Zucco, F., Angelis, I.D., Testai, E., Stammati, A., 2004. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. Toxicol. in Vitro. 18, 153–163. https://doi.org/10.1016/S0887-2333(03)00147-4.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo fornece dados referentes ao mecanismo associado à lesão das células renais, especialmente na síndrome hepatorrenal. Pelo estudo apresentado, os ácidos biliares primários apresentaram efeito protetor nas concentrações medianas (40 e 60 µM), tanto nos tratamentos agudos (24h), quanto nos crônicos (72h). Já os AB secundários e a bilirrubina, apresentaram ser mais tóxicos às células, nas concentrações mais altas (80 e 100 µM) em tratamentos agudos e crônicos. Nesse estudo os compostos estudados não apresentaram significativa produção de estresse oxidativo e, importantemente, observamos que a necrose foi o tipo de morte celular associada à ação da bilirrubina sobre as células renais (tratamento de 24h). Esses achados se relacionam aos dados laboratoriais observados na análise do sedimento urinário, em que partículas intrinsecamente renais (células epiteliais tubulares renais e cilindros) são observadas em pacientes com hiperbilirrubinúria/hiperbilirrubinemia, independentemente do desenvolvimento de doença renal aguda. Essas informações auxiliam na compreensão do mecanismo associado ao comprometimento renal de pacientes hepáticos (presentes na SHR) em que endotoxinas como a bilirrubina e os ABs apresentam concentrações elevadas.

Os resultados originados deste estudo auxiliam de forma importante no entendimento de aspectos associados aos danos renais na SHR, uma condição patológica complexa e pouco entendida até o momento. Esses resultados se relacionaram positivamente aos achados laboratoriais e clínicos dos pacientes com SHR. Informações adicionais, associadas a estudos clínicos e em outros modelos experimentais, bem como o estudo de outros efeitos (p. ex. genotóxicos) e estudos mecanicísticos podem colaborar na compreensão de como essas endotoxinas, bilirrubina e ácidos biliares, podem contribuir no desenvolvimento da patologia, além dos fatores tubulotóxicos hemodinâmicos já estabelecidos.

ANEXO 1: Registro ComPesq UFCSPA

111/2019

ANEXO 2: Regras da Revista

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements with the exceptions noted below. All manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

• Divide the article into clearly defined sections.

• Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering– this is an essential peer review requirement.

• Figures and tables embedded in text.

• Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

• E-mail address

• Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

• Include keywords

• All figures (include relevant captions)

• All tables (including titles, description, footnotes)

• Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

• Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

• Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

• All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

• Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
• A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare.
• Journal policies detailed in this guide have been reviewed
• Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

Article structure

Preparation of Manuscript.

Manuscripts text should have double line spacing and references should be single-spaced. Pages should be numbered consecutively and organized as follows:

• The title Page (p. 1) should contain the article title, authors' names and complete affiliations, footnotes to the title, and the address for manuscript correspondence (including e-mail address and telephone and fax numbers). The article title should be comprehensive and descriptive: proprietary names must not be used in titles, but may be identified in footnotes.

• Page 2 should contain an abstract. The abstract should be limited to 250 words but must contain a concise summary of what was done, the results obtained, and valid conclusions which are drawn therefrom. It must mention the compounds or families of compounds studied, their actions, and the species of animals. It must contain important words which are used as index terms, but not proprietary names. Keywords should be listed immediately after the abstract.

Format. The following text sections should be used.

• Introduction. State why the investigation was carried out, note any relevant published work, and delineate the objective of the investigation.
• Methods. New methods or significant improvements of methods or changes in old methods must be described. Methods for which adequate reference can be cited are not to be described. In the Methods section, authors should draw attention to any particular chemical or biological hazards that may be involved in carrying out the experiments described. Any relevant safety precautions should be described: if an accepted code of practice has been followed, a reference to the relevant standards

should be given. Details regarding animal housing conditions and all animal procedures should be given.

• Results. Duplication between the text of this section and material presented in tables and figures should be avoided. Tabular presentation of masses of negative data must be avoided and replaced with a statement in the text whenever possible. The statement must include (a) what was done, (b) how it was done, (c) how the data were analyzed, (d) a measure of variability, and (e) the significance of the result.

• Discussion. This section must relate to the significance of the work to existing knowledge in the field and indicate the importance of the contribution of this study. Needless detailed recapitulation of the results must be avoided. Unsupported hypotheses and speculation should be omitted.

• References. Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; 2. Two authors: both authors' names and the year of publication;

3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

• Subdivision - unnumbered sections. Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

• Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

• Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly.

For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced.

Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

• Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

• Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.

• Number the illustrations according to their sequence in the text.

• Use a logical naming convention for your artwork files.

• Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

• For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.

• Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

• EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

• TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

• TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

• TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.

• Supply files that are too low in resolution.

• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that

capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).