UNIVERSIDADE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito do resveratrol na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção de Título de
Mestre em Toxicologia, área de
Concentração: Toxicologia.

Aluna(a): Cátia Lira do Amaral
Orientador(a): Prof^a Dr^a Maria de Lourdes
Pires Bianchi

Ribeirão Preto
2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Amaral, Cátia Lira do.

Efeito do resveratrol na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos. Ribeirão Preto, 2006.

102 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora: Bianchi, Maria de Lourdes Pires.

1. Cisplatina. 2. Resveratrol. 3. Nefrotoxicidade. 4. Antioxidantes.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cátia Lira do Amaral

Efeito do resveratrol na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para
obtenção de título de Mestre em Toxicologia
Área de concentração: Toxicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

“Dedico esta dissertação às pessoas que acreditaram em mim sem exítares, me incentivaram e apoiaram em todos os momentos árduos desta jornada... MEUS PAIS – Aparecido Lira do Amaral e Jovelina Maria Vendrame do Amaral”

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio através da concessão de Bolsa de Mestrado.

À Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi pela orientação, paciência e luta durante todo esse período de trabalho.

À Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra pela ajuda no desenvolvimento de parte do projeto em seu laboratório de pesquisa, através das análises imuno-histoquímicas.

Ao Prof. Dr. Roberto Silva Costa pela supervisão nas análises histopatológicas.

À Dra. Heloísa D. C. Francescato pela paciência e atenção e que, sem ela esse trabalho não seria possível.

Às técnicas Érica e Adriana, do laboratório de Patologia renal da FMRP/USP, pelo preparo dos cortes renais.

À técnica Adriana, do laboratório de Estomatologia e Patologia da FORP/USP, pelo ensino e ajuda na realização de perfusão renal nos animais.

À Telma, Cleonice, Ana Paula, do laboratório de Fisiologia Renal da FMRP/USP, que me ensinaram a metodologia da reação imunohistoquímica.

Ao Danilo e Carla, alunos de iniciação científica, que participaram no início dos experimentos, e que hoje, apesar de não estarem mais em nosso grupo de pesquisa, continuam me apoiando como amigos.

À técnica Joana D'arc C. Darin por ter me ensinado a manusear os animais e a realizar as dosagens bioquímicas. Também não posso esquecer da ajuda e amizade que ela sempre me forneceu para enfrentar os desafios e as dificuldades que surgiram ao longo do desenvolvimento de nosso trabalho.

Aos amigos Estela, Adriana, Camila, Alessandro, Graciela, Miriam, Eliane, Marília, Clarissa, Ana Helena, Danieli, Simone, Sueli, Cássia, Nayara, Andressa e tantos outros que no momento os nomes não são lembrados, mas que fizeram e continuam a fazer parte da minha vida.

À Ana Leonor, amiga que conheci no início deste curso e que sempre esteve disponível para me ajudar através de sua sincera amizade.

Ao meu irmão Cláudio e minha cunhada Gislaine, que me ajudaram e apoiaram desde o início para que eu pudesse finalizar esta obra.

E por último quero agradecer aos meus pais, Aparecido e Jovelina, que sempre me incentivaram a estudar e que, sem eles provavelmente eu não teria concluído este curso.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

AMARAL, C. L. **Efeito do resveratrol na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos.** 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

O resveratrol (Res), um polifenol presente no vinho tinto, é conhecido por possuir potente atividade antioxidante. O efeito do resveratrol (Res) frente à nefrotoxicidade do antineoplásico cisplatina (cDDP) foi avaliado em ratos neste estudo. Os animais foram tratados com Res (25 mg/Kg de peso copóreo, ip., dose única) 30 minutos antes da administração de cisplatina (5 mg/Kg de peso copóreo, ip., dose única) e foram sacrificados depois de 2 ou 5 dias do tratamento. Após 5 dias, o aumento da creatinina sérica, volume urinário e proteinúria, que são marcadores de alterações renais, apresentaram significativa redução ($p < 0,05$) com a administração de resveratrol. Os ratos tratados com cisplatina apresentaram necrose tubular aguda e maior marcação imuno-histoquímica para células ED1 e linfócitos T no córtex e medula externa renal. Estas alterações foram menos intensas nos animais tratados com resveratrol. Após 2 dias, a administração de cisplatina aos ratos induziu aumento na concentração de malonaldeído (MDA) e reduziu nos níveis de glutathione (GSH) no tecido renal, que não foram amenizadas pelo resveratrol. Os resultados desse estudo indicam que o tratamento com resveratrol atenuou as alterações renais funcionais, histológicas e imuno-histoquímicas induzidas pela cisplatina. O efeito protetor provavelmente está relacionado à diminuição de infiltrado de células inflamatórias no tecido renal.

Palavras-chave: Cisplatina. Resveratrol. Nefrotoxicidade.

ABSTRACT

AMARAL, C. L. **Effect of resveratrol on nephrotoxicity induced by cisplatin in rats.** 2006. 102 f. Dissertation (Master degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Resveratrol (Res), a polyphenolic present in red wine, is known to possess potent antioxidant properties. The ability of resveratrol to protect against the nephrotoxicity of the antineoplastic agent cisplatin (cDDP) was evaluated in rats. The animals were treated with Res (25 mg/Kg body weight, ip., single dose) 30 minutes before administration of cDDP (5 mg/Kg body weight, ip., single dose) and then, sacrificed in 2 or 5 days followed by the treatment. After 5 days with resveratrol administration, the enhanced serum creatinine levels, urinary volume and urinary protein, which are indicative of renal injury, shown a significant reduction ($p < 0.05$). The cisplatin-treated rats presented a tubular cell necrosis and increase immunostaining for ED1 and T-lymphocytes in the renal cortex and outer medulla. Those alterations were less intense in animals treated with resveratrol. After 2 days, administration of cisplatin to rats induced a higher malondialdehyde levels (MDA), and reduction in glutathione (GSH) concentrations in kidney tissue that were not prevented by resveratrol. In this study, the results indicate that resveratrol treatment attenuated the functional, histological and immunohistochemical renal alterations induced by cisplatin. The protect effect is related to the decrease of cells infiltrated at kidney tissue.

Key words: Cisplatin. Resveratrol. Nephrotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da cisplatina	18
Figura 2. Fórmula estrutural do <i>trans</i> -resveratrol.....	21
Figura 3. Esquema do protocolo experimental.....	29
Figura 4. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre níveis de creatinina sérica (mg/dL) (A), proteinúria (mg/24h) (B) e fluxo urinário (mL/24h) (C) em ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP)..	42
Figura 5. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) no peso relativo dos rins (% de peso dos rins com relação ao peso corpóreo) dos ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP).....	46
Figura 6. Corte histológico de rim de rato, mostrando a região medular externa (ME) dos animais sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP)..	49
Figura 7. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre número de células positivas para anticorpo anti-linfócitos, por área de 93500 μm^2 , no córtex (A) e medula externa (B) renal em ratos sacrificados 5 dias após receberam administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP)..	51

- Figura 8.** Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre o número de células positivas para ED1 por área de 93500 μm^2 no córtex (A) e medula externa (B) renal em ratos sacrificados 5 dias após receberam administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP)..... 53
- Figura 9.** Imuno-marcação para linfócitos-T e células ED1 positivas (macrófagos/monócitos) na região medular externa renal de ratos dos grupos Controle, cDDP e R25 + cDDP, sacrificados 5 dias após o tratamento com cisplatina em ratos sacrificados 5 dias após receberam o pré-tratamento com resveratrol (25mg/Kg, ip. dose única) seguida de injeção de NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP)..... 54
- Figura 10.** Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre níveis renais de glutathione (nmol/mg proteína) em ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP).. 56
- Figura 11.** Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre níveis renais de MDA (nmol/g tecido) em ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP)..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) no peso inicial e final (g) dos ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP).	44
Tabela 2 – Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) no escore histológico das lesões tubulares nos rins dos ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP).	48
Tabela 3 – Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) nos níveis urinários de malonaldeído (MDA) (nmol/24 h) dos ratos sacrificados 2 ou 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP).	60
Tabela 4 – Creatinina sérica (mg/dL) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.....	88
Tabela 5 – Proteína urinária (mg/24h) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.....	89
Tabela 6 – Fluxo urinário (mL/24h) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.....	90
Tabela 7 – Peso inicial (g) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.	91
Tabela 8 – Peso final (g) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.	92

Tabela 9 – Relação peso dos rins/peso corpóreo (%) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.....	93
Tabela 10 – Escore histológico do rim direito dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.	94
Tabela 11 – Número de células positivas para linfócitos no córtex renal dos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal.....	95
Tabela 12 – Número de células positivas para linfócitos na região medular externa renal dos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal.....	96
Tabela 13 – Número de células positivas para ED-1 no córtex renal dos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal.....	97
Tabela 14 – Número de células positivas para ED -1 na região medular externa renal dos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal.....	98
Tabela 15 – Níveis renais de glutathione tecidual (nmol/mg proteína) dos animais sacrificados após 2 dias do tratamento intraperitoneal.....	99
Tabela 16 – Níveis renais de malondialdeído (MDA) (nmol/g tecido) dos animais sacrificados após 2 dias do tratamento intraperitoneal.	100
Tabela 17 – Níveis urinários de malonaldeído (MDA) (nmol/24h) dos animais sacrificados após 2 dias do tratamento intraperitoneal.....	101
Tabela 18 – Níveis urinários malonaldeído (MDA) (nmol/24h) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento intraperitoneal.....	102

LISTA DE SIGLAS

SRATB – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

GSH – Glutationa

MDA – Malonaldeído

cDDP – Cisplatina

DMSO – Dimetilsulfóxido

NaCl 0,9% – Solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v)

ip. – intraperitoneal

rpm – rotações por minuto

MHC – Complexo Monoidratado de Cisplatina

PBS – Salina Tampão Fosfato

BSA – Albumina de Soro Bovino

DAB – 3,3'-diamino-benzidine

DTNB – 5,5'-ditiobis-(ácido-2-nitrobenzóico)

KBrO₃ – Brometo de Potássio

PMN – Polimorfonuclear

SOD – Superóxido Dismutase

CAT – Catalase

GPx – Glutationa Peroxidase

CCl₄ – Tetracloreto de Carbono

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TGF – *Transforming Growth Factor*

M – Molar

SH – Grupos Sulfidríla

NTA – Necrose Tubular Aguda

ME – Medual externa

AMPc – Adenina Monofosfato cíclico

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

μM – micromolar

α – alfa

β – beta

μm² – micrometro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1	Material.....	26
3.1.1	Animais	26
3.1.2	Urina	26
3.1.3	Soro	26
3.1.4	Rins	27
3.1.5	Fármaco e reagentes.....	27
3.2	Métodos	28
3.2.1	Protocolo experimental	28
3.2.2	Avaliação da função renal	30
3.2.3	Análise morfológica renal	32
3.2.4	Análise imuno-histoquímica do rim	33
3.2.5	Glutathione tecidual.....	36
3.2.6	Malonaldeído.....	37
3.3	Análise estatística.....	39
4	RESULTADOS	40
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	APÊNDICE	87

1. INTRODUÇÃO

A cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatina (II), cDDP), representada estruturalmente na figura 1, pode ser considerada o fármaco antineoplásico que contém o complexo de platina mais utilizado (LOKICH, 2001). Suas propriedades antitumorais são efetivas no tratamento de tumores sólidos como testicular, ovariano, câncer de cabeça e pescoço e de pulmão (GIACCONE, 2000).

Figura 1. Fórmula estrutural da cisplatina

O efeito terapêutico da cisplatina é atribuído à interferência que ela provoca no metabolismo e replicação celular quando se liga às bases de guanina do DNA (SHERMAN; LIPPARD, 1987; BELLON; COLEEMAN; LIPPARD, 1991). Enquanto a cisplatina encontra-se na circulação sanguínea, onde a concentração de cloreto é alta (aproximadamente 100 mM), a platina se mantém com seus átomos de cloro ligados. Após sua entrada na célula, que tem concentração de cloreto baixa (aproximadamente 4 mM), os cloretos ligados à cisplatina são substituídos, possivelmente, por moléculas de água, gerando uma molécula carregada positivamente que pode reagir com sítios nucleofílicos ou macromoléculas intracelulares para formar adutos de proteína, RNA e DNA (KARTALOU; ESSIGMANN, 2001). Embora o mecanismo molecular que leva a formação desses adutos ainda não esteja bem compreendido, sabe-se que o tratamento com cisplatina resulta em inibição da replicação do DNA (SALLES et al., 1983), da

transcrição do RNA (MELLO; LIPPARD; ESSIGMANN, 1995) e parada do ciclo celular na fase G2 (SORENSEN; EASTMAN, 1988).

A cisplatina exibe como efeito adverso náusea, vômitos, diarreia, perda da audição, depressão da medula óssea (McKEAGE, 1995; VON HOFF et al., 1979), além de indução de toxicidade renal em humanos e em ratos (CHOIE; LONGNECKER; CAMPO, 1981; SAFIRSTEIN; MILLER; GUTTENPLAN, 1984).

Esta nefrotoxicidade está possivelmente relacionada com sua recaptação preferencial pelas células do túbulo proximal levando a concentrações intracelulares cinco vezes mais altas (SAFIRSTEIN et al., 1981). Estudos em microscopia eletrônica demonstram que o efeito nefrotóxico nos túbulos proximais inclui: perda da borda em escova, vacuolização celular, condensação da cromatina nuclear e focos de necrose tubular (DOBYAN et al., 1980). Em ratos, o tratamento com cisplatina induziu a diminuição da atividade de enzimas da membrana de borda em escova renal, como a fosfatase alcalina, a gama-glutamil transferase, a leucina aminopeptidase e a maltase, tanto no córtex quanto na medula renal (FATIMA; YUSUFI; MAHMOOD, 2004).

No sangue de pacientes tratados com cisplatina está presente o complexo monoidratado de cisplatina (MHC) (ANDERSSON et al., 1996) que é formado pela biotransformação hidrolítica da cisplatina. Tem-se sugerido que os produtos de hidrólise são mais nefrotóxicos que a cisplatina intacta (DALEY-YATES; McBRIEN, 1984). Usando misturas de hidrólise de cisplatina, Zheng, Fink e Howell (1997) mostraram maior acúmulo de platina associado a maior atividade citotóxica e nefrotóxica quando comparada a cisplatina apenas. Este fato foi confirmado por Ekborn et al. (2003) que demonstraram que a administração de MHC em porcos

resulta em ototoxicidade e nefrotoxicidade numa dose equivalente de cisplatina que não é tóxica.

A geração de radicais livres de oxigênio nas células tubulares é proposta como um processo patológico importante associado à lesão provocada pela cisplatina (HANNEMANN; BAUMANN, 1990). A indução de peroxidação lipídica no rim, *in vivo* e *in vitro*, contribui para a nefrotoxicidade atribuída à cisplatina (SUGIHARA et al., 1987; ZHONG et al., 1990).

O uso de antioxidantes diminui a formação de radicais livres contribuindo para atenuar o dano que a cisplatina gera no tecido renal (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000). Alimentos como frutas, vegetais e vinhos possuem vários compostos polifenólicos (RICE-EVANS, MILLER; PAGANGA, 1996). O resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) que está representado na Figura 2 é um polifenol natural que foi identificado no vinho tinto como um composto com atividade biológica em 1992 (SIEMANN; CREASY, 1992). Ele está presente em uma grande variedade de plantas onde sua síntese é induzida por condições de estresse como uma infecção ou trauma, irradiação ultravioleta ou exposição ao ozônio (ASENSI et al., 2002). O resveratrol é encontrado em pelo menos 72 espécies de plantas, sendo que muitas fazem parte da dieta humana, como amoras, amendoim e uvas (DONG, 2003) e existe em duas formas isoméricas, sendo que ambas estão presentes no vinho tinto (Zhu et al., 2000). Com exceção do amendoim, as uvas e os produtos delas derivados são provavelmente a maior fonte alimentar de resveratrol (IGNATOWICZ; BAER-DUBOWSKA, 2001). O resveratrol é formado na casca da uva e não na parte fresca (MENG et al., 2004). A casca da uva fresca possui de 50-100 µg de resveratrol por grama e o suco comercial contém aproximadamente 4 mg/L de *trans*-resveratrol (DONG, 2003). No vinho tinto, a concentração varia de 1,5 - 3,0 mg/L

(DONG, 2003) podendo chegar a 6,5 mg/L (BERTELLI et al., 1996). O vinho brasileiro pode ser uma importante fonte de resveratrol, visto que o total de compostos de resveratrol ingeridos através dele foi estimado para a população brasileira como 5,3 mg/dia por pessoa, com base em um consumo regular de 160 mL/dia (VITRAC et al., 2005).

Figura 2. Fórmula estrutural do *trans*-resveratrol

Lopez-Velez; Martinez-Martinez; Del Valle-Ribes (2003) relatam que os polifenóis do vinho tinto são antioxidantes *in vitro* através de inibição de absorção dos radicais catiônicos. O *trans*-resveratrol, quando exposto simultaneamente a indutores como tetracloreto de carbono (CCl₄) ou fator de necrose tumoral (TNF), mostrou ser seqüestrador de radicais livres (STOJANOVIĆ; SPRINDZ; BREDE, 2001), inibidor da geração de espécies reativas de oxigênio e da indução de peroxidação lipídica (MANNA; MUKHOPADHYAY; AGGARWAL, 2000).

O resveratrol apresenta adequada biodisponibilidade quando administrado por via oral e é encontrado predominantemente em tecidos como o fígado e o rim (VITRAC et al., 2003). Como no caso de outros polifenóis, a biodisponibilidade sistêmica do resveratrol é baixa (SALE et al., 2004). Os metabólitos resultantes da oxidação, redução e hidrólise não foram detectados após administração intraperitoneal e gavagem em ratos (YU et al., 2002). Estudos *in vivo* demonstram que o resveratrol é absorvido por via oral rapidamente (MENG et al., 2004). Yu et al. (2002) sugerem que o resveratrol é distribuído a vários tecidos e é lentamente

eliminado, porque quando se administram doses maiores do polifenol, há um prolongamento no tempo de detecção de glicoronídeo e sulfato de resveratrol. Ao avaliar a função renal de ratos expostos a gentamicina, que assim como a cisplatina é nefrotóxica, Morales et al. (2002) relatam que houve melhora da função renal em resposta a administração de *trans*-resveratrol. Em ratos que foram induzidos a glomerulonefrite, o resveratrol também reduziu os sintomas da síndrome nefrótica, caracterizada pela proteinúria, hipoalbuminemia e hiperlipidemia. (NIHEI; MIURA; YAGASAKI, 2001). Fato semelhante foi observado na nefrotoxicidade induzida pela ciclosporina (CHANDER; TIRKEY; CHOPRA, 2005).

As alterações induzidas pela cisplatina na função renal podem ser detectadas pelos sinais de lesão como mudança no volume urinário, modificação nos níveis de glutathione, aumento dos produtos de peroxidação lipídica e decréscimo no clearance de creatinina (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000). Sabendo-se que o acúmulo intracelular de radicais de oxigênio reativos é um dos mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade da cisplatina, o resveratrol, com seu potencial antioxidante, poderia levar a uma redução deste efeito colateral. Além do mais, não são relatados estudos demonstrando um possível efeito protetor do resveratrol sobre a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina.

2. OBJETIVO

Avaliar o possível efeito protetor da dose única de resveratrol nos mecanismos de nefrotoxicidade aguda induzidos pela administração de cisplatina em ratos através de:

- Avaliação da função renal e de alterações na estrutura morfológica;
- Verificação da participação de espécies reativas de oxigênio através de determinação da glutathione tecidual e peroxidação lipídica;
- Determinação de células inflamatórias mononucleares no tecido renal por reações imuno-histoquímicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Animais

Os estudos foram realizados com ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com peso de 180 – 200 g (6 a 8 semanas de idade).

3.1.2 Urina

A urina dos animais foi coletada em provetas graduadas. A determinação de volume urinário e proteína urinária foram realizadas nos animais sacrificados 5 dias após administração intraperitoneal. Para dosagem de MDA urinário, utilizou-se a urina dos animais sacrificados após 2 e 5 dias.

3.1.3 Soro

O soro foi obtido dos animais sacrificados 5 dias após a administração intraperitoneal e utilizado na dosagem de creatinina sérica.

3.1.4 Rins

Os rins foram extraídos de todos os animais no dia do sacrifício. O rim direito dos animais sacrificados 5 dias após administração intraperitoneal foi utilizado para os estudos histopatológicos. A avaliação imuno-histoquímica foi realizada no rim direito dos animais sacrificados após 5 dias. Nos animais sacrificados após 2 dias, dosou-se MDA e GSH no rim esquerdo, assim como proteína tecidual para expressar os resultados de GSH.

3.1.5 Fármaco e reagentes

O fármaco cisplatina (Platinil®) foi gentilmente doado pela empresa Quiral Química do Brasil (Juiz de Fora, MG, Brasil). O *trans*-resveratrol (número CAS 501-36-0) foi adquirido da empresa Sigma (St. Louis, MO, EUA). O resveratrol foi preparado imediatamente antes do uso a 20 mg/mL em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e salina na proporção de 1:1. Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Métodos

3.2.1 Protocolo experimental

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), sob o protocolo nº 04.1.297.53.0. Os experimentos foram realizados no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em sala com temperatura e luz controlada (24° C; ciclo de luz alternados de luz/escuro de 12 horas), recebendo ração comercial e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Todos os ensaios foram conduzidos após um período de 48 horas para adaptação e os animais mantidos em caixas de contenção com no máximo 4 animais, até 24 h antes do sacrifício, quando eles foram transferidos para gaiolas metabólicas individuais com a finalidade de coletar a urina de 24 horas. Para obtenção da dose correta a ser administrada relativa ao peso corpóreo, cada animal foi pesado antes das administrações, e o volume das soluções corrigido adequadamente.

Os animais foram divididos em seis grupos, sendo três controles e três experimentais, que receberam o seguinte tratamento:

- **Grupo Controle** – NaCl 0,9% (ip.) 30 minutos antes de NaCl 0,9% (ip.). (n = 12).
- **Grupo Veículo (V)** – DMSO:NaCl 0,9% (1:1, v/v; ip.) 30 minutos antes de NaCl 0,9% (ip.). (n = 5).
- **Grupo Resveratrol (R)** – Resveratrol (25 mg/Kg peso corpóreo, ip.) 30 minutos antes de NaCl 0,9% (ip.). (n = 5).

- **Grupo Cisplatina (cDDP)**– NaCl 0,9% (ip.) 30 minutos antes da cisplatina (5 mg/Kg peso corpóreo, ip.). (n = 12).
- **Grupo Veículo + Cisplatina (V + cDDP)** - DMSO:NaCl 0,9% (1:1, v/v; ip.) 30 minutos antes da cisplatina (5mg/Kg peso corpóreo, ip.). (n = 4).
- **Grupo Resveratrol + Cisplatina (R25 + cDDP)** – Resveratrol (25 mg/Kg peso corpóreo, ip.) 30 minutos antes da cisplatina (5mg/Kg peso corpóreo, ip.). (n = 12).

Os animais foram sacrificados 2 ou 5 dias após o tratamento intraperitoneal. Os grupos Veículo, Resveratrol e Veículo + Cisplatina foram utilizados apenas na avaliação da função renal e morfológica nos animais sacrificados após 5 dias do tratamento. Na Figura 3 está esquematizada o protocolo experimental utilizado que é descrito a seguir:

Figura 3. Esquema do protocolo experimental

Sacrifício 2 dias após tratamento ip

Após serem pesados, os animais foram anestesiados com hidratado de cloral 10% em salina na dose de 0,4 mL/100g de peso corpóreo intraperitoneal. Os rins foram perfundidos com solução de NaCl 0,9% gelada para eliminar o sangue do tecido renal. Em seguida, os rins foram extraídos, pesados e congelados a - 70 °C até o momento das dosagens. A urina foi centrifugada por 10 minutos a 6000 rpm, e o sobrenadante congelado imediatamente a - 20 °C.

Sacrifício 5 dias após tratamento ip

Os animais foram pesados e sacrificados por decapitação para coleta de sangue. Após abertura da cavidade abdominal, o pedículo vascular renal de ambos os rins foi dissecado e os rins foram retirados e pesados. O rim direito foi seccionado em corte de 3 a 5 mm de espessura, sendo fixado em Bouin por 4 horas e em seguida transferidos para solução de álcool 70% e incluídos em parafina. O sangue e a urina de 24 horas foram centrifugados por 10 minutos a 6000 rpm, sendo o soro e o sobrenadante da urina separados e utilizados nas dosagens apropriadas.

3.2.2 Avaliação da função renal

A função renal foi avaliada nos animais sacrificados 5 dias após a administração intraperitoneal através da creatinina sérica, proteinúria, fluxo urinário e peso corpóreo.

3.2.2.1 Creatinina

A creatinina sérica foi determinada no soro dos animais, pelo método colorimétrico do picrato em meio alcalino com posterior acidificação, usando o Kit comercial para análise (Labtest[®], Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados foram expressos em mg de creatinina/dL de soro.

3.2.2.2 Proteinúria

A urina coletada nas últimas 24 horas antes do sacrifício foi utilizada para dosagem de proteína urinária segundo o método descrito por Bradford (1976). Os resultados foram expressos em mg de proteína/24 h.

3.2.2.3 Fluxo urinário

O fluxo urinário dos animais foi calculado através do volume de urina coletado em provetas graduadas durante 24 horas antes do sacrifício, sendo os valores expressos em mililitro de urina por 24 horas (mL/24h).

3.2.2.4 Peso corpóreo

O peso corpóreo dos animais foi avaliado no início e ao final do experimento em balança semi-analítica. O peso corpóreo dos animais foi expresso em gramas (g).

3.2.3 Análise morfológica renal

A avaliação histológica foi realizada nos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal, no Laboratório de Patologia Renal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob orientação do Prof. Dr. Roberto Silva Costa.

Seções histológicas de 3 µm de espessura foram coradas por hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson e examinadas em microscópio de luz comum (Zeiss, modelo Axioskop equipado com microfotografia) em objetivas de 10x e 40x.

A análise semi-quantitativa das alterações nos diferentes compartimentos renais foi efetuada considerando os compartimentos glomerular, tubular, intersticial e vascular do parênquima renal do córtex e da medula externa e interna. No compartimento glomerular foram considerados a hiper celularidade endo e extracapilar, deposição de matriz mesangial, infiltração celular, espessamento e irregularidade das alças capilares. No compartimento tubular foram analisadas necroses do epitélio de revestimento, presença de cilindros intratubulares, dilatação do lúmen tubular e presença de mitoses. No compartimento intersticial foram

considerados espessamentos fibro-elástico e/ou hiperplástico da camada íntima, hipertrofia da camada média e deposição de substância hialina.

3.2.3.1 Quantificação da análise morfológica

As análises foram realizadas em estudo cego. As lesões foram graduadas por escores, que refletiam o grau de lesão apresentado. Sendo assim:

Escore 0 = ausência de lesão; Escore 1 = lesão comprometendo até 25 % da área examinada; Escore 2 = lesão comprometendo de 25 – 50% da área examinada; Escore 3 = lesão comprometendo de 50 – 75% da área examinada; Escore 4 = lesão acima de 75% (FRANCECATO et al., 2004).

3.2.3.2 Relação peso rins/peso corpóreo

Para melhor avaliar o peso dos rins, calculou-se a proporção entre o peso dos rins em relação ao peso corpóreo, sendo os resultados expressos em porcentagem (%).

3.2.4 Análise imuno-histoquímica do rim

A análise imuno-histoquímica do rim foi realizada nos animais sacrificados 5 dias após a administração intraperitoneal no Laboratório de Fisiologia Renal do

Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, sob orientação da Prof^a Dr^a Terezila Machado Coimbra.

Secções histológicas de 5 µm foram colocadas em três banhos consecutivos de xilol, para eliminação da parafina. Em seguida, colocaram-se os cortes em três banhos de álcool em concentrações decrescentes para a conseqüente hidratação do corte. As lâminas foram transferidas para solução de tampão citrato (0,01 M), pH 6,0 e aquecidas até a fervura no microondas, sendo transferidas para água destilada por 5 minutos após o resfriamento. As lâminas foram incubadas por 10 minutos em solução azida sódica 10%/água oxigenada 30%/água destilada (1:1:98), para bloqueio da peroxidase endógena.

Os anticorpos primários monoclonais utilizados foram: anti-linfócito-T de ratos (Harlan Sera-lab, Leicestershire, Inglaterra), e anti-ED1 de ratos para detecção de um antígeno citoplasmático presente em macrófagos e monócitos (Serotec Inc., Raleigh, NC), e receberam o seguinte tratamento:

Linfócitos:

As lâminas foram lavadas em solução de PBS + Tween (1mL de tween para 1000 mL de PBS) por 5 minutos. Em cuba úmida realizou-se a adsorção com soro de cabra (dilução 1:10 em PBS + BSA 1% (solução de albumina soro bovina (BSA) 1% em PBS) e 10 µL de saponina 50 mg/mL) por 30 minutos. Os cortes foram então, incubados com anticorpo primário anti-linfócitos-T (dilução 1:200) até o dia seguinte. Em seguida lavaram-se os cortes em solução de PBS + Tween, seguido de incubação em solução de complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), diluído em solução de PBS + BSA 1%, por 30 minutos. Realizou-se nova lavagem em solução de PBS + Tween seguida de coloração com

solução de DAB (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Utilizou-se a contra coloração com hematoxilina estando assim as lâminas prontas para serem analisadas.

Macrófagos/Monócitos:

As lâminas foram lavadas em banho de PBS, pH 7,4 (NaCl 150 μ M e tampão fosfato 10 μ M) por 5 minutos, sendo que o excesso de PBS foi escorrido e os cortes incubados com o anticorpo primário anti-ED1 (macrófagos/monócitos) (diluição 1:1000) por 60 minutos. Após incubação e lavagem em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado monoclonal produzido em camundongo (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) (diluição 1:200), utilizando para diluição solução de PBS + BSA 1% por 30 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem com solução de PBS, os cortes foram incubados em solução do complexo Avidina-Biotina-Peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), diluído em solução de PBS + BSA 1%, por 30 minutos. Realizou-se nova lavagem dos cortes em solução de PBS e em seguida a coloração em solução de DAB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e cloreto de níquel, e por fim foi realizada a contra coloração com Metilgreen.

3.2.4.1 Quantificação da reação de imuno-histoquímica

As lâminas foram examinadas em microscópio de luz comum (Zeiss, modelo Axioskop equipado com microfotografia). Contaram-se as células marcadas em 25 campos dos compartimentos tubulares e intersticiais na região cortical e na região medular externa. O número total obtido na contagem de cada compartimento foi

dividido pelo número de campos contados (área do campo: 93500 μm^2), e determinou-se o número de células por campo analisado.

3.2.5 Glutationa tecidual

Utilizou-se o rim esquerdo dos animais sacrificados após 2 dias do tratamento intraperitoneal. Após o rim ser picotado, pesou-se aproximadamente 0,5 g de tecido. Adicionou-se 5 mL de tampão Tris (20 mM, pH 7,4) e 50 μL de BHT 500 mM para obtenção de um homogenato a 10%.

A análise da glutatona tecidual foi realizada utilizando o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Uma alíquota de 500 μL do homogenato 10% foi diluída em 1400 μL de água destilada. A desproteinização da solução foi feita pela adição de 100 μL de solução de ácido tricloroacético 50% (p/v). Após centrifugação, o sobrenadante foi usado para o teste. Colocou-se 500 μL do sobrenadante e 100 μL de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) em um tubo contendo 2 mL de tampão tris (400 mmol de TRIS; 20 mmol de EDTA, pH 8,9). O DTNB é reduzido pelos grupos sulfidril (SH), (formando 1 mol de 2-nitro-5'-ácido mercaptobenzóico por mol de SH), resultando numa coloração amarela intensa, podendo ser usada, então, para medir grupos SH. Para a realização da curva padrão utilizou-se L-cisteína e a medida da absorbância foi realizada em 412 nm, em espectrofotômetro (Spectronic Instruments, modelo Genesys 2). Os resultados foram corrigidos pela concentração de proteína no homogenato e expressos em nmol/mg de proteína tecidual.

3.2.5.1 Proteína tecidual

A proteína tecidual foi determinada para poder expressar os resultados da glutathiona tecidual. Assim, 50 μL do homogenato a 10% foi diluído 1:25 em água destilada. Em seguida, 200 μL desta solução diluída foram colocados em um tubo contendo 800 μL de água destilada e realizou-se a determinação segundo o método descrito por Hartree (1972). Para realização da curva padrão, utilizou-se albumina bovina 1 mg/mL.

3.2.6 Malonaldeído

3.2.6.1 MDA urinário

O MDA urinário foi dosado nos animais sacrificados após 2 e 5 dias do tratamento intraperitoneal. A urina de 24 horas foi utilizada para dosagem segundo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990), com algumas adaptações. Incubou-se 400 μL de amostra como 800 μL de ácido tricloroacético 10% por 10 minutos em banho de gelo. Centrifugou-se por 10 minutos a 6000 rpm. Em 500 μL do sobrenadante acionou-se 500 μL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (p/v). Na reação com o TBA, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA com a produção de um pigmento rosa que tem o máximo de absorção em 532 – 535 nm. Após incubação por 10 minutos em banho de água fervente, os tubos foram esfriados 5 minutos em água gelada e realizou-se a leitura em espectrofotômetro

(Spectronic Instruments, modelo Genesys 2) em 535 nm. Para realização da curva padrão utilizou-se solução de 1,1',3,3'-tetrametoxipropano 51,6 nmol/mL. Os resultados foram corrigidos pelo fluxo urinário e expressos em nmol/24h.

3.2.6.2 MDA tecidual

As dosagens de MDA foram realizadas no tecido renal dos animais sacrificados 2 dias após o tratamento intraperitoneal de acordo com as recomendações do fabricante do kit de dosagem de peroxidação lipídica (CalbioChem Co., Darmstadt, Alemanha). O princípio baseia-se que uma molécula de MDA condensa-se como duas moléculas de N-metil-2-fenilindole resultando em um cromóforo estável com absorbância máxima em 586 nm. Centrifugou-se 1,8 mL do homogenato 10 % a 8000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para o teste. Os resultados foram expressos em μM de MDA total. Toda vidraria foi enxaguada com ácido nítrico 30 %, e durante o período de dosagem, o recipiente em que a amostra estava sempre foi mantido em banho de gelo até a leitura em espectrofotômetro (Spectronic Instruments, modelo Genesys 2).

3.3 Análise estatística

No estudo, os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Os dados foram submetidos ao teste de Análise Múltiplas das Variâncias (ANOVA) com pós teste de Newman Keuls. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Os grupos tratados apenas com o veículo ou resveratrol não apresentaram alteração em nenhum parâmetro de função renal ou alterações morfológicas quando comparados com o grupo controle ($p > 0,05$). A administração do veículo antes da injeção de cisplatina também não resultou em diferença significativa em relação ao grupo tratado apenas com cisplatina. Estes dados podem ser observados nas Tabelas 4 a 10 do apêndice.

Ao analisar a Figura 4, é possível observar decréscimo na função renal do grupo Cisplatina, pois este apresentou a creatinina sérica, proteinúria e fluxo urinário significativamente maior que o grupo Controle (305%, 232% e 421% respectivamente). Já o grupo Resveratrol + cisplatina não apresentou aumento nestes parâmetros em relação ao grupo Controle, e quando comparado ao grupo Cisplatina, verifica-se significativa redução nos parâmetros avaliados ($p < 0,05$). Portanto, é possível observar que o tratamento com resveratrol em dose única preservou a função renal de ratos tratados com cisplatina.

Figura 4. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre níveis de creatinina sérica (mg/dL) (**A**), proteinúria (mg/24h) (**B**) e fluxo urinário (mL/24h) (**C**) em ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP). Cada valor corresponde a média $\pm$ erro padrão ($n = 6$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a $p < 0,05$ em relação ao Controle; ^b $p < 0,05$ em relação ao cDDP.

O peso corpóreo dos animais está apresentado na Tabela 1. Em relação ao peso inicial dos animais, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos experimentais. Já em relação ao peso após os cinco dias do tratamento com cisplatina, observa-se uma significativa perda de peso corpóreo no grupo que recebeu apenas cisplatina ($p < 0,05$). Em oposto, o grupo Resveratrol + Cisplatina apresentou ganho de peso corpóreo comparado ao grupo Cisplatina ($p < 0,05$). Esses resultados sugerem que o tratamento com resveratrol em dose única pode atenuar a perda de peso corpóreo provocada pela cisplatina. O grupo que recebeu a associação com resveratrol e cisplatina apresentou menor ganho de peso corpóreo que o grupo controle, porém essa diferença não foi significativa. Na Tabela 8 estão apresentados os resultados individuais dos animais.

Tabela 1 – Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) no peso inicial e final (g) dos ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP).*

	Controle	cDDP	R25+cDDP
Peso Inicial	202,8	197,5	205,6
	±2,88	±5,48	±3,53
Peso Final	237,1	184,7 ^a	220,9 ^b
	±8,37	±9,00	±8,72

* Cada valor corresponde a média ± erro padrão (n = 6). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao cDDP.

Quando a nefrotoxicidade é avaliada pelo peso dos rins em relação ao peso corpóreo do animal, visualiza-se na Figura 5 que o grupo Cisplatina apresentou aumento nesta relação quando comparado ao grupo Controle ($p < 0,05$), e que a dose única de resveratrol pode prevenir este aumento, uma vez que o grupo Resveratrol + cisplatina apresentou resultados menores do que grupo Cisplatina ($p < 0,05$) e foi semelhante ao grupo controle.

Figura 5. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) no peso relativo dos rins (% de peso dos rins com relação ao peso corpóreo) dos ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP). Cada valor corresponde a média $\pm$ erro padrão (n = 6). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao cDDP.

Na Tabela 2 estão apresentados os escores histológicos dos animais sacrificados 5 dias após indução de nefrotoxicidade. Nos compartimentos vascular, intersticial e glomerular não foram observadas lesões em nenhum dos grupos. Com relação ao compartimento tubular foi observado que a região medular externa foi o local onde as lesões se apresentaram em maior grau. As alterações patológicas mais evidentes 5 dias após a injeção de cisplatina consistiram de perda da borda em escova das células tubulares dos túbulos proximais, presença de cilindros intratubulares, dilatação do lúmen e necrose com descamação do epitélio e mitose. Observou-se lesão em intensidade máxima (escore 4) nos animais do grupo cisplatina, com diferença significativa em comparação ao grupo Controle ($p < 0,05$). As lesões foram menos intensas nos animais que receberam resveratrol previamente a cisplatina, sendo que o grupo Resveratrol + cisplatina apresentou diferenças significativas em comparação aos grupos Controle e Cisplatina ($p < 0,05$). Foi verificada a presença de mitose em quantidades moderadas, porém não quantificadas nos animais tratados com cisplatina. Na Figura 6 estão apresentados os cortes histológicos dos grupos experimentais e os valores individuais estão na Tabela 10.

Tabela 2 –. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) no escore histológico das lesões tubulares nos rins dos ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP).*

<i>Grupo</i>	<i>Escore</i>
Controle	0 ($\pm 0,0$)
cDDP	4 ($\pm 0,0$) ^a
R25+cDDP	0,83 ($\pm 0,46$) ^{a, b}

* Cada valor corresponde a média $\pm$ erro padrão (n = 6). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao cDDP.

Figura 6. Corte histológico de rim de rato, mostrando a região medular externa (ME) dos animais sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP). Em (A) grupo Controle com aspecto microscópico nos padrões da normalidade (escore 0). Em (B), rato injetado com cisplatina (grupo cDDP), mostrando região com necrose tubular aguda (NTA) (escore 4). Em (C), rato pré-tratado com resveratrol 25 mg/Kg (grupo R25+cDDP) e injetado com cisplatina, mostrando região com NTA (escore 2). A NTA é caracterizada pela intensa dilatação tubular (*), descamação de células no lúmen tubular (seta) e desnudamento da membrana basal tubular (cabeça da seta) (Tricromo de Masson, X440).

Na Figura 7 está representado o número de células positivas para linfócitos T no córtex e na medula externa (ME) renal dos animais sacrificados 5 dias após indução de nefrotoxicidade pela cisplatina. As Tabelas 11 e 12 (ver apêndice) apresentam os valores individuais. Observa-se que a cisplatina induziu a um aumento significativo na contagem de células marcadas por campo nos dois compartimentos avaliados quando comparado ao grupo Controle. Foi observado também que os valores obtidos no grupo Resveratrol + Cisplatina revelaram-se intermediários, isto é, maiores do que o grupo Controle, mas estatisticamente menores que os observados no grupo Cisplatina ($p < 0,05$). Assim, os resultados sugerem que a dose única de resveratrol pode prevenir a infiltração de linfócitos T tanto no córtex quanto na medula externa, evidenciando-se, portanto uma proteção devido à ação do resveratrol.

Figura 7. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre número de células positivas para anticorpo anti-linfócitos por área de 93500 μm^2 , no córtex (**A**) e medula externa (**B**) renal em ratos sacrificados 5 dias após receberam administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP). Cada valor corresponde a média $\pm$ erro padrão (n = 6). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao cDDP.

Os números de macrófagos/monócitos, estimados através do número de células positivas para ED1, na região cortical e medular externa dos rins dos animais sacrificados cinco dias após o tratamento intraperitoneal estão na Figura 8 e os dados individuais de cada animal podem ser visualizado nas Tabelas 13 e 14 (ver Apêndice). Observa-se que ambas as regiões dos rins analisadas apresentam infiltrado de células positivas para macrófagos/monócitos no grupo cDDP, com diferença estatística em relação ao controle. A associação com resveratrol manteve o número de células positivas próximo aos valores do grupo controle. O resveratrol pode prevenir o aumento de células ED1 positivas no rim, visto que o grupo resveratrol + cisplatina apresentou menor marcação que o grupo que recebeu apenas a cisplatina ($p < 0,05$).

Figura 8. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre o número de células positivas para ED1 por área de 93500 μm^2 no córtex (**A**) e medula externa (**B**) renal em ratos sacrificados 5 dias após receberam administração intraperitoneal de NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP). Cada valor corresponde a média $\pm$ erro padrão (n = 6). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao cDDP.

Figura 9. Imuno-marcação para linfócitos-T (A, B e C) e células ED1 positivas (macrófagos/monócitos) (D, E e F) na região medular externa renal de ratos dos grupos Controle (A e D), cDDP (B e E) e R25 + cDDP (C e F), sacrificados 5 dias após receberam o pré-tratamento com resveratrol (25mg/Kg, ip. dose única) seguida de injeção de NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP). O número de células positivas para ED1 e linfócitos-T é maior nos animais do grupo cDDP, quando comparada com o grupo Controle e R25 + cDDP (X440).

Os valores de glutathiona reduzida (GSH) dos animais sacrificados 2 dias após a injeção intraperitoneal estão representados na Figura 10. Os níveis renais de glutathiona (GSH) apresentaram-se significativamente menor nos grupos cisplatina e resveratrol + cisplatina, comparado ao Controle. Por este resultado é possível considerar que o tratamento com cisplatina resulta em depleção dos níveis renais de glutathiona e que o tratamento com resveratrol em dose única não atenuou a depleção de GSH gerada pela cisplatina, uma vez que o grupo Resveratrol + Cisplatina apresentou resultados menores que o grupo Controle ($p < 0,05$) e semelhantes aos do grupo Cisplatina. Os resultados individuais podem se visualizados na Tabela 15.

Figura 10. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre níveis renais de glutathione (nmol/mg proteína) em ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP). Cada valor corresponde a média $\pm$ erro padrão ($n = 6$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a $p < 0,05$ em relação ao Controle.

A peroxidação lipídica foi estimada através da determinação de malonaldeído (MDA) tecidual e urinário. Na Figura 11 estão apresentados os valores renais de MDA dos animais sacrificados após dois dias do tratamento intraperitoneal. Os animais do grupo cisplatina apresentaram nível renal de MDA aproximadamente 130% maior que o grupo controle, apesar deste aumento não ser significativo em relação ao grupo Controle e ao grupo resveratrol + cisplatina ($p > 0,05$). Os resultados de todos os grupos estão apresentados na Tabela 16 do apêndice. O resveratrol mostrou tendência em atenuar o aumento de peroxidação lipídica. Entretanto, não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais.

Cada valor corresponde a média $\pm$ erro padrão ($n = 6$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls.

Figura 11. Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) sobre níveis renais de MDA (nmol/g tecido) em ratos sacrificados 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP). Cada valor corresponde a média $\pm$ erro padrão ($n = 6$). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a $p < 0,05$ em relação ao Controle; ^b $p < 0,05$ em relação ao cDDP.

Os valores do MDA urinário dos animais sacrificados 2 ou 5 dias após tratamento intraperitoneal estão representados na Tabela 3. É possível observar que o tratamento com cisplatina resultou em um discreto aumento nos níveis de MDA urinário após 2 dias do tratamento. Ao final do período experimental, observa-se um aumento do MDA urinário. Porém este aumento não foi significativo em relação ao grupo Controle ($p > 0,05$). O resveratrol mostrou tendência em amenizar a peroxidação lipídica urinária. Entretanto, nenhuma diferença estatística entre os grupos foi observada neste parâmetro. Os valores animais individuais estão nas Tabelas 17 e 18 (ver apêndice).

Tabela 3 – Efeito do pré-tratamento com resveratrol (25 mg/Kg, ip., dose única) nos níveis urinários de malonaldeído (MDA) (nmol/24 h) dos ratos sacrificados 2 ou 5 dias após receberam o tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (Controle) ou cisplatina 5mg/Kg (cDDP e R25+cDDP).*

	2 dias		5 dias	
	[nmol/24h]	% do Controle	[nmol/24h]	% do Controle
<i>Controle</i>	92,06 ± 24,36	100%	97,2 ± 87,55	100%
<i>cDDP</i>	106,8 ± 34,60	115,33%	322,3 ± 229,00	331,58%
<i>R25 + cDDP</i>	104,1 ± 52,27	112,42%	158,4 ± 138,70	162,96%

* Cada valor corresponde a média ± erro padrão (n = 6). ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao cDDP.

5. DISCUSSÃO

Apesar do seu potencial nefrotóxico, a cisplatina ainda é considerada um fármaco importante para o tratamento de diversos tipos de tumores malignos, incluindo câncer de ovário, testículo, bexiga, cabeça e pescoço, pulmão, colo de útero e endométrio (BAEK et al., 2003). A proteção frente à nefrotoxicidade da cisplatina é objetivo de diversos pesquisadores (MORA et al., 2003; IGUCHI et al., 2004; BADARY et al., 2005) para torná-la mais segura no uso terapêutico. Nesta linha de investigação, o presente estudo avaliou a ação do resveratrol frente à nefrotoxicidade da cisplatina.

Há relatos que o resveratrol protegeu o tecido renal na lesão resultante da administração de fármacos nefrotóxicos como a ciclosporina (CHANDER; TIRKEY; CHOPRA, 2005) e gentamicina (MORALES et al., 2002), da isquemia renal de reperfusão (GIOVANNINI et al., 2001), da nefrite resultante da ação de anticorpos anti-membrana basal glomerular (NIHEI; MIURA; YAGASAKI, 2001) e do dano oxidativo do DNA renal induzido pelo carcinógeno brometo de potássio (KBrO_3) (CADENAS; BARJA, 1999). Entretanto não é descrita o efeito protetor do resveratrol na nefrotoxicidade da cisplatina.

O resveratrol é extensivamente metabolizado pelo organismo e, em ratos, mais de 90% do resveratrol total circulante no plasma está na forma conjugada (MENG et al., 2004; YU et al., 2002). Assim, a via intraperitoneal foi escolhida neste estudo porque se suspeitou que o resveratrol quando administrado pela via oral apresentaria baixa biodisponibilidade, visto que é uma substância com rápida metabolização hepática (ASENSI et al., 2002, MARIER et al., 2002), e que sofre extensa conjugação desde a absorção no intestino (KUHNLE et al., 2000). Sabe-se que as β -glicoronidases são expressas em vários órgãos e fluídos como macrófagos, células sanguíneas, fígado, rins, pulmão e soro (SPERKER et al., 1997). Por esta

ração, a β -glicoronidase, que cliva a ligação glicosídica entre o fármaco e o resíduo de ácido glicurônico, pode liberar o fármaco original do conjugado de glicoronídeo que poderá atuar local ou sistemicamente. Estas observações, juntamente com o fato que os metabólitos do resveratrol são menos citotóxicos *in vitro* que o resveratrol original, aumenta a possibilidade que a glicoronidação do resveratrol possa ter uma função na detoxificação, distribuição e prolongamento do efeito do resveratrol (WANG et al., 2004).

Na literatura não há um consenso quanto a dose de resveratrol administrada em ratos. Em modelos de toxicidade renal, Morales et al. (2002) utilizaram a dose de 120 mg/Kg/dia e Nihei; Miura; Yagasaki (2001) usaram a dose de 50 mg/Kg/dia, assim como Chander; Tirkey; Chopra (2005) relatam a administração de 5 e 10 mg/Kg/dia. A escolha da dose foi baseada no estudo de Nihei; Miura; Yagasaki (2001). Entretanto, a via utilizada por eles era oral. Como nesta via há perdas durante o processo de absorção, optou-se por usar a metade da dose, ou seja, 25 mg/Kg de peso corpóreo. O resveratrol é pouco solúvel em água segundo informações do fabricante. Alguns autores citam que o dissolveram em solução de etanol a 10% (TURNER et al., 1999; ASENSI et al., 2002; MENG et al., 2004). Mas, ao testar essa possibilidade, o resveratrol permaneceu suspenso. Para evitar a administração de suspensão por via parenteral, preparou-se o resveratrol em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e salina (NaCl 0,9%) em partes iguais para ser administrado pela via intraperitoneal.

Uma dose única de resveratrol (25 mg/Kg) foi administrada 30 minutos antes do tratamento com cisplatina devido ao fato da eliminação do resveratrol ser muito rápida, inclusive dos compostos que sofreram conjugação (Marier et al., 2002). Na literatura a nefrotoxicidade induzida por agentes nefrotóxicos, como a ciclosporina e

a gentamicina, o resveratrol foi administrado em doses múltiplas paralelamente à administração dos fármacos (CHANDER; TIRKEY; CHOPRA, 2005; MORALES et al., 2002). Em nosso estudo optou-se por utilizar a dose única do polifenol, pois a indução de nefrotoxicidade em animais é realizada através da administração de cisplatina (5 mg/Kg) em dose única (IGUCH et al., 2004; MORA et al., 2003).

Inicialmente avaliou-se a função renal como critério de triagem, através dos parâmetros bioquímicos de creatinina sérica, proteinúria, fluxo urinário e ganho de peso corpóreo. Neste estudo, observou-se que a administração de cisplatina na dose única de 5 mg/Kg de peso corpóreo resultou em diminuição da função renal que é visualizado nas alterações de creatinina sérica do grupo cDDP quando este é comparado com o grupo controle. Este resultado era esperado, uma vez que a dose administrada no experimento é descrita como suficientemente elevada para que a reação adversa de nefrotoxicidade seja manifestada em ratos (FRANCESCATO et al., 2004; ECELBARGER et al., 2001). Observou-se uma diminuição significativa da creatinina sérica dos animais que receberam a associação com resveratrol em relação ao grupo que recebeu apenas a cisplatina, sugerindo que o tratamento com resveratrol antes da administração de cisplatina foi capaz de prevenir o aumento dos níveis de creatinina. Este fato está de acordo com Giovannini et al. (2001) que relata que o pré-tratamento com resveratrol melhorou a função renal de ratos que tiveram o rim exposto à isquemia de reperfusão, observado pela redução nos níveis de creatinina sérica. Sabe-se que a creatinina sérica é um parâmetro convencional para determinar a função renal (VERPLANKE et al., 1994). O pico máximo de elevação ocorre após quatro (FATIMA; YUSUFI; MAHMOOD, 2004) ou cinco dias (AL-MAJED et al., 2003) do tratamento com cisplatina, fato este que justifica a escolha do quinto dia para avaliação da função renal.

Boulikas; Vougiouka (2003) citam que o uso clínico da cisplatina continua a ser limitado pelas graves reações adversas que inclui a toxicidade renal por dano no túbulo renal. Esta toxicidade tubular aguda é caracterizada por necrose das células tubulares (FRANCESCATO et al., 2004) e apoptose (BAEK et al., 2003) sendo os efeitos tóxicos principalmente na porção S₃ do túbulo proximal (DOBYAN et al., 1980). A lesão tubular pode contribuir para a diminuição da taxa de filtração glomerular, através de efeitos hemodinâmicos como vasoconstrição arteriolar (aferente) e diminuição do fluxo sanguíneo renal e glomerular (DAUGAARD, 1990). Assim, a diminuição da função renal quando estimada pela filtração glomerular pode ser normal ou não, dependendo da espécie estudada.

Observou-se que os animais que receberam apenas a administração de cisplatina apresentaram um aumento no fluxo urinário, e que o tratamento com resveratrol atenuou este aumento. A poliúria é uma característica proeminente da toxicidade renal induzida pela cisplatina, e ocorre em duas fases distintas. A primeira fase ocorre quando a taxa de filtração glomerular ainda é normal (um a dois dias após a dose única) e pode ser revertida pela administração de vasopressina, sugerindo uma liberação prejudicada deste hormônio pela glândula pituitária (CLIFTON et al., 1982). A segunda fase ocorre quando a taxa de filtração glomerular está baixa (cinco a seis dias após dose única) e é resistente à administração de vasopressina. Esta resistência renal ao hormônio está associada com uma diminuição da hipertonicidade da medula renal (GORDON; PETERSON; ANDERSON, 1982; SAFIRSTEIN et al., 1981) e geração reduzida de AMPc, com distúrbios na sinalização mediada via proteína G nos ductos coletores (WONG et al., 1993). Segundo Kishore et al. (2000), a regulação da permeabilidade a água nos ductos coletores pela vasopressina é mediada pelo seu efeito na translocação e/ou

na expressão dos canais de água de aquaporina – 2 que envolve o sistema de segundo mensageiros de AMPc. Assim, os autores sugerem que a causa da poliúria induzida pela cisplatina pode estar associada com uma diminuição significativa na expressão de canais de água do ducto coletor (aquaporinas 2 e 3) e da medula interna (aquaporina 1). Pelo delineamento experimental do presente estudo, não é possível inferir qual o mecanismo de atuação do resveratrol na poliúria da cisplatina. Mas a proteção que o resveratrol produz na poliúria está de acordo com Sharma et al. (2005) que demonstraram que ratos com nefropatia diabética apresentaram melhora da função renal quando se administrou resveratrol aos animais.

Um fato neste estudo que relaciona a cisplatina aos túbulos renais é a proteinúria apresentada pelos animais. O filtrado glomerular possui proteínas de baixo peso molecular que normalmente são reabsorvidas, quase que totalmente, pelo túbulo proximal (GUYTON; HALL, 2002). Assim, a proteinúria pode ser relacionada a uma deficiência de reabsorção tubular, caso predomine proteínas de baixo peso molecular, ou resultante de um aumento na permeabilidade glomerular quando as proteínas são de alto peso molecular (ROY FIRST, 1996). Portanto, no experimento realizado não foi possível afirmar que a proteinúria tem origem tubular, e não glomerular, uma vez que a diferença entre elas é em relação ao peso molecular das proteínas e o método utilizado determina apenas a proteína total. A nefrotoxicidade da cisplatina é caracterizada por proteinúria discreta (CAMARGO et al., 2001) e no presente estudo é possível observar esse aumento discreto, de duas a três vezes em relação ao grupo controle, e que este aumento foi prevenido com a associação de resveratrol ao tratamento. Ao observar que ratos com glomerulonefrite induzida por anticorpos anti-membrana basal têm proteinúria elevada, de 200 a 300 vezes maior que o controle (NIHEI; MIURA; YAGASAKI,

2001), pode-se suspeitar que a proteína urinária seja de origem tubular, e não glomerular.

Os resultados apresentados neste estudo sugerem uma atenuação na função tubular quando se administra resveratrol em dose única aos animais tratados com cisplatina, visto que houve menor fluxo urinário e menor excreção de proteínas que o grupo tratado apenas com cisplatina ($p < 0,05$). Assim, os dados experimentais estão de acordo com Daugaard (1990), que relata que a nefrotoxicidade aguda da cisplatina é caracterizada pela lesão tubular através do aumento do volume urinário com discreta proteinúria tubular e enzimas urinárias que também podem ser observadas. Em relação ao resveratrol, há relatos que ele amenizou a excreção urinária de proteína em outros modelos de insuficiência renal, como em ratos nefríticos (NIHEI; MIURA; YAGASAKI, 2001) e nefrectomizados (CHANDER; CHOPRA, 2005). Neste, os autores suspeitam que o efeito protetor do resveratrol seja através da via do óxido nítrico.

O menor peso corpóreo que o grupo tratado apenas com cisplatina apresentou quando comparado ao grupo controle está de acordo com relatos de Francescato et al. (2001) que associam a redução no peso corpóreo dos animais a uma toxicidade gastrointestinal da cisplatina, observada pela diarreia e/ ou menor ingestão de comida. Em nosso estudo, observou-se que a administração de dose única de resveratrol mostrou-se eficiente para amenizar a perda de peso causada pela cisplatina. Ammer et al. (1993) observaram em ratos, uma relação entre a diminuição da atividade renal e a perda de peso após a administração de cisplatina, e consideraram que a perda de peso pode ser um índice simples para avaliar o estado citotóxico dos pacientes em uso de cisplatina. Assim, pode-se observar que os resultados experimentais estão de acordo, visto que o grupo Resveratrol +

cisplatina apresentaram melhor na função renal associada a uma menor perda de peso corpóreo do que o grupo cisplatina.

Ao avaliar o peso dos rins em relação ao peso corpóreo, pretende-se observar um possível edema do órgão que pode estar relacionado a um processo inflamatório local. Em ratos tratados com cisplatina, é observado aumento na relação do peso dos rins (SAAD; NAJJAR; ALASHARI, 2004) e os resultados apresentados pelo presente estudo confirmam esse achado. Cadenas e Barja (1999) relatam que o tratamento com resveratrol preveniu o aumento do peso relativo dos rins induzido pelo carcinógeno KBrO_3 . O tratamento com resveratrol antes da cisplatina efetivamente inibiu o aumento do peso dos rins, uma vez que os valores não foram significativamente diferentes do grupo controle, sugerindo que o resveratrol pode prevenir os efeitos tóxicos da cisplatina no tecido renal. Em ratos, é descrito que o aumento do peso dos rins reflete a nefrotoxicidade do carcinógeno KBrO_3 , e é relacionada com a necrose do epitélio tubular (CADENAS; BARJA, 1999). Para a cisplatina, pode-se observar associação semelhante, pois os animais tratados apenas com cisplatina apresentaram aumento relativo no peso dos rins com alterações histológicas de grau máximo, além do aumento das células inflamatórias.

As alterações morfológicas renais resultantes da administração de cisplatina em ratos são largamente descritas na literatura (SAAD; NAJJAR; ALASHARI, 2004). O tratamento com cisplatina resultou em marcante necrose tubular proximal com presença de cistos hialinos no lúmen tubular, descamação e degeneração das células do parênquima do epitélio tubular e nefrite intersticial (ATESSAHIN et al., 2005), associada com achatamento das células do túbulo proximal, perda da borda em escova e infiltrado de células inflamatórias intersticiais (FRANCESCATO et al., 2004). Segundo Laurente et al. (1988), a necrose tubular induzida pela cisplatina

mostra-se dose dependente, visto que após avaliação histopatológica dos rins de ratos tratados com cisplatina nas doses de 2, 4 e 8 mg/Kg, a necrose tubular foi mais freqüente em ratos que receberam a dose de 8 mg/Kg, enquanto que na dose de 4 mg/Kg o dano tubular foi observado em células isoladas e na dose de 2 mg/Kg não foi observado sinal de necrose tubular. Além da concentração do fármaco, estudos *in vitro* sugerem que a citotoxicidade induzida pela cisplatina depende do tempo de exposição das células epiteliais ao fármaco (Lu et al., 2005). Há muito tempo sabe-se que as alterações renais poderiam estar relacionadas ao fato de que a excreção renal do fármaco é extremamente lenta (DeCONTI et al., 1973). Portanto, a excreção renal lenta da cisplatina iria expor o epitélio tubular dos rins a um efeito deletério prolongado, e contribuiria para ocorrência de toxicidade renal.

Aliado à necrose tubular aguda induzida pela cisplatina, observou-se infiltrado celular identificado por reação imuno-histoquímica. As células inflamatórias mononucleares (linfócitos-T e macrófagos/monócitos) estavam presentes 5 dias após o tratamento com cisplatina.

Existem vários mecanismos pelo qual a lesão renal é potenciada pelos leucócitos. Estes são ativados por mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, espécies reativas de oxigênio e eicosanóides que aumentam as moléculas de adesão no endotélio (BONVENTRE; ZUK, 2004). Os polimorfonucleares (PMNs) atraídos durante o processo de reperfusão são considerados importantes mediadores do início da lesão parenquimal na falência renal aguda isquêmica. Por outro lado, a velocidade de infiltração de leucócitos mononucleares (monócitos/macrófagos e linfócitos) pode variar dependendo do dano renal (YSEBAERT et al., 2004).

Baseado em modelos clássicos de lesão tecidual, não se suspeitava que as células T estivessem envolvidas na falência renal aguda isquêmica (FRIEDEWALD; RABB, 2004). Entretanto, o infiltrado leucocitário é um fenômeno tardio, e a manifestação ocorre após a lesão estar evidente e no momento de regeneração (YSEBAERT et al., 2004). O resveratrol atenuou o número de linfócitos T no córtex e na região medular externa renal em ratos tratados com cisplatina. Assim, o resveratrol poderia estar modulando a infiltração leucocitária no tecido renal e contribuindo para a redução da nefrotoxicidade da cisplatina.

Os macrófagos são importantes no desenvolvimento de fibrose intersticial através da produção de fatores TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor – beta1*) e TNF- α (Fator de Necrose Tumoral – *alfa*). Esses fatores contribuem para formação de fibrose posterior, pois medeiam a indução de células miofibroblástica para produzirem matriz extracelular (YAMATE et al., 2004). Em nosso estudo, observou-se um aumento significativo do infiltrado de células ED1 mais proeminente na região medular externa, e está de acordo com relatos da literatura os quais demonstram que administração de dose única de cisplatina resulta em aumento de células ED1 na junção corticomedular em ratos (FRANCESCATO et al., 2004; YAMATE et al., 2004). O pré-tratamento com resveratrol inibiu o aumento da expressão de células positivas para ED1 nos animais sacrificados cinco dias após a administração de cisplatina. Sabe-se que a interação entre macrófagos e as células renais leva à proliferação celular e expansão da matriz, o que pode resultar em formação de fibrose intersticial (EDDY et al., 2000). Se há menor infiltração de células inflamatórias, poderá haver menor produção de fatores que contribuem para instalação de fibrose posteriormente. Portanto, a associação com resveratrol pode ser benéfica visto que ele atenua a lesão renal induzida pela cisplatina, assim como

o que foi demonstrado em camundongos expostos a lesão renal de isquemia/reperfusão. Neste, os animais que apresentaram menor infiltrado de leucócitos tiveram significativamente menos fibrose e os autores sugerem que a modulação dos macrófagos poderia ser útil para melhorar os mecanismos de reparo tecidual (FRIEDEWALD; RABB, 2004).

Zhang e Lindup (1993) mostraram que a cisplatina depleta a glutathione (GSH) e aumenta peroxidação lipídica em preparados de mitocôndrias de células corticais renais de ratos. Evidências na literatura (MATSUSHIMA et al., 1998; YILDIRIM et al., 2003; SATOH et al., 2003) indicam que os radicais livres e as espécies reativas ao oxigênio estão envolvidos no estresse oxidativo devido à depleção da concentração de GSH e pelo decréscimo da atividade de enzimas antioxidantes nos rins. Estas observações apóiam a hipótese de que parte do mecanismo de nefrotoxicidade em animais tratados com cisplatina está relacionada com a depleção de antioxidantes. Um dos mais importantes sistemas antioxidantes intracelular é o ciclo de redução da glutathione. A glutathione é um dos componentes essenciais para manter a integridade celular devido a sua propriedade redutora e pela participação no metabolismo celular (ATESSAHIN et al., 2005). Entretanto, o efeito da cisplatina na concentração de GSH renal é controverso. Alguns autores mostram que o dano renal causado pela cisplatina é associado com decréscimo no GSH renal (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2001; SILVA; ANTUNES; BIANCHI, 2001) ou pode resultar em aumento dos níveis renais (FRANCESCATO et al., 2001; MORA et al., 2003). O presente estudo reforça a hipótese que a cisplatina causa depleção na concentração de GSH no tecido renal e está de acordo com os resultados de Shimeda et al. (2005) que demonstraram o decréscimo de GSH no tecido renal aliado à diminuição na atividade da superóxido dismutase (SOD), e com os resultados apresentados por Saad; Najjar; Alashari

(2004) que mostram depleção semelhante no conteúdo de GSH, porém associado com decréscimo da atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx). Na lesão renal de reperfusão isquêmica, o pré-tratamento dos animais com resveratrol restabeleceu a depleção de GSH renal e a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e SOD (CHANDER; CHOPRA, 2006). Entretanto, o resveratrol administrado em dose única não foi suficiente para atenuar esse decréscimo de GSH tecidual dois dias após indução de nefrotoxicidade, sugerindo que o polifenol possa atuar através de mecanismos que não interfiram no estado de antioxidantes intracelular quando a cisplatina é administrada.

O mecanismo pelo qual a cisplatina induz alterações renais pode envolver a interferência com processos de transporte mitocondrial e tubular (ZHANG; LINDUP, 1994), modificação covalente dos constituintes celulares (MISTRY *et al.* 1991), ou geração de radicais livres (SADZUKA *et al.* 1992). A dosagem de MDA é utilizada como um indicador de peroxidação lipídica tecidual tanto no fígado como nos rins (JURCZUC *et al.*, 2004). A maioria dos estudos mostra que a peroxidação lipídica é relacionada com a nefrotoxicidade da cisplatina (ZHANG; LINDUP, 1993). Em nosso estudo foi possível observar apenas uma tendência de elevação nos níveis de MDA tecidual nos animais tratados com cisplatina.

Sabe-se que a cisplatina afeta o tecido renal onde os radicais livres são gerados, e que eles podem interagir com os lipídeos das membranas para produzir peroxidação lipídica que afetará a estrutura e funções celulares (SUGIHARA *et al.*, 1987). Kruidering *et al.* (1997) sugerem que a toxicidade celular induzida pela cisplatina não está diretamente relacionada com a peroxidação lipídica, e que os antioxidantes podem aliviar a nefrotoxicidade através de redução das reações inflamatórias e de liberação de radicais livres em consequência da lesão celular.

Estas observações poderiam justificar o fato do aumento nos níveis de MDA tecidual não ser significativo no presente estudo, uma vez que outros mecanismos de proteção podem estar em ação. A tendência de aumento em consequência da administração de cisplatina está refletida no MDA urinário. Após dois dias, observou-se discreto aumento em relação ao grupo controle. Entretanto, após cinco dias do tratamento, observa-se aumento no MDA urinário do grupo cisplatina, quando este é comparado ao grupo controle. Esse aumento coincide com a identificação de processo inflamatório no qual há infiltração de leucócitos mononucleares no tecido renal. Rincon et al. (2004) correlacionam o aumento de células positivas para ED1 com o estresse oxidativo renal gerado pela administração do aminonucleosídeo puromicina, e sugerem que a infiltração de monócitos/macrófagos poderia contribuir para indução de apoptose nos leucócitos ou nas células renais pelas vias oxidantes. Portanto, o resveratrol poderia diminuir o estresse oxidativo nos rins através da supressão de infiltrados de leucócitos no tecido renal.

Nas condições experimentais utilizadas no presente estudo, o pré-tratamento com dose única de resveratrol foi efetivo para proteger o rim da nefrotoxicidade da cisplatina. Apesar dele ser seqüestrador de radicais livres devido à presença de grupamentos fenólicos livres (LEE et al., 2004), ele não foi efetivo para inibir a depleção de glutathiona tecidual dois dias após o tratamento com o antitumoral. Entretanto, a prevenção de infiltrado de células inflamatórias no tecido renal sugere um possível mecanismo do efeito protetor do resveratrol frente à cisplatina. Portanto, são necessários estudos adicionais para identificar as propriedades do resveratrol e esclarecer o possível mecanismo protetor deste polifenol antes de utilizá-lo como agente nefroprotetor em humanos.

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista os objetivos propostos e com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A dose única de resveratrol preservou a função renal, aumentou o ganho de peso corpóreo e atenuou as alterações histológicas renais, além de prevenir a elevação do número de células inflamatórias mononucleares no rim de ratos induzidos a nefrotoxicidade pela cisplatina.
- Entretanto o resveratrol não preveniu a depleção de glutathione e o aumento de peroxidação lipídica resultante da geração de espécies reativas de oxigênio.
- A prevenção de infiltração de células inflamatórias no tecido renal sugere um possível mecanismo do efeito protetor do resveratrol na nefrotoxicidade da cisplatina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-MAJED, A. A.; ABD-ALLAH, A. R.; AL-RIKAB, A. C.; AL-SHABANAH, O. A.; MOSTAFA, A. M. Effect of oral administration of arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 17, p. 146-156, 2003.

AMMER, U.; NATOCHIN, Y.; DAVID, C.; RUMRICH, G.; ULLRICH, K. J. Cisplatin nephrotoxicity: site of functional disturbance and correlation to loss of body weight. **Renal Physiol Biochem.**, v. 16, p. 131-145, 1993.

ANDERSSON, A.; FAGERBERG, J.; LEWENSOHN, R.; EHRSSON, H. Pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in humans. **J Pharm Sci.**, v. 85, p. 824-827, 1996.

ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. L. P. Effects of the antioxidantes curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. **Pharmacol Res.**, v. 43, p. 145-150, 2001.

ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D.; BIANCHI, M. L. P. Protective effects of vitamin C against cisplatin- induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose dependent study. **Pharmacol. Res.**, v. 41(4), p. 405-411, 2000.

ASENSI, M.; MEDINA, I.; ORTEGA, A.; CARRETEIRO, J.; BAÑO, M. C.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J. M. Inhibition of cancer growth by resveratrol is related to its low bioavailability. **Free Radic. Biol Med**, v. 33, n. 3, p. 387–398, 2002.

ATESSAHIN, A.; YILMAZ, S.; KARAHAN, I.; CERIBASI, A. O.; KARAOGLU, A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Toxicology.**, v. 212, p. 116-123, 2005.

BADARY, O. A.; ABDEL-MAKSOUND, S.; AHMED, W. A.; OWIEDA, G. H. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. **Life Sci.**, v. 76, p. 2125-2135, 2005.

BAEK, S. M.; KWON, C. H.; KIM, J. H.; WOO, J. S.; JUNG, J. S.; KIM, Y. K. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. **J Lab Clin Med.**, v. 142, p. 178-186, 2003.

BELLON, S. F.; COLEMAN, J. H.; LIPPARD, S. J. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Biochemistry**, v. 30, p. 8026-8035, 1991.

* De acordo com a Norma Técnica da ABNT NBR 6023 – Informação e Documentação – Referências – Elaboração (ago./2000). Abreviatura de periódicos segundo Norma Técnica da ABNT NBR 6032 – Abreviação de Título de Periódicos e Publicações.

BERTELLI, A. A.; GIOVANNINI, L.; STRADI, R.; BERTELLI, A.; TILLEMENT, J. P. Plasma, urine and tissue levels of *trans*- and *cis*-resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. **Int. J. tissue React.**, v. 18, p. 67-71, 1996.

BONVENTRE, J. V.; ZUK, A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? **Kidney Int.**, v. 66, p. 480-485, 2004.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review). **Oncol Rep.**, v. 10, 1663-1682, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-256, 1976.

CADENAS, S.; BARJA, G. Resveratrol, melatonin, vitamin E and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. **Free Radic. Biol Med**, v. 26, p. 1531-1537, 1999.

CAMARGO, S. M. R.; FRANCESCATO, H. D. C.; LAVRADOR, M. A. S.; BIANCHI, M. L. P. Oral administration of sodium selenite minimizes cisplatin toxicity on proximal tubules of rats. **Biological Trace Element Research**, v. 83, p. 251-262, 2001.

CHANDER, V.; CHOPRA, K. Protective effect of nitric oxide pathway in resveratrol renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Arch Med Res.**, v. 37, p. 19-26, 2006.

CHANDER, V.; CHOPRA, K. Possible role of nitric oxide in the protective effect of resveratrol in 5/6th nephrectomized rats. **J Surg Res.**, v. 42, p. 1198-1205, 2005.

CHANDER, V.; TIRKEY, N.; CHOPRA, K. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin protects against cyclosporine-induced nephrotoxicity through nitric oxide dependent mechanism. **Toxicology**, v. 210, p. 55-64, 2005.

CHOIE, D. D.; LONGNECKER, D. S.; CAMPO, A. A. Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats. **Lab. Invest.**, v. 44, p. 397-402, 1981.

CLIFTON, G. G.; PEARCE, C.; O'NEILL, W. M. Jr; WALLIN, J. D. Early polyuria in the rat following single-dose cis-dichlorodiammineplatinum (II): effects on plasma vasopressin concentration and posterior pituitary function. **J Lab Clin Med.**, v. 100, p. 659-670, 1982.

DALEY-YATES, P. T.; McBRIEN, D. C. Cisplatin metabolites in plasma, a study of their pharmacokinetics and importance in the nephrotoxic and antitumor activity of cisplatin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, p. 3063-3070, 1984.

DAUGAARD, G. Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies. **Dan Med Bull**, v. 37, p. 1-12, 1990.

DeCONT, R. C.; TOFTNESS, B. R.; LANGE, T. C.; CREASEY, W. A. Clinical and pharmacological studies with cis-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Res.**, v. 33, p. 1310-1315, 1973.

DOBYAN, D. C.; LEVI, J.; JACOBS, C.; KOSEK, J.; WEINER M. W. Mechanism of *cis*-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 213, p.551-556, 1980.

DONG, Z. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. **Mutation Research**, v. 523-524, p. 145-150, 2003.

ECELBARGER, C. A.; SANDS, J. M.; DORAN, J. J.; CACINI, W.; KISHORE, B. K. Expression of salt and urea transporters in rat kidney during cisplatin-induced polyuria. **Kidney Int.**, v. 60, p. 2274-2282, 2001.

EDDY, A. A. Molecular basis of renal fibrosis. **Pediatr Nephrol.**, v. 15, p. 290-301, 2000.

EKBORN, A.; LINDBERG, A.; LAURELL, G.; WALLIN, I.; EKSBERG, S.; EHRSSON, H. Ototoxicity, nephrotoxicity and pharmacokinetics of cisplatin and its monohydrated complex in the guinea pig. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 51, p. 36-42, 2003.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FATIMA, S.; YUSUFI, A. N. K.; MAHMOOD, R. Effect of cisplatin on renal brush border membrane enzymes and phosphate transport. **Hum Exp Toxicol.**, v. 23, p. 547-554, 2004.

FRANCESCATO, H. D. C.; COIMBRA, T. M.; COSTA, R. S.; BIANCHI, M. L. P. Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. **Kidney Blood Press Res.**, v. 27, p. 148-158, 2004.

FRANCESCATO, H. D. C.; COSTA, R. S.; CAMARGO, S. M. R.; ZANETTI, M. A.; LAVRADOR, M. A.; BIANCHI, M. L. P. Effect of oral selenium administration on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacol Res.**, v. 43, p. 77-82, 2001.

FRIEDEWALD, J. J.; RABB, H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 66, p. 486-491, 2004.

GIACCONE, G. Clinical perspectives on platinum resistance. **Drugs**, v. 59, p. 9-17, 2000.

GIOVANNINI, L.; MIGLIORI, M.; LONGONI, B. M.; DAS, D.K.; BERTELLI, A. A.; PANCICHI, V.; FILIPPI, C.; BERTELLI, A. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 34, p. 262-270, 2001

GORDON, J. A.; PETERSON, L. N.; ANDERSON, R. J. Water metabolism after cisplatin in the rat. **Am J Physiol.**, v. 243, F36-43, 1982.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 250-358.

HANNEMANN, J.; BAUMANN, K. Nephrotoxicity of cisplatin, carboplatin and transplatin. **Arch. Toxicol.**, v. 64, p. 393-400, 1990.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

IGNATOWICZ, E.; BAER-DUBOWSKA, W. Resveratrol, a natural chemopreventive agent against degenerative diseases. **Pol J. Pharmacol.**, v. 53, p. 557-569, 2001.

IGUCHI, T.; NISHIKAWA, M.; CHANG, B.; MUROYA, O.; SATO, E. F.; NAKATANI, T.; INOUE, M. Edaravone inhibits acute renal injury and cyst formation in cisplatin-treated rat kidney. **Free Radic Res.**, v. 38, p. 333-341, 2004.

JURCZUK, M.; BRZÓSKA, M. M.; MONIUSZKO-JAKONIUK, J.; GALAŻYN-SIDORCZUK, M.; KULIKOWSKA-KARPIŃSKA, E. Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p.429-438, 2004.

KARTALOU, M.; ESSIGMANN, J. M. Mechanism of resistance to cisplatin. **Mutat Res.**, v. 478, p. 23-43, 2001.

KISHORE, B. K.; KRANE, C. M.; DI IULIO, D.; MENON, A. G.; CACINI, W. Expression of renal aquaporins 1, 2, and 3 in a rat model of cisplatin-induced polyuria. **Kidney Int.**, v. 58, p. 701-711, 2000.

KRUIDERING, M.; WALTER, B. V.; HEER, E.; MULDER, G. J.; NAGELKERKE, J. F. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 280, p. 638-649, 1997.

KUHNLE, G.; SPENCER, J. P.; CHOWRIMOOTO, G.; SCHROETER, H.; DEBNAM, E. S.; SRAI, S. K.; RICE-EVANS, C.; HAHN, U. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 27, p. 212-217, 2000.

LAURENT, G.; YERNAUX, V.; NONCLERCQ, D.; TOUBEAU, G.; MALDAGUE, P.; TULKENS, P. M.; HEUSON-STIENNON, J. A. Tissue injury and proliferative response induced in rat kidney by cis-diamminedichloroplatinum (II). **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.**, v. 55, p. 129-145, 1988.

LEE, J. J.; SEO, J. W.; LEE, B. H.; CHUNG, K. H.; CHI, D. Y. Syntheses and radical scavenging activities of resveratrol derivatives. **Bioorg Med. Chem Lett.**, v. 14, p. 463-466, 2004.

LOKICH, J. What is the "best" platinum: cisplatin, carboplatin or oxaliplatin? **Cancer Invest.**, v. 19, p. 756-760, 2001.

LOPEZ-VELEZ, M.; MARTINEZ-MARTINEZ, M.; DEL VALLE-RIBES, C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 43 (3), p. 233-44, 2003.

LU, Y.; KAWASHIMA, A.; HORII, I.; ZHONG, L. Cisplatin-induced cytotoxicity in BSO-exposed renal proximal tubular epithelial cells: sex, age, and species. **Ren Fail.**, v. 27, p. 629-633, 2005.

MANNA, S. K.; MUKHOPADHYAY, A.; AGGARWAL, B. B. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factor NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: Potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. **J. Immunol.**, v. 164 (12), p. 6509-19, 2000.

MARIER, J. F.; VACHON, P.; GRITSAS, A.; ZHANG, J.; MOREAU, J. P.; DUCHARME, M. P.. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. **J. Pharmacol. Exp Ther.**, v. 302, n. 1, p. 369-373, 2002.

MATSUSHIMA, H.; YONEMURA, K.; OHISHI, K.; HISHIDA, A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. **J Lab Clin Med.**, v. 131, p. 518-526, 1998.

McKEAGE, M. J. Comparative adverse effect profiles of platinum drugs. **Drug Saf.**, v. 13, p. 228-244, 1995.

MELLO, J. A.; LIPPARD, S. J.; ESSIGMANN, J. M. DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo. **Biochemistry**, v. 34, p. 14783-14791, 1995.

MENG, X.; MALIAKAL, P.; LU, H.; LEE, M. J.; YANG, C. Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice and rats after ingestion of pure compounds and grape juice. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 935-942, 2004.

MISTRY, P; MERAZGA, Y.; SPARGO, D. J.; RILEY, P. A. McBRIEN, D. C. The effects of cisplatin on the concentration of protein thiols and glutathione in the rat kidney. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 28, p. 277-82, 1991.

MORA, L. O.; ANTUNES, L. M. G.; FRANCESCATO, H. D. C.; BIANCHI, M. D. L. The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacol Res.**, v. 47, p. 517-522, 2003.

MORALES, A. I.; BUITRAGO, J. M.; SANTIAGO, J. M.; FERNANDEZ-TAGARRO, M.; LOPEZ-NOVOA, J. M.; PEREZ-BARRIOCANAL, F. Protective effect of *trans*-resveratrol on gentamicin-induced nephrotoxicity. **Antioxid Redox Signal**, v. 4, n. 6, p. 893-898, 2002.

NIHEI, T.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Inhibitory effect of resveratrol on proteinuria, hypoalbuminemia and hyperlipidemia in nephritic rats. **Life Sci.**, v. 68, p. 2845-2852, 2001.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RINCON, J.; ROMERO, M.; VIERA, N.; PEDREAÑEZ, A.; MOSQUERA, J. Increased oxidative stress and apoptosis in acute puromycin aminonucleoside nephrosis. **Int J Exp Pathol.**, v. 85, p. 25-33, 2004.

ROY FIRST, M. Renal function. In: KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. **Clinical chemistry theory, analysis, correlation**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1996. p. 484-505.

SAAD, S. Y.; NAJJAR, T. A.; ALASHARI, M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v. 31, p. 862-867, 2004.

SADZUKA, Y.; SHOJI, T.; TAKINO, Y. Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. **Toxicol Lett.**, v. 62, p. 293-300, 1992.

SAFIRSTEIN, R.; MILLER, P.; DIKMAN, S.; LYMAN, N. SHAPIRO, C. Cisplatin nephrotoxicity in rats: defect in papillary hypertonicity. **Am J Physiol.**, v. 241, p. F175-F185, 1981.

SAFIRSTEIN, R.; MILLER, P.; GUTTENPLAN, J. B. Uptake and metabolism of cisplatin by rat kidney. **Kidney Int.**, v. 25, p. 753-758, 1984.

SALE, S.; VERSCHOYLE, R. D.; BOOCOCK, D.; JONES, D. J. L.; WILSHER, N.; RUPARELIA, K. C.; POTTER, G. A.; FARMER, P. B.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Pharmacokinetics in mice and growth-inhibitory properties of the putative cancer chemopreventive agent resveratrol and the synthetic analogue *trans* 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene. **British Journal of Cancer**, v. 90, p. 736-744, 2004.

SALLES, B.; BUTOUR, J. L.; LESCA, C.; MACQUET, J.P. cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ and trans-Pt(NH₃)₂Cl₂ inhibit DNA synthesis in cultured L1210 leukemia cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 112, p. 555-563, 1983.

SATOH, M.; KASHIHARA, N.; FUJIMOTO, S.; HORIKE, H.; TOKURA, T.; NAMIKOSHI, T.; SASAKI, T.; MAKINO, H. A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 305, p. 1183-1190, 2003.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1968.

SHARMA, S.; ANJANEYULU, M.; KULKARNI, S. K.; CHOPRA, K. Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin, attenuates diabetic nephropathy in rats. **Pharmacology**, v. 76, p. 69-75, 2005.

SHERMAN, S. E.; LIPPARD, S. J. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. **Chem. Ver.**, v. 87, p. 1153-1181, 1987.

SHIMEDA, Y.; HIROTANI, Y.; AKIMOTO, Y.; SHINDOU, K.; IJIRI, Y.; NISHIHORI, T.; TANAKA, K. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Biol Pharm Bull.**, v. 28, p. 1635-1638, 2005.

SIEMANN, E. H.; CREASY, L. L. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. **Am j. Enol Vitic.**, v. 43, n. 1, p. 49-52, 1992.

SILVA, C. R.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacol Res.**, v. 43, n. 6, p. 561-566, 2001.

SORENSEN, C. M.; EASTMAN, A. Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. **Cancer Res.**, v. 48, p. 6703-6707, 1988.

SPERKER, B.; BACKMAN, J. T.; KROEMER, H. K. The role of beta-glucuronidase in drug disposition and drug targeting in humans. **Clin Pharmacokinet.**, v. 33, p. 18-31, 1997.

STOJANOVIĆ, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of *trans*-resveratrol and its analogues in radical liposome oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 391 (1), p. 79-89, 2001.

SUGIHARA, K.; NAKANO, S.; KODA, M.; TANAKA, K.; FUKUISHI, N.; GEMBA, M. Stimulatory effect of cisplatin on production of lipid peroxidation in rat renal tissues. **Jap. J. Pharmacol.**, v. 43, p. 247-252, 1987.

TURNER, R. T.; EVANS, G. L.; ZHANG, M.; MARAN, A.; SIBONGA, J. D. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? **Endocrinology**, v. 140, p. 50-54, 1999.

VERPLANKE, A. J.; HERBER, R. F.; DE WIT, R.; VEENHOF, C. H. Comparison of renal function parameters in the assessment of cisplatin induced nephrotoxicity. **Nephron.**, v. 66, p. 267-272, 1994.

VITRAC, X.; BORNET, A.; VANDERLINDE, R.; VALLS, J.; RICHARD, T.; DELAUNAY, J. C.; MÉRILLON, J. M.; TEISSÉDRE, P. L. Determination of stilbenes (-viniferin, *trans*-astrigin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, -viniferin) in Brazilian wines. **J Agric Food Chem.**, v. 53, p. 5664-5669, 2005.

VITRAC, X.; DESMOULIÈRE, A.; BROUILLAUD, B.; KRISA, S.; DEFFIEUX, G.; BARTHE, N.; ROSENBAUM, J.; MÉRILLON, J. M. Distribution of [¹⁴C]-*trans*-

resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration. **Life Sci.**, v.72, p. 2219-2233, 2003.

VON HOFF, D. D.; SCHILSKY, R.; REICHERT, C. M.; REIDDICK, R. L.; ROZENCWEIG, M.; YOUNG, R. C.; MUGGIA, F. M. Toxic effects of cis-dichlorodiammineplatinum(II) in man. **Cancer Treat Rep.**, v. 63, p. 1527-1531, 1979.

WANG, L.; HEREDIA, A.; SONG, H.; ZHANG, Z.; YU, B.; DAVIS, C. REDFIELD, R. Resveratrol glucuronides as the metabolites of resveratrol in humans: characterization, synthesis, and anti-HIV activity. **Journal of Pharmaceutical Science.**, v. 93, p. 2448-2457, 2004.

WONG, N. L.; WALKER, V. R.; WONG, E. F.; SUTTON, R. A. Mechanism of polyuria after cisplatin therapy. **Nephron.**, v. 65, p. 623-627, 1993.

YAMATE, J.; MACHIDA, Y.; IDE, M.; KUWAMURA, M.; SAWAMOTO, O.; LaMARRE, J. Effects of lipopolysaccharide on the appearance of macrophage populations and fibrogenesis in cisplatin-induced rat renal injury. **Exp Toxicol Pathol.**, v. 56, p. 13-24, 2004.

YILDIRIM, Z.; SOGUT, S.; ODACI, E.; IRAZ, M.; OZYURT, H.; KOTUK, M.; AKYOL, O. Oral erdosteine administration attenuates cisplatin-induced renal tubular damage in rats. **Pharmacol Res.**, v. 47, p. 149-156, 2003.

YSEBAERT, D. K.; De GREEF, K. E.; De BEUF, A.; VAN ROMPAY, A. R.; VERCAUTEREN, S.; PERSY, V. P.; De BROE, M. E. T cells as mediators in renal ischemia/reperfusion injury. **Kidney Int.**, v. 66, p. 491-496, 2004.

YU, C.; SHIN, Y. G.; CHOW, A.; LI, Y.; KOSMEDER, J. W.; LEE, Y. S.; HIRSCHELMAN, W. H.; PEZZUTO, J. M.; MEHTA, R. G.; BREEMEN, R. B. V. Human, rat, and mouse metabolism of resveratrol. **Pharm Res**, v. 19, n. 12, p. 1907-1914, 2002.

ZHANG, J. G.; LINDUP, W. E. Cisplatin nephrotoxicity: decreases in mitochondrial protein sulphhydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. **Biochem Pharmacol.**, v. 47, p. 1127-1135, 1994.

ZHANG, J. G.; LINDUP, W. E. Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. **Biochem Pharmacol.**, v. 45, p. 2215-2222, 1993.

ZHENG, H.; FINK, D.; HOWELL, S. B. Pharmacological basis for a novel therapeutic strategy based on the use of aquated cisplatin. **Clin Cancer Res.**, v. 3, p. 1157-1165, 1997.

ZHONG, L. F.; ZHANG, J. G.; ZHANG, M.; MA, S. L.; XIA, Y. X. Protection against cisplatin-induced lipid peroxidation and kidney damage by procaine in rats. **Arch. Toxicol.**, v. 64, p. 599-600, 1990.

ZHU, Y.; HUANG, T.; CREGOR, M.; LONG, H.; KISSINGER, C. B.; KISSINGER, P. T. Liquid chromatography with multichannel electrochemical detection for the determination of *trans*-resveratrol in rat blood utilizing an automated blood sampling device. **J Chromatogr B.**, v. 740, p. 129-133, 2000.

Apêndice A – Tabelas com os dados individuais dos animais utilizados nos experimentos.

Tabela 4 – Creatinina sérica (mg/dL) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.

Grupo	Controle	GV	GR	GcDDP	GV + cDDP	GR25 + cDDP
Rato						
1	0,28	0,45	0,43	1,51	0,92	0,51
2	0,52	0,43	0,64	1,38	1,27	0,43
3	0,40	0,40	0,47	1,25	0,72	0,42
4	0,35	0,58	0,58	0,69	1,98	0,47
5	0,47	0,43	0,51	1,78		0,39
6	0,36			0,72		0,33
Média	0,40	0,46 ^{b, c}	0,53 ^{b, c}	1,22 ^a	1,22 ^a	0,42 ^{b, c}
± Erro padrão	±0,04	±0,03	±0,04	±0,18	±0,28	±0,02

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GV = veículo (DMSO:Salina (1:1), ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GR = Resveratrol (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GV + cDDP = veículo + cisplatina (DMSO:Salina, 30 minutos antes da administração de cisplatina); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao GcDDP; ^c p < 0,05 em relação ao GV+cDDP.

Tabela 5 – Proteína urinária (mg/24h) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.

Grupo	Controle	GV	GR	GcDDP	GV + cDDP	GR25+cDDP
Rato						
1	11,56	25,20	9,84	38,08	27,90	16,64
2	16,80	19,04	15,84	31,50	48,16	25,92
3	24,60	19,00	29,44	37,80	27,60	23,66
4	14,49	6,44	21,12	50,40	21,62	31,24
5	24,60	12,96	15,30	45,32		30,88
6	18,10			52,80		24,90
Média	18,36	16,53 ^{b, c}	18,31 ^{b, c}	42,65 ^a	31,32 ^b	25,54 ^b
± Erro padrão	±2,17	±3,18	±3,31	±3,36	±5,80	±2,19

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GV = veículo (DMSO:Salina (1:1), ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GR = Resveratrol (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GV + cDDP = veículo + cisplatina (DMSO:Salina, 30 minutos antes da administração de cisplatina); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao GcDDP; ^c p < 0,05 em relação ao GV+cDDP.

Tabela 6 – Fluxo urinário (mL/24h) dos animais sacrificados após 5 dias tratamento com cisplatina ou salina.

Grupo	Controle	GV	GR	GcDDP	GV + cDDP	GR25+cDDP
Rato						
1	7	12	12	28	45	8
2	8	17	16	30	28	12
3	12	10	32	60	30	14
4	7	4	12	42	46	22
5	12	12	17	44		16
6	10			32		10
Média	9,33	11,00 ^{b, c}	17,80 ^{b, c}	39,33 ^a	37,25 ^a	13,67 ^{b, c}
± Erro padrão	±0,95	±2,10	±3,69	±4,92	±4,78	±2,03

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GV = veículo (DMSO:Salina (1:1), ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GR = Resveratrol (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GV + cDDP = veículo + cisplatina (DMSO:Salina, 30 minutos antes da administração de cisplatina); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao GcDDP; ^c p < 0,05 em relação ao GV+cDDP.

Tabela 7 – Peso inicial (g) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.

Grupo Rato	Controle	GV	GR	GcDDP	GV + cDDP	GR25 + cDDP
1	199,4	214	178,5	184,1	201	204,8
2	191,6	214	194,8	183,3	200	205,8
3	203,1	183	191,8	192,2	186	190,5
4	211,4	196	183,5	201,9	194,6	215,5
5	209,8	196,8	176,0	205,5		212,5
6	202,3			217,7		204,4
Média	202,8 ^d	200,9	184,9	197,5	195,4	205,6 ^d
± Erro padrão	±2,88	±5,93	±3,66	±5,48	±3,44	±3,53

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GV = veículo (DMSO:Salina (1:1), ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GR = Resveratrol (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GV + cDDP = veículo + cisplatina (DMSO:Salina, 30 minutos antes da administração de cisplatina); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^d p < 0,05 em relação ao grupo Resveratrol.

Tabela 8 – Peso final (g) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.

Grupo Rato	Controle	GV	GR	GcDDP	GV + cDDP	GR25 + cDDP
1	207,7	251	228,2	152,5	195	180,0
2	216,6	265	233,1	164,5	182	221,8
3	240,6	218	240,1	188,0	196	222,0
4	245,0	241	233,5	198,7	189,3	242,0
5	257,6	244,4	201,3	193,5		230,5
6	255,0			211,2		229,3
Média	237,1	243,9 ^{b, c}	227,2 ^{b, c}	184,7 ^a	190,6 ^{b, c}	220,9 ^{b, c}
± Erro	±8,37	±7,66	±6,75	±9,00	±3,22	±8,72
padrão						

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GV = veículo (DMSO:Salina (1:1), ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GR = Resveratrol (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GV + cDDP = veículo + cisplatina (DMSO:Salina, 30 minutos antes da administração de cisplatina); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao GcDDP; ^c p < 0,05 em relação ao GV+cDDP.

Tabela 9 – Relação peso dos rins/peso corpóreo (%) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.

Grupo Rato	Controle	GV	GR	GcDDP	GV + cDDP	GR25 + cDDP
1	0,66	0,76	0,83	1,01	1,18	0,57
2	0,78	0,75	0,82	0,85	1,04	0,70
3	0,60	0,83	0,92	1,14	1,02	0,69
4	0,84	0,79	0,81	1,08	1,32	0,84
5	0,82	0,86	0,79	1,29		0,78
6	0,83			1,02		0,82
Média	0,76	0,80 ^{b, c}	0,83 ^{b, c}	1,06 ^a	1,14 ^a	0,73 ^{b, c}
± Erro padrão	±0,04	±0,02	±0,02	±0,06	±0,07	±0,04

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GV = veículo (DMSO:Salina (1:1), ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GR = Resveratrol (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GV + cDDP = veículo + cisplatina (DMSO:Salina, 30 minutos antes da administração de cisplatina); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao GcDDP; ^c p < 0,05 em relação ao GV+cDDP.

Tabela 10 – Escore histológico do rim direito dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento com cisplatina ou salina.

Grupo	Controle	GV	GR	GcDDP	GV + cDDP	GR25 + cDDP
Rato						
1	0	0	0	4	4	0
2	0	0	0	4	4	0
3	0	0	0	4	4	0
4	0	0	0	4	4	3
5	0	0	0	4		0
6	0			4		2
Média	0	0 ^{b, c}	0 ^{b, c}	4 ^a	4 ^a	0,83 ^{b, c}
± Erro padrão						±0,54

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GV = veículo (DMSO:Salina (1:1), ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GR = Resveratrol (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GV + cDDP = veículo + cisplatina (DMSO:Salina, 30 minutos antes da administração de cisplatina); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.). Escore 0 = ausência de lesão; escore 1 = lesão comprometendo até 25 % da área examinada; escore 2 = 25 a 50 %; escore 3 = 50 a 75 %; escore 4 = acima de 75%.

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao GcDDP; ^c p < 0,05 em relação ao GV+cDDP.

Tabela 11 – Número de células positivas para linfócitos no córtex renal dos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal.

<i>Rato</i>	<i>Grupo</i>	<i>Controle</i>	<i>GcDDP</i>	<i>GR25 + cDDP</i>
1		14	32	21
2		19	29	24
3		11	30	15
4		11	12	11
5		8	21	13
6		9	21	17
Média		12	24,17 ^a	16,83 ^b
± Erro padrão		±1,63	±3,09	±2,00

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao GcDDP.

Tabela 12 – Número de células positivas para linfócitos na região medular externa renal dos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal.

Rato	Grupo	Controle	GcDDP	GR25 + cDDP
1		18	40	24
2		15	37	23
3		13	30	16
4		10	13	13
5		9	19	9
6		9	23	19
Média		12,33	27,00 ^a	17,33 ^b
± Erro padrão		±1,50	±4,30	±2,38

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao GcDDP.

Tabela 13 – Número de células positivas para ED-1 no córtex renal dos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal.

Rato	Grupo	Controle	GcDDP	GR25 + cDDP
1		6,0	16,6	12,3
2		7,7	19,1	9,3
3		8,6	20,5	6,2
4		8,6	12,8	10,0
5		7,9	28,5	10,4
6		12,3	13,6	9,6
Média		8,52	18,52 ^a	9,63 ^b
± Erro padrão		±0,85	±2,34	±0,81

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao cDDP.

Tabela 14 – Número de células positivas para ED -1 na região medular externa renal dos animais sacrificados 5 dias após o tratamento intraperitoneal.

Rato	Grupo	Controle	GcDDP	GR25 + cDDP
1		6,64	67,90	12,30
2		5,16	59,00	7,16
3		7,28	61,60	6,16
4		8,00	38,50	14,10
5		8,00	81,30	11,60
6		8,68	53,80	14,80
Média		7,29	60,35 ^a	11,02 ^b
± Erro padrão		±0,51	±5,83	±1,46

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle; ^b p < 0,05 em relação ao cDDP.

Tabela 15 – Níveis renais de glutathione tecidual (nmol/mg proteína) dos animais sacrificados após 2 dias do tratamento intraperitoneal.

Rato	Grupo	Controle	GcDDP	GR25 + cDDP
1		42,98	34,24	37,05
2		52,56	37,74	27,77
3		37,76	34,63	30,98
4		39,46	36,78	32,50
5		43,34	31,25	44,09
6		68,13	28,78	46,35
Média		47,37	33,90 ^a	36,46 ^a
± Erro padrão		±4,65	±1,38	±3,04

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls. ^a p < 0,05 em relação ao Controle.

Tabela 16 – Níveis renais de malonodialdeído (MDA) (nmol/g tecido) dos animais sacrificados após 2 dias do tratamento intraperitoneal.

Rato	Grupo	Controle	GcDDP	GR25 + cDDP
1		33,23	30,76	29,97
2		32,26	41,09	13,12
3		28,37	15,70	32,22
4		15,80	36,41	32,30
5		34,47	51,80	34,43
6		19,53	41,10	34,98
Média		27,28	36,14	29,50
± Erro padrão		±3,19	±4,97	±3,36

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls.

Tabela 17 – Níveis urinários de malonaldeído (MDA) (nmol/24h) dos animais sacrificados após 2 dias do tratamento intraperitoneal.

Rato	Grupo	Controle	GcDDP	GR25 + cDDP
1		56,49	96,25	93,84
2		85,40	97,70	114,75
3		104,00	65,38	195,50
4		76,16	88,32	80,75
5		112,14	163,54	102,96
6		121,38	129,48	36,72
Média		92,60	106,8	104,1
± Erro padrão		±9,94	±14,12	±21,34

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls.

Tabela 18 – Níveis urinários malonaldeído (MDA) (nmol/24h) dos animais sacrificados após 5 dias do tratamento intraperitoneal.

Rato	Grupo	Controle	GcDDP	GR25 + cDDP
1		59,43	126,00	8,64
2		42,08	128,76	151,44
3		189,48	167,40	383,46
4		25,76	599,34	255,20
5		46,44	613,80	79,20
6		220,00	298,24	72,30
Média		97,20	322,30	158,40
± Erro padrão		±34,52	±93,50	±56,62

O tratamento foi realizado em dose única. Grupos: Controle (salina, ip., 30 minutos antes de outra salina, ip.); GcDDP = cisplatina (salina, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, 5mg/Kg, ip.); GR25 + cDDP = Resveratrol + Cisplatina (Resveratrol, 25 mg/Kg, ip., 30 minutos antes da administração de cisplatina, ip.).

ANOVA e pós-teste de Newman Keuls.