UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e
estado redox mitocondrial renal em ratos: efeito
protetor da dimetiltiouréia**

Neife Aparecida Guinaim dos Santos

Ribeirão Preto
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e estado
redox mitocondrial renal em ratos: efeito protetor da
dimetiltiouréia**

Neife Aparecida Guinaim dos Santos

**Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Toxicologia para a obtenção do
título de Doutor em Toxicologia, Área de
Concentração: Toxicologia**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

**Ribeirão Preto
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Neife Aparecida Guinaim dos

Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e estado redox mitocondrial renal em ratos. Efeito protetor da dimetiltiouréia. Ribeirão Preto, 2006.

109 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Santos, Antonio Cardozo dos.

1. Cisplatina. 2. Nefrotoxicidade. 3. Mitocôndria. 4. DMTU. 5. Espécies reativas de oxigênio (ERO).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Neife Aparecida Guinaim dos Santos

Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e estado redox mitocondrial renal em ratos: efeito protetor da dimetiltiouréia

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para a obtenção do título de
Doutor em Toxicologia, Área de
Concentração: Toxicologia

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Assinatura: _____

Defendida e aprovada pela Comissão Julgadora em: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo e orientador *Antonio Cardozo dos Santos*,
pelos muitos anos felizes
por sua presença serena e branda,
por renovar a minha admiração diariamente,
pelo apoio incondicional e estímulo profissional.

“... porto seguro onde eu vou ter...”

“As pessoas entram em nossas vidas por acaso,
mas não é por acaso que elas permanecem.”

Lílian Tonet

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, *Maria Aparecida e Mamed,*

Aos meus irmãos, *Fátima e Nasser,*

invariavelmente presentes em tudo que faço e sou.

“Que a estrada se abra à sua frente,

Que o vento sopra levemente em suas costas,

Que o sol brilhe morno e suave em suas faces,

Que a chuva caia de mansinho em seus campos,

E, até que nos encontremos de novo...

Que Deus os guarde nas palmas de Suas mãos!”

Prece Irlandesa

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

-
- ✠ À Professora Dra. Regina Helena Costa Queiroz, pelas freqüentes palavras de apoio e pelo incentivo constante ao meu aprimoramento profissional;
 - ✠ Às amigas Nádia e Sônia, com quem sempre pude contar;
 - ✠ À Cidinha, pela freqüente ajuda nas diversas atividades do laboratório;
 - ✠ À Simone Mafalda, minha amiga “Balzaquiana” dos primórdios dos nossos ensaios com cisplatina;
 - ✠ Ao meu professor de inglês e amigo de incontáveis manhãs de sábado, Carlos Pantoni, que me ensina inglês conversando sobre coisas da vida;
 - ✠ Ao amigo Wilson Roberto Malfará, pelo auxílio, dicas e informações durante a confecção da tese;
 - ✠ Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Ana, Rosana, Eleni e Carlos, pela dedicação e profissionalismo;
 - ✠ À Maria Cristina Manduca Ferreira, bibliotecária da Biblioteca Central – USP - Ribeirão Preto, pela competência e presteza na correção das referências bibliográficas;
 - ✠ Aos Professores Dr. Andreimar Martins Soares e Dra. Lusânia Maria Greggí Antunes pelas importantes sugestões e correções durante a etapa de Qualificação;

- ✠ A todos os docentes da FCFRP-USP que participaram de minha formação, em especial ao Professor Tadao Shuhama (*"in memoriam"*), em cujo laboratório realizei meu primeiro estágio durante a graduação;
- ✠ À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, onde encontrei muitos mestres e muitos amigos.

"Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho,
porque cada pessoa é única para nós,
e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho,
mas não vai só.

Levam um pouco de nós mesmos
e nos deixam um pouco de si mesmos.

Há os que levam muito,
mas não há os que não levam nada.

Há os que deixam muito,
mas não há os que não deixam nada.

Esta é a mais bela realidade da vida...

A prova tremenda de que cada um é importante
e de que ninguém se aproxima do outro por acaso "

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Professora Dra. *Maria de Lourdes Pires Bianchi*,

pelo apoio imprescindível.

“O valor das coisas não está

no tempo que elas duram,

mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis,

coisas inexplicáveis

e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

"We are not made up as we had always supposed of successively enriched packets of our own parts. We are shared, rented, occupied. As the interior of our cells, driving them, providing the oxidative energy that send us out for the improvement of each shining day, are the *mitochondria*, and in a strict sense, they are not ours. They turn out to be little separate creatures, the colonial posterity of migrant prokaryocytes, probably primitive bacteria that swam into ancestral precursor of our eukaryotic cells and staved there. Ever since, they have maintained themselves, replicating in their own fashion, privately, with their own DNA and RNA, quite different from ours. Without them, we would not move a muscle, drum a finger, think a thought."

The lives of a cell. Notes of a biology watcher (1975)

Lewis Thomas

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	iii
Lista de Figuras e Tabelas.....	vi
Resumo.....	viii
Summary.....	x

I – INTRODUÇÃO

Histórico e importância clínica dos complexos de platina.....	2
Farmacocinética e Farmacodinâmica da cisplatina.....	4
Anatomia e Fisiologia Renal.....	7
Danos renais induzidos pela cisplatina.....	11
Mitocôndria e morte celular por apoptose.....	14
A importância da mitocôndria e a formação das ERO.....	19
Estresse oxidativo resultante da exposição à xenobióticos.....	22
Homeostase intracelular do cálcio.....	23
Substâncias protetoras : antioxidantes	25
Uso clínico da cisplatina e perspectivas futuras.....	27

II – OBJETIVOS

III – MATERIAIS E MÉTODOS

1- Reagentes.....	33
2- Animais.....	33
3- Isolamento da fração mitocondrial.....	34
4- Determinação da proteína mitocondrial	35
5- Avaliação da Função Mitocondrial	
5.1- Consumo de oxigênio.....	36
5.2- Potencial de membrana mitocondrial.....	36
5.3- Transporte de cálcio.....	37
5.4- Determinação de ATP.....	37
6- Estudos envolvendo Estresse Oxidativo e Estado Redox Mitocondrial	
6.1- Lipoperoxidação da membrana mitocondrial.....	38
6.2- Oxidação da Cardiolipina	38

6.3- Oxidação de proteínas sulfidril (P-SH).....	39
6.4- Formação de proteínas carboniladas.....	39
6.5- Atividade da aconitase.....	39
6.6- Oxidação de NADPH.....	40
6.7- Glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG).....	40
7- Avaliação da Apoptose	
7.1- Atividade da caspase 3.....	41
8- Avaliação da função renal	
8.1- Uréia plasmática.....	41
8.2- Creatinina plasmática.....	41
9- Análise Estatística.....	42
IV – RESULTADOS.....	44
V – DISCUSSÃO.....	67
VI – CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS	

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

Apaf-1 - fator protease ativador de apoptose -1

ATP – Adenosina trifosfato

BHA - hidróxi anisol butilado

BHT- hidróxi tolueno butilado

CISP - cisplatina

Ctr1- transportador de cobre

Da - Dalton = unidade de massa

DMTU - dimetiltiouréia

DNA – ácido desoxiribonucleico

DNPH – 2,4 dinitrofenilhidrazina

DTNB - ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzóico]

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EGTA – ácido etileno glicol-bis(P-aminoetil eter)-N,N,N',N'-tetracético

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FADD - Fas Associated Death Domain

FAS – Fator de Apoptose (receptor de morte)

FCCP - carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona (desacoplador)

FDA - American Food and Drug Administration

FIA - Fator Indutor de Apoptose

GPx - glutational peroxidase

GRd - glutational redutase

GSH - glutational reduzida

GSSG – glutathiona oxidada

HEPES – ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

4-HNE - 4-hidroxi-2(E)-nonenal

i.p.- intraperitoneal

IP 3 - inositol trifosfato

kDa – kilodalton – unidade de massa atômica utilizada em Bioquímica e Biologia Molecular, particularmente com relação às proteínas.

MDA - Malondialdeído

NAD – nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado oxidado)

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo (estado reduzido)

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado oxidado)

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

NAO - 10-N-nonil-acridine orange

O₂^{•-} – anion radical superóxido

OH[•] – radical hidroxila

P-SH - Proteína Sulfidrila

RNA – ácido ribonucleico

RCR – Razão de Controle Respiratório

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - superóxido dismutase

TCA – ácido tricloroacético

TNFR1 - Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (receptor de morte)

TPM - Transição da Permeabilidade Mitocondrial

TRADD – TNF Associated Death Domain

TRIS - 2-amino-2-(hidroximetil) propano -1,3-diol

LISTA DE FIGURAS E TABELAS**Figuras:**

Figura 1. Isômeros cisplatina e transplatina	2
Figura 2. Estrutura e ativação da cisplatina.....	6
Figura 3. Formação e efeito dos adutos da cisplatina.....	7
Figura 4 . Principais áreas anatômicas do rim e do néfron.....	8
Figura 5. Duas vias apoptóticas propostas para a morte celular induzida pela cisplatina.....	18
Figura 6. Sítios de formação de superóxido na cadeia respiratória.....	22
Figura 7. Dimetiltiouréia ($C_3H_8N_2S$) – DMTU.....	27
Figura 8. Níveis de uréia em plasma de ratos.....	47
Figura 9. Níveis de creatinina em plasma de ratos.....	48
Figura10. Determinação de ATP em rim de ratos.....	49
Figura 11. Consumo de Oxigênio e Razão de Controle Respiratório (RCR) em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	51
Figura 12. Razão ADP/O em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	52
Figura 13. Transporte de cálcio em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	53
Figura 14. Lipoperoxidação. Níveis de MDA e 4 HNE em mitocôndrias isoladas de córtex renal de ratos.....	55
Figura 15. Níveis de proteínas sulfidríla (P-SH) em mitocôndrias isoladas de córtex renal de ratos.....	56

Figura 16. Níveis de GSH (A); de GSSG (B) e relação GSH/GSSG (C) em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	57
Figura 17. Níveis de proteína carbonilada em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	59
Figura 18. Níveis de NADPH em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	60
Figura 19. Atividade da aconitase em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	61
Figura 20. – Níveis de cardiolipina em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	62
Figura 21. Potencial de Membrana.....	64
Figura 22. Atividade da Caspase-3 em homogenato de córtex renal de ratos.....	65

Tabelas:

Tabela 1 - Drogas anticâncer com nefrotoxicidade inerente.....	12
Tabela 2 - Resultados obtidos nos parâmetros relacionados às funções renal e mitocondrial, ao estado redox mitocondrial, ao estresse oxidativo mitocondrial e à apoptose em rim de ratos submetidos aos diferentes tratamentos: salina (controle), cisplatina, DMTU + cisplatina e DMTU.....	45

RESUMO

Embora a cisplatina (cis-diaminocloroplatina II) seja um efetivo agente anticâncer, seu uso clínico é altamente limitado, predominantemente devido ao seu potencial nefrotóxico. Muitos estudos têm demonstrado que a cisplatina causa disfunção mitocondrial em células epiteliais renais e danos ao DNA nuclear devido à ação de espécies reativas de oxigênio tais como superóxido e radicais hidroxila. O aumento na produção destas espécies de oxigênio causa liberação de citocromo c no citosol, iniciando uma cascata de eventos que leva à morte celular por apoptose. A proteção seletiva da mitocôndria contra espécies reativas de oxigênio geradas pela cisplatina nos tecidos intactos tais como os rins, é fundamental na quimioterapia de pacientes com câncer. O presente estudo investigou os efeitos da cisplatina na bioenergética, no estado redox e no estresse oxidativo mitocondrial renal, bem como o potencial protetor da dimetiltiouréia (DMTU), um antioxidante seqüestrador de radicais hidroxila, com relação à toxicidade renal induzida pela cisplatina. **Método:** Ratos Wistar machos adultos pesando de 200 a 220 g foram divididos em quatro grupos de 8 animais cada. Ao primeiro grupo foi administrada cisplatina (10 mg/kg) por via intra peritonal (i.p.). O segundo grupo recebeu somente injeções de DMTU (500 mg/kg, i.p., seguida de 2 injeções diárias de 125 mg/Kg, i.p.). O terceiro grupo de animais foi tratado com DMTU (500 mg/kg, i.p.), imediatamente antes da injeção de cisplatina (10 mg/kg, i.p.), seguida de 2 injeções diárias de DMTU (125 mg/Kg, i.p.). O grupo controle recebeu somente solução salina (1ml/200g, i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após a injeção de cisplatina (ou salina). **Resultados:** O tratamento com a cisplatina resultou em uma marcante diminuição da função renal demonstrada pela elevação dos níveis plasmáticos de uréia e de creatinina, concomitante a uma significativa alteração nos parâmetros relacionados à função

mitocondrial (síntese de ATP, estado 3 da respiração, RCR, ADP/O, potencial de membrana e transporte de cálcio); ao estresse oxidativo mitocondrial (oxidação da cardiolipina, atividade da aconitase, lipoperoxidação, níveis de proteína carbonila e proteína sulfidril); ao estado redox mitocondrial (oxidação do NAD(P)H, relação glutathiona reduzida e glutathiona oxidada) e à apoptose (atividade da caspase 3). O pré-tratamento dos animais com DMTU preveniu a falência renal aguda e as alterações dos parâmetros mitocondriais, sendo capaz de inibir a morte celular por apoptose. **Conclusão:** Os resultados demonstram o papel central da mitocôndria na falência renal aguda induzida pela cisplatina, bem como o efeito protetor do DMTU e sugerem que o desenvolvimento de potentes seqüestradores de radicais hidroxila, passíveis de uso clínico, poderia contribuir de forma marcante na prevenção dos danos renais resultantes da quimioterapia com este fármaco.

Palavras-chave: cisplatina; nefrotoxicidade; mitocôndria; DMTU; espécies reativas de oxigênio (ERO)

SUMMARY

Although cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) is an effective anticancer agent, its clinical use is highly limited predominantly due to its adverse effects on renal functions. Many studies have shown that cisplatin causes mitochondrial dysfunction and direct injury to nuclear DNA by generating reactive oxygen species such as superoxide and hydroxyl radicals. Overproduction of reactive oxygen species causes the release of cytochrome c into cytosol, thereby triggering the sequence of events leading to cell death via apoptosis. The selective protection of mitochondria against reactive oxygen species generated by cisplatin in intact tissues, such as kidney, is of critical importance in the chemotherapy of patients with cancer. The present study examined the effects of cisplatin on renal mitochondrial bioenergetics, redox state and oxidative stress as well as the protective potential of dimethylthiourea (DMTU), a hydroxyl radical scavenger, against the cisplatin-induced nephrotoxicity.

Methods: Adult male Wistar rats weighing 200 to 220g were divided into 4 groups with 8 animals each.. The first group was given a single intraperitoneal (i.p.) injection of cisplatin (10 mg/kg). The second group was given only DMTU (500 mg/kg body weight, i.p, followed by intraperitoneal injections of 125 mg/Kg twice a day until sacrifice). A third group of animals was given DMTU (500 mg/kg body weight, i.p.), just before cisplatin injection (10 mg/kg body weight, i.p.), followed by intraperitoneal injections of DMTU (125 mg/Kg body weight) twice a day until sacrifice. The control group was treated only with saline solution (1ml/200g body weight, i.p.). Animals were sacrificed 72 hours after the treatment.

Results: Cisplatin treated animals presented a marked impairment of the renal function evidenced by the elevation of plasmatic creatinine and urea levels simultaneously to a significant alteration of the parameters related to: (a) the mitochondrial function assessed by ATP synthesis,

state 3 respiration, RCR, ADP/O ratio, membrane potential, calcium uptake; (b) the mitochondrial oxidative stress assessed by cardiolipin oxidation, aconitase activity, lipid peroxidation, protein carbonyls and protein sulphhydryl; (c) the mitochondrial redox state assessed by NADPH/NADP⁺ ratio, GSH/GSSG ratio and (d) apoptosis assessed by caspase-3 activity. DMTU substantially inhibited cisplatin-induced mitochondrial injury and cellular death by apoptosis, thereby suppressing the occurrence of acute renal failure. **Conclusions:** Results show the central role of the mitochondria in the cisplatin-induced renal acute failure, the protective potential of DMTU and suggest that the development of potent hydroxyl radical scavengers suitable for use in man could minimize the adverse effects of cisplatin in the kidney of patients under chemotherapy.

Key words: cisplatin; nephrotoxicity; mitochondria; DMTU; reactive oxygen species (ROS)

INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

Histórico e Importância Clínica dos Complexos de Platina

No início dos anos 60, ao estudar os efeitos de campos elétricos sobre o crescimento bacteriano, Rosenberg observou um curioso fenômeno: quando um campo elétrico era aplicado em eletrodos de platina imersos em uma solução aeróbica de *Escherichia coli* crescendo na presença de NH_4Cl , as bactérias não se dividiam normalmente, mas adquiriam um crescimento filamentosos atingindo tamanho até 300 vezes acima do normal. Um produto da eletrólise dos eletrodos de platina, identificado como *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, era o responsável por esse intrigante comportamento. Subseqüentemente verificou-se que vários outros complexos de platina também induziam o crescimento filamentosos e que enquanto o complexo bivalente *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (cisplatina) era ativo, seu isômero *trans* não era (Figura 1). Então, como os compostos de platina inibiam a divisão celular sem matar as bactérias, especulou-se que eles poderiam inibir o rápido crescimento de células tumorais, sem matar as demais células do organismo hospedeiro. Testes da atividade antitumoral dos compostos de platina forneceriam resultados similares: os isômeros *cis* eram ativos enquanto os isômeros *trans* não eram (SHERMAN e LIPPARD, 1987; ROSENBERG; MANSY; THOMPSON, 1973).

Figura 1. Isômeros cisplatina (esquerda) e transplatina (direita)

Na década de 70, uma série de experimentos foram conduzidos na “Michigan State University” com a finalidade de testar os efeitos da cisplatina e de outros complexos de platina em sarcomas artificialmente implantados em ratos e revelaram que a cisplatina era o mais eficaz agente anticâncer do grupo avaliado. Esses resultados foram considerados particularmente satisfatórios, pois naquela época não se dispunham de outras drogas anticâncer tão efetivas. Além da regressão completa do tumor, o sistema imunológico dos animais tratados rejeitou novos implantes do mesmo tumor por um período de até 11 meses, o maior tempo avaliado nesse estudo. Após a cura, os animais tratados atingiram sua expectativa de vida máxima, que é de aproximadamente 30 meses (ROSENBERG, 1980).

Experimentos posteriores foram conduzidos com outras espécies animais (cachorros e macacos) para estabelecimento dos níveis de dose seguros, bem como dos efeitos adversos inerentes à terapia com cisplatina.

Aprovado em 1979 pelo FDA (“American Food and Drug Administration”), o uso clínico da cisplatina revolucionou o tratamento de certos tipos de tumores, especialmente do trato genitourinário (SHERMAN; LIPPARD, 1987). Desde então, a cisplatina é um dos agentes quimioterápicos mais amplamente utilizados para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos, bem como hematológicos (NISHIKAWA et al., 2001). É utilizada para o tratamento de câncer de testículos, com percentual de cura superior a 90%, podendo atingir 100% nos casos de detecção precoce (WANG; LIPPARD, 2005); câncer de ovário e de bexiga, sendo também componente importante na quimioterapia empregada contra câncer de pulmão, cabeça e pescoço, pâncreas, mama, endométrio e esôfago (em conjunto com radioterapia), além de câncer cervical avançado, osteosarcomas e melanomas metastáticos, dentre outros. É também utilizada nos casos de tumores sólidos que

não responderam ao tratamento padrão empregado. O efeito terapêutico da cisplatina é significativamente aumentado com o aumento da dose, porém a terapia com altas doses é limitada pela nefrotoxicidade e neurotoxicidade (CVITKOVIC, 1998; HANIGAN; DEVARAJAN, 2003).

Pacientes com câncer pulmonar ou de ovário, freqüentemente desenvolvem resistência aos fármacos com platina, provavelmente devido ao intenso reparo dos adutos cisplatina-DNA; o câncer de bexiga também se caracteriza pelo desenvolvimento de resistência à cisplatina, provavelmente devido à inativação pela glutathione, metalotioneína ou outras moléculas contendo grupos tiois e o câncer de cólon não responde ao tratamento com complexos de platina (DE GRAAF et al., 1997; WANG; LIPPARD, 2005). Segundo Koberle et al. (1997), a hipersensibilidade de células tumorais de testículo à cisplatina pode estar relacionada a uma deficiência no reparo do DNA.

Farmacocinética e Farmacodinâmica da cisplatina

Estudos iniciais apontavam que a cisplatina entraria nas células principalmente por difusão, porém estudos mais recentes relatam um transporte ativo pelo transportador de cobre Ctr1 (ISHIDA et al., 2002). Uma vez na corrente circulatória, a cisplatina encontra-se ligada às proteínas plasmáticas numa proporção de 80 a 88%. Seu principal metabólito ativo, monoaquo- platina, reage rapidamente com proteínas de baixo peso molecular e grupos sulfidríla, tais como: glutathione, cisteína e metionina; e então com proteínas de elevado peso molecular como albumina e gamaglobulinas, através de ligações covalentes. Sua meia vida plasmática é longa, aproximadamente 10 dias, sendo que a platina acumula-se

progressivamente no plasma. A excreção renal da cisplatina é complexa e combina processos de reabsorção e secreção (BOISDRON-CELLE et al., 2001).

Altas concentrações da cisplatina são encontradas nos rins, fígado, intestino e testículos, mas não no sistema nervoso central (SNC). Quando administrada por infusão rápida, a meia-vida plasmática é mais curta e a quantidade de fármaco excretado é maior. A excreção biliar ou intestinal da cisplatina parece ser mínima (ROSENBERG, 1985; BAJORIN et al., 1986). Acumula-se rapidamente no túbulo renal proximal, reage com DNA, RNA e com macromoléculas celulares e, direta ou indiretamente, produz espécies reativas do oxigênio, que estão ligadas ao surgimento de nefrotoxicidade (NISHIKAWA et al., 2001).

A cisplatina é um fármaco de configuração plana, possuindo um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia (Figura 2).

A presença de íons cloreto no plasma e nas células modula a reatividade da cisplatina *in vivo*. Sabe-se que o fármaco administrado por injeção intravenosa é ativado durante a passagem pelas membranas celulares (ROSENBERG, 1985).

Uma vez no interior da célula, os íons cloreto da molécula de cisplatina se dissociam da platina devido à baixa concentração intracelular desses íons (0,145 M no meio extracelular e 3 mM no meio intracelular) o que facilita esse processo, produzindo maiores quantidades de complexos aquosos, mais reativos (COHEN; LIPPARD, 2001). A hidrólise intracelular da cisplatina leva à formação dos metabólitos reativos: diaquo-diamino-platino e mono-cloro-mono-aquo-diamino-platino, capazes de alquilar bases púricas e pirimidínicas (SCHNELLMANN, 2001).

A substituição do cloreto pela água fornece uma molécula carregada positivamente, capaz de ligar-se a nucleófilos celulares do DNA, RNA e proteínas. Assim, o efeito antineoplásico da cisplatina se dá através da troca de moléculas de

cloro em *cis* por água ou grupos hidroxil (Figura 2), dando origem a compostos altamente reativos (LIPPARD, 1987; HALABE; WONG; SUTTON, 1991).

Figura 2. Estrutura e ativação da cisplatina (LIPPARD, 1987)

Os complexos de platina são capazes de reagir com o DNA, formando ligações cruzadas intra e interfilamentares (Figura 3), promovendo distorções na dupla hélice do DNA e impedindo sua replicação (ZWELLING; KOHN, 1979; SHERMAN; LIPPARD, 1987).

Evidências experimentais indicam que os adutos DNA-cisplatina são os responsáveis pela morte das células em divisão (EASTMAN, 1999). A especificidade da cisplatina em relação à determinada fase do ciclo celular parece diferir entre os tipos celulares, embora os efeitos relativos à ligação cruzada sejam mais pronunciados durante a fase S (KADIKOYLU et al., 2004).

Figura 3. Formação e efeito dos adutos da cisplatina. Uma vez dentro da célula, a cisplatina reage com a água, formando $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{OH}_2)]^+$ e $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. O átomo de platina liga-se covalentemente à posição N⁷ das purinas formando ligações cruzadas 1,2 ou 1,3 intrafilamentares e ligações cruzadas interfilamentares. Essas ligações ao DNA ocorrem em substituição aos íons cloreto da molécula original de cisplatina. Esses adutos cisplatina-DNA causam várias respostas celulares, tais como: inibição da replicação, inibição da transcrição, interrupção do ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose (WANG; LIPPARD, 2005).

Anatomia e Fisiologia Renal

O rim tem aproximadamente 10 a 12 cm de comprimento, pesa cerca de 150 g e contém três áreas anatômicas: córtex, medula e papila (Figura 4). Entre o córtex e a medula estão as unidades funcionais dos rins, os néfrons. Cada rim contém aproximadamente $1,25 \times 10^6$ néfrons (HARTMANN, 1994), sendo que cada néfron (Figura 4) é composto de: glómerulo, túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor (SCHNELLMANN, 2001; FIRST, 1996).

Figura 4. Principais áreas anatômicas do rim e do néfron. Néfron: (1) ramo ascendente da alça de Henle, (2) ramo descendente da alça de Henle, (3) capilares peritubulares, (4) túbulo proximal, (5) glomérulo (cápsula de Bowman + capilares glomerulares), (6) túbulo distal; Rim: (A) veia renal, (B) artéria renal, (C) ureter, (D) medula, (E) pélvis e (F) córtex ([science.howstuffworks.com/ kidney](http://science.howstuffworks.com/kidney)).

As funções primárias dos rins consistem na formação de urina por ultrafiltração nos glomérulos, na reabsorção tubular seletiva de água e de solutos e na secreção tubular seletiva de solutos. Também desempenham função endócrina, atuando na produção dos hormônios: eritropoietina (estimula a produção de eritrócitos) e renina (manutenção das concentrações de sódio e da pressão arterial), bem como na metabolização da vitamina D, associada ao metabolismo ósseo e à regulação da concentração de cálcio e fósforo no organismo (HARTMANN, 1994). A integridade funcional dos rins é vital para a homeostase corporal, uma vez que esses órgãos desempenham o papel principal na excreção de compostos resultantes do metabolismo e de xenobióticos, bem como na regulação do volume do fluido

extracelular, composição eletrolítica e equilíbrio ácido-base. O glomérulo filtra aproximadamente 20% do sangue que recebe. Cerca de 60 a 80% de todo o soluto e água filtrados no glomérulo são reabsorvidos no túbulo proximal. Agentes tóxicos que provocam danos ao túbulo proximal, com interrupção na produção de energia para os mecanismos ativos de transporte, ou alterações nas funções de enzimas e transportadores de membrana, afetam profundamente a função tubular proximal e conseqüentemente, o rim como um todo (SCHNELLMANN, 2001).

Alguns fármacos podem produzir modificações na função renal ou sobre as condições do parênquima renal, devido à capacidade do rim em concentrar determinados fármacos. O conceito de nefrotoxicidade abrange alterações renais funcionais ou estruturais, decorrentes da ação de substâncias que exercem sua toxicidade no parênquima renal, seja por atingirem alta concentração ou porque o tecido possui características fisiológicas ou bioquímicas que o tornam mais susceptível ao fármaco (GORDON; GATTONE, 1986). Embora constituam apenas 0,5% de toda a massa corporal, os rins recebem cerca de 20 a 25% do fluxo sanguíneo cardíaco e conseqüentemente, qualquer fármaco ou substância química que atinja a circulação sistêmica atingirá os rins em elevadas quantidades. Assim, esse processo que visa a formação de urina concentrada, acaba por concentrar também potenciais toxicantes no fluido tubular. Com a reabsorção da água e eletrólitos, os agentes tóxicos presentes no fluido tubular são concentrados e podem entrar nas células tubulares por difusão passiva. Dessa forma, um xenobiótico presente em concentrações não tóxicas no sangue, atinge concentrações tóxicas nos rins. Assim, o transporte renal, o acúmulo e o metabolismo de xenobióticos contribuem significativamente para a susceptibilidade renal ao dano tóxico. O túbulo proximal é o alvo mais comum dos danos induzidos por agentes tóxicos, devido em

parte, à seletiva capacidade de acumulação de determinados xenobióticos (por exemplo: aminoglicosídeos, cisplatina e metais pesados) nesse segmento do néfron (SCHNELLMANN, 2001).

O rim é um alvo freqüente da ação de radicais livres e intermediários altamente eletrofílicos gerados no metabolismo da maior parte dos fármacos antineoplásicos, dentre os quais, a cisplatina (DAVIES et al., 2001). Os mecanismos de disfunção renal induzida por quimioterápicos geralmente incluem danos vasculares ou estruturais renais (MIYASAKI; KAWAI, 2003). Alguns estudos demonstram que o comprometimento da função renal em sua fase inicial é marcado por severas modificações na hemodinâmica do rim (DAUGAARD et al., 1986). Estas mudanças podem ser devidas em parte a efeitos vasculares reversíveis, mas os mais intrigantes aspectos da fase de iniciação são os danos celulares, particularmente, das células epiteliais tubulares, com conseqüentes distúrbios metabólicos que envolvem: depleção de ATP, acúmulo intracelular de cálcio, geração de radicais livres de oxigênio, ativação da fosfolipase e alterações nos lipídeos da membrana (SADZUKA; SHOJI; TAKINO, 1992; GOLDSTEIN, 1993; BABU et al., 1995).

Uma das manifestações mais freqüentes do dano nefrotóxico é a falência renal aguda, caracterizada por um declínio abrupto na filtração glomerular (SCHNELLMANN, 2001). Um fator comum a todas as formas de comprometimento da função renal, que podem levar à falência renal aguda, é o dano celular envolvendo primariamente as células epiteliais tubulares, no segmento S-2 e S-3 do túbulo proximal, células epiteliais no ramo ascendente da alça de Henle e, possivelmente também, células epiteliais glomerulares e células endoteliais vasculares (GOLDSTEIN, 1993; WERNER; COSTA, 1995).

Danos renais induzidos pela cisplatina

Como muitos outros antineoplásicos, a cisplatina caracteriza-se por possuir baixo índice terapêutico e elevado potencial para produzir efeitos tóxicos (LEE et al., 2001).

A nefrotoxicidade é um efeito adverso comum a certas drogas anticâncer (Tabela 1) e constitui a maior preocupação no tratamento com a cisplatina, limitando sobremaneira a sua utilidade no tratamento antitumoral (FAURSKOV; BJERREGAARD, 1999; KINTZEL, 2001), sendo a maior causa de morbidade crônica e aguda associada à cisplatina e de mortalidade associada à toxicidade (CVITKOVIC, 1998). O rim não é somente o principal responsável pela excreção da cisplatina, mas é também o principal sítio de acúmulo do fármaco (SCHNELLMANN, 2001).

Para minimizar a toxicidade renal e permitir um escalonamento de dose da cisplatina, protocolos de hidratação e diurese são rotineiramente empregados, possibilitando uma redução da exposição renal ao fármaco, não só pela diluição do mesmo, mas também pela diminuição do tempo de trânsito pelos túbulos renais (CORNELISON; REED, 1993; KINTZEL, 2001).

As alterações histopatológicas causadas pela cisplatina incluem a degeneração dos túbulos contornados proximais, de maneira dose-dependente e cumulativa. Assim como alguns metais pesados (cádmio, chumbo, mercúrio), a cisplatina causa encurtamento e danos nas microvilosidades das células do túbulo proximal, com redução da superfície de reabsorção e danos na integridade da membrana das células, o que pode contribuir também para problemas na reabsorção e secreção nestes estados de toxicidade (HERAK-KRAMBERGER; SABOLIC, 2001).

Tabela 1- Drogas anticâncer com nefrotoxicidade inerente (KINTZEL, 2001)

Agentes alquilantes e compostos de platina
cloro-etil-nitroso-uréias
Semustina
estreptozocina
cisplatina
carboplatina
ifosfamida
Antimetabólitos
azacitidina
gencitabina
metotrexato
pentostatina
Outros
diaziquona
interferon- α
mitomicina

O efeito nefrotóxico inicial da cisplatina manifesta-se nos túbulos proximais, seguido de deficiências na filtração glomerular e na função tubular distal. A excreção aumentada de β_2 -microglobulina é um marcador do dano tubular proximal (GRUBB, 1992), enquanto a excreção aumentada de albumina e imunoglobulina G (IgG) estão relacionadas a problemas na filtração glomerular (HOFMAN; ROSSMULLER; GUDER, 1992). Em estudo com 30 pacientes submetidos à quimioterapia com cisplatina observou-se inicialmente significativa elevação da β_2 -microglobulina

urinária, seguida de excreção aumentada de albumina e IgG. Esses achados confirmam o dano tubular proximal seguido de progressiva perda da capacidade de filtração renal em consequência da administração de cisplatina (KINTZEL, 2001)

Uma redução de 20 a 40% na filtração glomerular, assim como aumento nos níveis plasmáticos de uréia e creatinina, são achados comuns após o tratamento com cisplatina. Anormalidades nos níveis de eletrólitos subsequentes à administração de cisplatina ocorrem de forma aguda e podem persistir por anos após o término do tratamento. Um efeito adverso freqüente no tratamento com cisplatina é a hipomagnesemia, a qual está relacionada a doses cumulativas do fármaco. Hipocalcemia também é um efeito adverso comumente relatado (KINTZEL, 2001). O aumento da excreção urinária de sódio e da excreção fracionada de sódio também já foram descritos em ratos (BADARY et al., 2005) e em pacientes (HUTCHISON et al., 1988) tratados com cisplatina, sendo um evento precoce na nefrotoxicidade induzida por este fármaco. Uma possível causa seria a redução da reabsorção de sódio pelo túbulo proximal renal (FIELD et al., 1989). A excreção fracionada do sódio é calculada a partir das concentrações de sódio e de creatinina no sangue e na urina, e reflete a quantidade de sódio realmente excretada com relação àquela filtrada pelos rins, sendo um indicador de dano renal.

O mecanismo pelo qual a cisplatina produz danos celulares não é exatamente conhecido, mas sabe-se que envolve os seus metabólitos e que não se deve ao átomo de platina em si, pois embora gere concentrações similares de platina nos rins, o isômero trans da cisplatina não é nefrotóxico. O efeito antitumor da cisplatina e talvez a sua nefrotoxicidade estão relacionados aos metabólitos produzidos por hidrólise intracelular, capazes de alquilar bases de purina e pirimidina (Figuras 2 e 3). Vários estudos sugerem que a nefrotoxicidade da cisplatina esteja vinculada à

sua capacidade de inibir a síntese de DNA bem como funções de transporte (SCHNELLMANN, 2001).

Mitocôndria e morte celular por apoptose

Muitos processos celulares dependem do ATP mitocondrial, podendo ser comprometidos em consequência de alterações na respiração celular. Numerosos agentes tóxicos causam diferentes tipos de disfunção mitocondrial e, independentemente dessa ação sobre a mitocôndria ser direta ou indireta, a mitocôndria tem um papel crucial na morte celular por apoptose ou necrose (SCHNELLMANN, 2001).

A inibição da fosforilação oxidativa resulta na abertura de um poro de transição de permeabilidade de alta condutividade, que aumenta abruptamente a permeabilidade da membrana mitocondrial interna a solutos de massa molecular até 1500 Da. A progressão à morte celular por apoptose ou necrose, depende, pelo menos em parte, do efeito da permeabilidade mitocondrial transitória nos níveis de ATP. Se há depleção de ATP, ocorre morte celular por necrose. Quando os níveis de ATP são mantidos pelo menos parcialmente, ocorre morte por apoptose (LEMASTERS et al., 1999). A liberação de citocromo c subsequente à transição de permeabilidade mitocondrial, exerce papel fundamental na ativação das caspases que resulta na apoptose (SCHNELLMANN, 2001).

Em geral, quando o agente tóxico está presente no meio biológico em concentrações capazes de provocar lesões celulares intensas ou grandes perturbações ao meio celular, a célula morre por necrose. No entanto, acredita-se que essas sejam condições extremas e que na maioria das vezes as células afetadas sejam removidas por apoptose. Na atualidade, acredita-se que a apoptose

é a principal forma de morte celular em decorrência de processos fisiopatológicos e que a necrose ocorre muito raramente, somente em situações em que se observam extremos danos celulares (RAFFRAY; COHEN, 1997).

A apoptose é uma forma de morte celular com características bioquímicas e morfológicas próprias, que ocorre após um processo ativo associado à diminuição do tamanho da célula, condensação nuclear, liberação do citocromo c pela mitocôndria, ativação de caspases, seguida de invaginação da membrana plasmática com conseqüente exteriorização da fosfoserina inicialmente intracelular, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, que são assimilados e degradados por células vizinhas (THOMPSON, 1995; WILSON, 1998). A condensação nuclear associada a apoptose é comumente acompanhada da ativação de nucleases, que primeiramente degradam o DNA cromossomal em subunidades características de 50-300kb e então em unidades menores de 180 pares de bases (WYLLIE, 1980). Devido ao fato da integridade da membrana plasmática ser mantida durante a apoptose, não ocorre liberação significativa do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular, o que torna essa forma de morte celular não associada ao processo inflamatório. Ao contrário da apoptose, a necrose é uma forma passiva de morte celular associada à inflamação, freqüentemente resultante de um dano celular accidental que causa inchaço celular e de organelas, rompimento da membrana plasmática, liberação de enzimas dos lisossomos e vazamento do conteúdo da célula para o meio extracelular (TRUMP; BEREZESKY, 1995).

Já foi demonstrado que os níveis intracelulares de ATP constituem um fator determinante do tipo de morte celular (LEIST et al., 1997; NICOTERA; LEIST; FERRANDO-MAY, 1998). Leist et al. (1997) demonstraram que diferentes aspectos

do programa de morte celular podem ser bloqueados pela manipulação dos níveis intracelulares do ATP.

Muitos estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, têm demonstrado a liberação do citocromo c durante a apoptose (YANG et al., 1997; KLUCK et al., 1997). Uma vez no citosol, o citocromo c interage com o fator protease ativador de apoptose-1 (Apaf-1) e com a pro-caspase-9 formando o complexo apoptossoma. O resultado é a ativação da pro-caspase-9 e de outras pro-caspases, as quais são responsáveis pelo estágio executor da morte celular por apoptose (LI et al., 1997; GREEN; REED, 1998).

O citocromo c é um componente da cadeia transportadora de elétrons e está envolvido na produção do ATP. Faz parte do complexo III, também chamado ubiquinona-citocromo c oxiredutase. O complexo III funciona como uma bomba de prótons em razão da sua orientação assimétrica. Especificamente, o citocromo c participa do transporte de elétrons entre os complexos III (citocromo bc₁ ou ubiquinona:citocromo c oxiredutase) e IV (citocromo oxidase). O apo-citocromo c é codificado por um gene nuclear e sintetizado no citosol. Ocupa o espaço intermembranas em uma conformação não enovelada e recebe um grupamento heme (CROMPTON, 1999). A ligação covalente desse grupamento heme estimula uma alteração conformacional, originando o holo-citocromo c, o qual atua como componente da cadeia transportadora de elétrons. É importante observar que somente o holo-citocromo, e não o apo-citocromo c, é capaz de provocar a ativação da pro-caspase-9 (YANG et al., 1997).

Com relação a nefrotoxicidade da cisplatina, a morte por necrose é associada a altas doses enquanto concentrações menores induzem a apoptose (LAU, 1999). Numerosos estudos têm demonstrado que a cisplatina pode induzir a apoptose em

células tubulares renais tanto em modelos animais quanto em sistemas celulares (MEGYESI; SAFIRSTEIN; PRICE, 1998).

A apoptose é responsável pela nefrotoxicidade, ototoxicidade e outros efeitos adversos inerentes a essas drogas (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003). Segundo alguns autores (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003), cisplatina, carboplatina e oxaplatina induzem apoptose de células tumorais, por mecanismos via receptor de morte celular, bem como por via mitocondrial (Figura 5). Em estudo mais recente, Wang et al. (2006) propõem que a atividade pró-apoptótica de agentes quimioterapêuticos, dentre eles a cisplatina, ocorre independentemente da mediação pelos receptores de morte da membrana celular, ressaltando o papel fundamental da via mitocondrial na morte celular por apoptose induzida por esses fármacos.

Diversos estudos já demonstraram que algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) são capazes de induzir diretamente a apoptose, tais como: baixas doses de H_2O_2 (ZETTL et al., 1997), $O_2^{\bullet-}$ (JABS; DIETRICH; DANG, 1996), $OH^{\bullet}$ (JACOBSON; RAFF, 1995) e peróxidos de lipídeos (SANDSTROM et al., 1994). A mais importante defesa contra as lesões oxidativas induzidas pelas espécies reativas de oxigênio é a manutenção da homeostase da glutathiona. A glutathiona reduzida (GSH) serve como substrato para a ação da glutathiona peroxidase na remoção da H_2O_2 . Devido ao seu caráter redutor, a GSH atua também na regulação intracelular dos tióis dissulfeto, incluindo aqueles das enzimas glicolíticas e da Ca^{+2} -ATPase (BENZI; MORETTI, 1995). A ação de glutathiona peroxidase leva à produção da glutathiona dissulfeto (GSSG) ou glutathiona oxidada. A GSSG é tóxica para a célula pela formação de derivados cisteinil, especialmente na presença de metais de transição (JENNER, 1994). Outras indicações foram obtidas com agentes

promotores de oxidação celular, tais como a proteína β amilóide (BEHL et al., 1994), hipóxia induzida pelo cianeto (MILLS et al., 1996) e radiação UV (GORMAN; MCGOWAN; COTTER, 1997). Da mesma forma, em situações em que haja redução na capacidade celular de eliminar espécies reativas de oxigênio, por exemplo, tratando-se fibroblastos com butionina sulfoxamina, que causa inibição da síntese de glutathiona intracelular, observa-se um grande incremento no número de células que morrem por apoptose (ZUCKER; HANUSCH; BAUER, 1997). Resultados parecidos foram obtidos com células neuronais (FROISSARD; MONROCQ; DUVAL, 1997).

Figura 5. Duas vias apoptóticas propostas para a morte celular induzida pela cisplatina. ERO= espécies reativas de oxigênio; casp= caspase; cito c =citocromo c . A via por receptores de morte celular é mostrada em verde e a via mitocondrial é mostrada em rosa. Todas as setas indicam influência estimulatória, com exceção da seta azul (Bcl₂), que é inibitória (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003).

A importância da mitocôndria e a formação das ERO

Em organismos aeróbicos, o metabolismo de carboidratos, lipídios e aminoácidos convergem para uma etapa final que envolve a doação dos elétrons removidos desses nutrientes para o oxigênio. Este processo ocorre na cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória) mitocondrial, gerando água e liberando energia. A energia liberada é conservada primeiramente na forma de um gradiente transmembrana de prótons e, posteriormente, na forma de ATP, sintetizado via fosforilação oxidativa (MITCHELL, 1966). O ATP formado pela fosforilação oxidativa é a principal fonte de compostos fosfatados ricos em energia dos organismos aeróbicos, sendo essencial para a manutenção de atividades celulares dependentes de energia, como a contração muscular, formação de impulsos nervosos, transporte iônico e síntese de macromoléculas. Além da fosforilação oxidativa a mitocôndria exerce um papel central na regulação da sinalização por Ca^{+2} , na produção de radicais livres e na liberação de fatores indutores de apoptose (SARASTE, 1999; DZEJA et al., 2000). Através de uma dinâmica comunicação por “feedback”, as funções mitocondriais são fortemente integradas aos processos celulares assegurando a homeostase iônica e energética. Assim sendo, da mitocôndria dependem processos vitais para a célula, responsáveis não apenas pela sobrevivência, mas também pela longevidade celular (DZEJA et al., 2001).

Falhas do metabolismo energético mitocondrial estão associadas à morte celular relacionada a doenças metabólicas, doenças neurodegenerativas, ao envelhecimento e aos processos de toxicidade induzida por xenobióticos. Por outro lado, alterações do metabolismo energético podem promover a falha de eliminação de células indesejadas ou seu crescimento desordenado, levando ao desenvolvimento de tumores e doenças auto-imunes (ARCH; THOMPSON, 1999).

A produção de ERO por mitocôndrias é um evento fisiológico e contínuo em condições aeróbicas. Apesar do funcionamento da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ter um importante papel na síntese de ATP, por meio do potencial eletroquímico de prótons gerado, a cadeia respiratória mitocondrial produz ERO constantemente. O ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é gerado principalmente pela NADH desidrogenase ou Complexo I, pela succinato desidrogenase ou Complexo II e pela ubiquinona-citocromo c oxidoredutase ou Complexo III (Figura 6) (BOVERIS; CHANCE, 1973; TURRENS; BOVERIS, 1980; ZHANG; YU; YU, 1998). A produção de $O_2^{\bullet-}$ no complexo I pode ser promovida pela presença de substratos respiratórios que geram NADH, como o malato, o glutamato e o piruvato (TURRENS; BOVERIS, 1980), e estimulada por rotenona, um inibidor da transferência de elétrons entre o complexo I e a coenzima Q (SKULACHEV, 1996; VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2001). A coenzima Q também promove a geração de $O_2^{\bullet-}$ pelo complexo I (TURRENS, 1997). O vazamento de elétrons, no nível da coenzima Q/complexo III, é estimulado por succinato, cianeto e antimicina A (BOVERIS; CHANCE, 1973; TURRENS, 1997; KOWALTOWSKI; NETTO; VERCESI, 1998). O efeito estimulatório da antimicina A é relacionado ao acúmulo de radicais semiquinona, formados na face citosólica da membrana mitocondrial interna. O mixotiazol, um inibidor do complexo III mitocondrial, bloqueia a formação de radicais semiquinona na face citosólica da membrana interna mitocondrial, prevenindo a geração de radicais $O_2^{\bullet-}$ (TURRENS, 1997; KOWALTOWSKI; NETTO; VERCESI, 1998). Em condições normais, o $O_2^{\bullet-}$ é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é reduzido a H_2O pela glutathiona peroxidase, consumindo glutathiona reduzida (GSH), a qual é mantida neste estado pela glutathiona redutase, que utiliza NADPH. Assim, a mitocôndria possui um sistema antioxidante eficiente composto

por GSH, SOD, NADPH, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRd), além de vitaminas C e E (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). O Ca^{2+} pode estimular a geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (KOWALTOWSKI; VERCESI; FISKUM, 2000). O Ca^{2+} intramitocondrial liga-se a cardiolipinas na face interna da membrana mitocondrial interna, causando alterações ultra-estruturais da cadeia respiratória mitocondrial que facilitam a produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e, conseqüentemente, de H_2O_2 (GRIJALBA; VERCESI; SCHEREIER, 1999). As cardiolipinas (únicos lipídeos aniônicos presentes na mitocôndria) possuem cabeça polar eletronegativa e estão presentes em altas concentrações na membrana mitocondrial interna. Simultaneamente, o Ca^{2+} mobiliza o Fe^{2+} na matriz mitocondrial, o que estimula a reação de Fenton e a produção do radical hidroxil ($\text{OH}^{\bullet}$), que ataca tióis de proteínas, lipídios e DNA mitocondrial (CASTILHO et al., 1995; VERCESI et al., 1997).

Figura 6. Sítios de formação de superóxido na cadeia respiratória. Vários complexos respiratórios deixam vaziar elétrons, produzindo anion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Essas espécies podem ser convertidas em H_2O_2 , que por sua vez podem ser parcialmente reduzidos produzindo radicais hidroxil ($OH^{\bullet}$) através de uma reação catalizada por metais de transição (Reação de Fenton). Os radicais hidroxil constituem um dos mais fortes oxidantes da natureza e reagem indiscriminadamente com ácidos nucleicos, lipídeos e proteínas. SOD = superóxido dismutase (TURRENS, 2003).

Estresse oxidativo resultante da exposição a xenobióticos

Estresse oxidativo é uma expressão usada para descrever vários processos deletérios resultantes de um desequilíbrio entre a formação excessiva de ERO e uma limitada defesa antioxidante. Pequenas flutuações na concentração desses oxidantes exercem um papel na sinalização intracelular, enquanto aumentos descontrolados dessas espécies reativas de oxigênio conduzem a reações em cadeia com proteínas, lipídeos, polissacárides e DNA (DROGE, 2002).

Alguns toxicantes podem danificar diretamente a mitocôndria, produzindo uma depleção rápida de ATP e morte celular não apoptótica (necrose). Outros podem

provocar dano indireto, como por exemplo, a liberação de citocromo c, e conseqüentemente, ativação da via apoptótica (SQUID et al., 2003).

Muitos xenobióticos interagem com a cadeia mitocondrial transportadora de elétrons, aumentando a quantidade de $O_2^{\bullet}$ produzido por diferentes mecanismos. Alguns compostos estimulam o estresse oxidativo por bloquear o transporte de elétrons na cadeia respiratória, aumentando o nível de redução dos transportadores subseqüentes; outros xenobióticos podem aceitar um elétron de um transportador da cadeia eletrônica e transferí-lo para o oxigênio molecular (ciclo redox), estimulando a formação de $O_2^{\bullet}$ sem que haja inibição da cadeia respiratória (TURRENS, 2003).

Homeostase Intracelular do Cálcio

O cálcio exerce um importante papel regulador das funções mitocondriais e constitui um estímulo fisiológico para a síntese de ATP. Por outro lado, a quebra da homeostase do cálcio está envolvida em diversas patologias. Um aumento do cálcio na matriz mitocondrial leva a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, estimulando a formação do poro de transição mitocondrial, a liberação do citocromo c, e finalmente apoptose (BROOKES et al., 2004).

O aumento do cálcio citosólico é seguido de um aumento do cálcio intramitocondrial, evento envolvido no dano e morte celular. Diversos estudos têm demonstrado que as alterações na homeostase intracelular do cálcio são freqüentes em células que sofrem apoptose. Os autores Zhang e Lindup (1994) propõem que é fundamental definir se a depleção de GSH e de grupamentos $-SH$ de proteínas mitocondriais, poderiam aumentar a liberação de cálcio pela mitocôndria, uma vez que a atividade da Ca^{+2} -ATPase, responsável pelo transporte de cálcio, é modulada pelo estado redox das proteínas sulfidríla e a oxidação desses grupos prejudica a

captação de cálcio pela membrana celular ou pelo retículo endoplasmático. A regulação das interações entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria no controle do cálcio intracelular livre é importante no controle de muitas funções celulares, especialmente aquelas envolvidas com a morte celular (BOWSER et al., 2002). O mecanismo pelo qual o cálcio liberado pela mitocôndria, eventualmente, não é captado pelo retículo endoplasmático não é exatamente conhecido. Um dos mecanismos propostos para explicar a quebra da homeostase intracelular do cálcio sugere que a ativação da TPM (transição da permeabilidade mitocondrial), está relacionada à ativação de fatores indutores da apoptose, o que funcionaria como um gatilho para a ativação das caspases e a iniciação do processo apoptótico (KANNAN; JAIN, 2000; BOWSER et al., 2002). O aumento da TPM está também associado à liberação do Fator Indutor de Apoptose (FIA), o qual foi identificado e caracterizado como uma proteína de aproximadamente 50 kDa, localizado na membrana interna mitocondrial. Ainda não está claro se a liberação do FIA e do citocromo c estão relacionados ou se ocorrem como eventos bioquímicos isolados (KANNAN; JAIN, 2000). A elevação do cálcio intracelular estimula a ativação da Ca^{+2} -ATPase, localizada no retículo endoplasmático e na membrana celular e deste modo remove o excesso de cálcio para o espaço citosólico. Contudo, quando a liberação se torna excessiva, um fator desconhecido ativa os receptores IP 3 (inositol trifosfato) da membrana mitocondrial, e a ativação desses receptores conduz a uma adicional liberação de cálcio, que vai culminar com a morte celular por apoptose (BOWSER et al., 2002).

Substâncias Protetoras : Antioxidantes

O termo antioxidante refere-se a uma grande variedade de compostos com mecanismos de ação distintos. Segundo Halliwell (1997), “antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda significativamente ou impede a oxidação desse substrato”. A célula possui abundância de substratos oxidáveis, como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. Assim, os antioxidantes agem prevenindo a formação ou detoxificando os radicais livres e seqüestrando as espécies reativas de oxigênio (ERO) ou seus precursores.

Além das defesas naturais do organismo, as quais incluem glutathione redutase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase, determinadas vitaminas (ácido ascórbico, α tocoferol, β caroteno), compostos inorgânicos (selênio), compostos sintéticos (hidroxi anisol butilado - BHA, hidróxi tolueno butilado - BHT) e muitos polifenóis derivados de plantas, também apresentam ação antioxidante (SHEU; NAUDURI; ANDERS, 2006).

A quimioterapia com cisplatina provoca uma diminuição dos níveis plasmáticos de vários antioxidantes (vitamina C, vitamina E, ácido úrico e ceruloplasmina), provavelmente devido à indução de estresse oxidativo por este fármaco, bem como devido a perdas renais de antioxidantes de pequeno peso molecular solúveis em água, como é o caso do ácido úrico. Esta situação conduz a uma menor proteção contra o estresse oxidativo gerado pela quimioterapia e conseqüentemente a maiores danos oxidativos em tecidos normais, como as células do túbulo proximal renal (WEIJL et al., 1998).

Antioxidantes têm sido usados para aumentar a eficácia de agentes terapêuticos anticâncer por ter a capacidade de reduzir seus efeitos adversos nas células normais (LAMSON; BRIGNALL, 1999).

O agente citoprotetor ideal seria aquele capaz de permitir a intensificação da dose dos quimioterápicos; conferindo proteção específica aos tecidos normais e preservando o efeito antitumoral, além de apresentar pequena e/ou controlável toxicidade (SOUZA et al., 2000).

A dimetiltiourea ou DMTU (Figura 7) é um potente antioxidante cujo mecanismo de ação se dá principalmente pelo seqüestro de radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), e por esta razão tem sido utilizado na investigação do envolvimento destes radicais em diversos modelos experimentais de doenças humanas (ROYCHOUDHURY et al., 1996; BALIGA et al., 1998; CAMERON et al., 2001; BAEK et al., 2003). Já foi demonstrado que o DMTU também possui atividade seqüestradora de HOCl (ácido hipocloroso), produzido pela mieloperoxidase neutrofílica (WASIL et al., 1987). O DMTU praticamente não possui atividade sobre o $\text{O}^\bullet$ e sequestra H_2O_2 muito lentamente, enquanto o seqüestro de radicais hidroxila se dá muito eficazmente. Assim sendo, a utilização do DMTU é útil na investigação do envolvimento de espécies reativas de oxigênio, particularmente dos radicais hidroxila em processos fisiopatológicos (FOX, 1984).

Os radicais hidroxila são espécies de oxigênio altamente reativas, produzidas a partir da reação de H_2O_2 com metais de transição, especialmente íons ferrosos, via reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$), ou a partir do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$, via reação de Haber-Weiss ($\text{O}_2^{\bullet-} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{OH}^\bullet + \text{H}_2\text{O}$) (BALIGA et al., 1999).

Figura 7 – Dimetiltiouréia ($C_3H_8N_2S$) – DMTU (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary>)

Uso clínico da cisplatina e perspectivas futuras

A prevenção da nefrotoxicidade é considerada de grande importância clínica na quimioterapia com cisplatina (SUEISHI et al., 2002). Muitos análogos de platina têm sido sintetizados e testados como agentes antineoplásicos na tentativa de superar as limitações de uso da cisplatina e aumentar o espectro de tumores tratáveis. Porém dentre todos esses compostos apenas dois obtiveram aprovação do FDA, a carboplatina e a oxaliplatina, eficazes somente para um pequeno espectro de tumores (WANG; LIPPARD, 2005; BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003). Muitos agentes citoprotetores (seqüestradores de radicais livres e antioxidantes) também têm sido desenvolvidos para proteger as células normais da ação tóxica da quimioterapia, porém eles próprios apresentam importantes efeitos adversos, como é o caso da amifostina (Ethiol®) e do dietilditiocarbamato utilizados para reduzir a nefrotoxicidade cumulativa associada à administração da cisplatina. Estudos indicam que o tiosulfato de sódio, outro antídoto aos efeitos adversos da cisplatina, interfere na sua atividade antitumoral (SOUZA et al., 2000; KINTZEL, 2001, CONKLIN, 2004).

Assim, entender os mecanismos pelos quais a cisplatina age e exerce seus efeitos adversos, bem como o mecanismo de ação dos possíveis agentes citoprotetores é condição importante para o desenvolvimento de novos complexos

de platina e de agentes capazes de minimizar a nefrotoxicidade, fator limitante primário na terapia do câncer com cisplatina.

Como a mitocôndria é o principal alvo de muitas drogas anticâncer, incluindo os compostos de platina (SQUID et al., 2003), tornam-se necessários estudos que possibilitem diminuir as muitas dúvidas existentes sobre: o impacto do estresse oxidativo na eficácia da quimioterapia do câncer; a importância do estresse oxidativo no desenvolvimento de efeitos adversos provenientes do tratamento com agentes anticâncer; bem como o efeito dos antioxidantes na atividade antineoplásica e no desenvolvimento dos efeitos adversos induzidos pela quimioterapia (CONKLIN, 2004).

O mecanismo molecular pelo qual a cisplatina induz danos renais e os métodos efetivos para a prevenção deste efeito ainda são objetos de estudo. A elucidação do papel do estresse oxidativo e do estado redox mitocondrial na apoptose pode contribuir para o aumento da eficácia da quimioterapia, conduzindo a estratégias que possibilitem o uso de antioxidantes para conter os danos causados pelas ERO e a inibição dos mecanismos apoptóticos ativados pela cisplatina especialmente nas células renais (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; KADIKOYLU et al., 2004).

No presente estudo investigou-se o envolvimento dos danos oxidativos mitocondriais renais (função, estresse oxidativo e estado redox) e da apoptose, na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos. A função mitocondrial foi avaliada através de ensaios de consumo de oxigênio, potencial de membrana, transporte de cálcio e determinação de ATP. O estresse oxidativo foi avaliado por ensaios envolvendo lipoperoxidação, oxidação de cardiolipina e de proteínas sulfidrila, formação de proteínas carboniladas e atividade da aconitase. O estado redox

mitocondrial foi avaliado por ensaios de oxidação de NADPH e de GSH. A ocorrência de apoptose foi investigada através dos níveis de atividade da caspase-3. A dimetiltiouréia (DMTU) foi utilizada como droga modelo na avaliação do efeito da terapia antioxidante na prevenção dos danos oxidativos mitocondriais renais e da morte celular por apoptose decorrentes da administração da cisplatina em ratos.

OBJETIVOS

II - OBJETIVOS

- ♦ Estudar os mecanismos moleculares envolvidos no dano mitocondrial renal induzido pela cisplatina em rato.
- ♦ Investigar o possível efeito protetor da terapia antioxidante com relação à citotoxicidade induzida pela cisplatina em mitocôndria de rim de rato, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nesta proteção.

MATERIAIS E MÉTODOS

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Reagentes

Cisplatina (cis-diaminoplatina (II) dicloreto), dimetiltiouréia (DMTU), rotenona, rodamina 123, ADP e NADPH foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, USA). Tiopental sódico (Thiopentax ®) foi obtido da Cristália - Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (Itapira, SP, Brasil). Heparina (Liquemine®) foi obtida da Roche (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os demais reagentes usados foram grau analítico P.A.. Metanol grau HPLC foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). Para o preparo das soluções foi utilizada água do Tipo I (ultra pura) obtida em sistema de purificação Milli-Q Gradiente (Millipore, Bedford, USA). As soluções de cisplatina e de DMTU foram preparadas em solução salina isotônica (NaCl 0,9%).

2 - Animais

Os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do *Campus* de Ribeirão Preto – USP, por estarem de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação Animal” (Protocolo nº05.1.1068.53.5).

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, pesando 200-220 g, obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os animais foram alojados em gaiolas mantidas em salas com temperatura ambiente controlada (22-24°C), com ciclos de 12 horas de claro e escuro. Água e ração padrão foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Os animais foram divididos em 4 grupos e submetidos aos seguintes tratamentos:

I- **Grupo controle** (n=8): uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina isotônica (1 ml/100g, i.p.);

II- **Grupo cisplatina** (n=8): uma injeção de cisplatina (10 mg/kg, i.p.);

III- **Grupo DMTU** (n=8): uma injeção de DMTU (500 mg/kg, i.p.), seguido de duas injeções diárias de DMTU (125 mg/Kg, i.p.);

IV- **Grupo DMTU+cisplatina** (n=8): uma injeção de DMTU (500 mg/kg, i.p.), imediatamente antes da injeção de cisplatina (10 mg/Kg, i.p.) e posteriormente duas injeções diárias de DMTU (125 mg/Kg, i.p.).

O volume de todas as soluções injetadas foi sempre equivalente a 1ml para cada 100 g de peso corporal. Os animais foram sacrificados 72 horas após o início do tratamento.

3 - Isolamento da fração mitocondrial

Decorridas 72 horas do início do tratamento, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de 60 mg de tiopental sódico/kg de peso (BERRY; EDWARDS; BARRITT; 1991) e sacrificados por decapitação. Foi coletado sangue utilizando-se heparina (liquemine®) como anticoagulante. A cavidade abdominal foi aberta e os rins imediatamente retirados, imersos em solução salina fisiológica mantida em banho de gelo, e cortados em pequenos fragmentos. O córtex foi cuidadosamente separado da medula e homogeneizado em meio composto de sacarose 250 mM, EGTA 1 mM, albumina bovina sérica 0,2% e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, na proporção de 1 g de tecido para 10 ml de meio. Para tal utilizou-se

homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (três ciclos de 15 segundos intercalados com 1 minuto de repouso).

Para isolamento das mitocôndrias foi utilizado o método de centrifugação diferencial de Pedersen et al. (1978). Os homogenatos foram centrifugados a $755 \times g$ por 5 minutos, o sobrenadante foi separado e centrifugado a $13.300 \times g$ por 10 minutos. O precipitado (fração mitocondrial) foi então retomado com 10 ml do meio de lavagem (sacarose 250 mM, EGTA 0,1 mM, albumina bovina sérica 0,14%, e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4) e novamente centrifugado a $13.300 \times g$ por 10 minutos. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. O precipitado obtido foi retomado com 1 ml do meio de ressuspensão (KCl 160 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4), sendo sempre mantido em banho de gelo e utilizado na realização dos ensaios em um prazo máximo de 3 horas. Todos os ensaios com a fração mitocondrial foram realizados em triplicata.

4 - Determinação da Proteína Mitocondrial

Foi empregado o método descrito por Cain e Skilleter (1987), o qual se baseia na complexação de ligações peptídicas com íons cúpricos, em meio alcalino, dando origem a um complexo com tonalidade violeta, monitorado a 540 nm.

Uma alíquota de 25 µl da suspensão mitocondrial foi adicionada de 0,1 ml de deoxicolato sódico 5% e 1,5 ml de água. Após agitação adicionou-se 1,5 ml do reagente biureto composto de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,15%) e tartarato de sódio e potássio (0,6%) em NaOH (0,75M). Após 30 minutos a leitura foi efetuada a 540 nm em espectrofotômetro Hitachi modelo U-3000. A concentração de proteína foi determinada com base em uma curva padrão preparada com soro albumina bovina, contendo 0,1; 0,2; 0,5 e 1,0 mg de albumina por ml de solução.

5- Avaliação da Função Mitocondrial

5.1- Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi analisado polarograficamente, a 30°C, em um oxígrafo equipado com um eletrodo de Clark (Gilson Medical Eletronics, USA), em um volume final de 1,5 ml. As mitocôndrias (1 mg de proteína mitocondrial) foram energizadas com succinato de potássio 10 mM (+ rotenona 5µM) em um meio de respiração contendo KCl 160 mM, fosfato de potássio 8,5 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4. A respiração do estado 3 foi iniciada com 0,4 µmol de ADP (SANTOS et al., 1997). A capacidade fosforilativa, representada pela razão ADP/O e pela Razão de Controle Respiratório (RCR), bem como o consumo de O₂ nos estados 3 e 4 da respiração foram determinados a partir do traçado polarográfico, de acordo com o método descrito por Chance e Williams (1956).

5.2 - Potencial de membrana mitocondrial

O potencial elétrico da membrana mitocondrial interna foi avaliado pelo monitoramento da captação da rodamina 123. As mitocôndrias (1 mg/ml de proteína) foram ensaiadas a 30°C em meio constituído de: KCl 160 mM, fosfato de potássio 8,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, acrescido de 5 µM de rotenona e 5 µM de rodamina 123. A formação do potencial de membrana foi induzida com 10 mM de succinato de potássio. Transcorridos aproximadamente 4 minutos, a reação foi iniciada com 0,4 µmol de ADP. O desacoplador FCCP (40 nM) foi utilizado para despolarizar a membrana mitocondrial interna. A análise foi realizada em um espectrofotômetro de fluorescência operando em 503 nm (excitação) e 527 nm (emissão), com fenda 5,0 nm (EMAUS; GRUNWALD; LEMASTERS, 1986).

5.3- Transporte de Cálcio

A captação de cálcio pelas mitocôndrias foi estimada pela variação na absorbância do arsenazo III, um indicador do cálcio livre, em 2 comprimentos de onda: 675nm e 685nm, sendo utilizada nos cálculos a diferença das duas absorbâncias. Foi utilizado um meio de incubação composto de: KCl 160 mM, HEPES-KOH 10 mM, rotenona 5 μ M, cálcio 20 μ M e arsenazo III 25 μ M, pH 7,4. Utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial em 2 ml do meio de incubação. O ensaio foi realizado a 30°C e a captação de cálcio foi induzida pela adição de succinato de potássio 10 mM (SCARPA, 1979).

5.4- Determinação de ATP

Uma porção de aproximadamente 100 mg do rim foi homogeneizada com 2 ml de HClO₄ 1M em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (três ciclos de 15 segundos intercalados com 1 minuto de repouso), submetida a banho de ultrassom por 30 min e centrifugada a 15.800 x g por 5 min. O sobrenadante (100 μ l) foi neutralizado com 70 μ l de KOH 2M e 830 μ l de tampão TRIS-HCl 100 mM (pH 7.8) e novamente centrifugado a 15.800 x g por 10 min. Uma alíquota de 25 μ l do sobrenadante foi então analisada por HPLC em um sistema cromatográfico Shimadzu composto de uma bomba LC-10A, um detector UV/Vis SPD -10A, operando em 254 nm e um auto-injetor SIL-10A. Foi utilizada uma coluna Superspher[®]/RP-18 endcapped/250 x 4 e uma fase móvel composta de tampão fosfato 100 mM, pH 5 e metanol (99:1, v/v) , com fluxo de 0,8 ml / min. Uma curva de calibração preparada em tampão fosfato 100 mM, pH 5 e submetida aos mesmos procedimentos descritos para as amostras foi utilizada como referência para o

cálculo da concentração de ATP (STOCCHI et al., 1985; NERI et al., 1986, NAKAGAWA; TAYAMA, 1998; VAN HOORN et al., 2003).

6 - Estudos envolvendo Estresse Oxidativo e Estado Redox Mitocondrial

6.1 - Lipoperoxidação da membrana mitocondrial

Malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2(E)-nonenal (4-HNE) foram determinados espectrofotometricamente com a utilização do kit comercial “Lipid Peroxidation Assay” (Cat.nº 437634, Calbiochem). MDA e HNE reagem com um reagente cromogênico (N-metil 2 fenil indol), produzindo um cromóforo estável com absorbância máxima em 586 nm. Foi utilizado um espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3000 e utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial no ensaio.

6.2 – Oxidação da cardiolipina

Os níveis de cardiolipina foram determinados usando-se o corante específico 10-*N*-nonil-acridine orange (NAO). A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína) foi incubada a 30 °C por 45 minutos, na presença de 10-*N*-nonil-acridine orange 5 µM, em um meio composto de KCl 160 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4. O excesso de corante foi retirado por centrifugação e o precipitado foi retomado no mesmo meio. A fluorescência foi determinada em um fluorímetro Hitachi, modelo F-2500, operando em 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão). A fluorescência foi convertida em unidades de fluorescência relativa usando-se quinina como referência (1 mg/ml em H₂SO₄ 0.1N, comprimento de onda de excitação = 360 nm e de emissão = 457 nm) (PETIT et al., 1992; GALLET et al., 1995).

6.3 – Oxidação de proteínas sulfidrila (P-SH)

As proteínas da suspensão mitocondrial (4 mg) foram precipitadas com 500 µl de ácido sulfosalicílico 2% (m/v) e centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos. O precipitado obtido foi retomado com 800 µl de guanidina 6M, pH 6,0. As leituras foram determinadas a 412 nm e 530 nm, antes e após a adição de 50 µl de DTNB 10mM (ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzóico]), solubilizado em metanol. As concentrações de P-SH foram calculadas com base em uma curva padrão preparada com glutathione reduzida (GSH) (GRATTAGLIANO et al., 1996).

6.4 – Formação de proteínas carboniladas

A suspensão mitocondrial (2 mg de proteína mitocondrial) foi tratada com 1 ml de DNPH 2% em HCl 2 N. Após 1 hora de incubação a 25°C foram adicionados 200 µl de TCA 50%. O precipitado foi lavado 3 vezes com etanol/acetato de etila (1:1, v/v) e 3 vezes com TCA 10%. O precipitado final foi dissolvido em 2 ml de guanidina 6 moles/L. A absorbância foi monitorada a 345-370 nm e utilizou-se como branco uma solução de HCl 2N. Para determinação da concentração foi utilizado o coeficiente de extinção molar de 21,5 nmol/L-1 x cm-1 (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

6.5 - Atividade da aconitase

A enzima aconitase catalisa a interconversão do L-citrato a isocitrato, via *cis* aconitato (**L-citrato** ↔ ***cis*-aconitato (λ 240nm)** ↔ **isocitrato**). A atividade da aconitase foi determinada com base na formação do produto intermediário *cis*-aconitato.

A reação enzimática foi iniciada adicionando-se 30 µl da suspensão mitocondrial em 1 ml de tampão contendo L-citrato 1mM e trietanolamina -HCl

20mM, pH 7,5. A absorbância a 240nm, a 30°C, foi monitorada por 5 minutos em espectrofotômetro Shimadzu, modelo MultiSpec 1501. A atividade da aconitase foi expressa através da formação de nmol cis-aconitato/mg proteína/min e foi calculada usando-se o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $3,7 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (ZHENG; SEAN; GRAZIANO, 1998).

6.6 - Oxidação de NADPH

A oxidação dos nucleotídeos de piridina foi monitorada fluorimetricamente, a 450 nm, com excitação a 340 nm, de acordo com método descrito por Lund, Miller e Woods (1993). Foi utilizado 1 mg de proteína mitocondrial / ml de um meio composto de sacarose 250mM e TRIS-HCl 10mM, pH 7,4.

6.7 - Glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG)

Foi utilizado o método enzimático cíclico proposto por Tietze (1969) com algumas modificações. Suspensão mitocondrial (1 mg de proteína) foi tratada com 500 μl de HClO_4 (ácido perclórico) a 6% e centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos. Na determinação da GSH, uma alíquota de 50 μl do sobrenadante foi adicionada em uma cubeta a 500 μl de um meio composto de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,2 ; EDTA 1 mM e NADPH 0,3 mM e 50 μl de DTNB 10mM (5,5-ditiobis [2- ácido nitrobenzóico]). Após 5 minutos a 30°C, a reação foi iniciada com 100 μl de glutathiona redutase (5 U/ml) e a absorbância foi monitorada em 412 nm durante 5 minutos. Para determinação da GSSG, 200 μl do sobrenadante foram adicionados de 100 mg de carbonato de sódio e 4 μl de 2-vinilpiridina. Após 1 hora de incubação ao abrigo da luz, a mistura foi centrifugada a $3000 \times g$ por 5 minutos e 100 μl do sobrenadante foram submetidos ao procedimento acima descrito para o ensaio da

GSH. As concentrações de GSH e GSSG foram calculadas a partir de uma curva de calibração obtida nas mesmas condições experimentais.

7 - Avaliação da apoptose

7.1 - Atividade da caspase 3

O homogenato dos rins foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante obtido foi diluído à uma concentração de 2 mg de tecido por ml de um meio composto de: sacarose 250 mM, EGTA 1 mM, albumina bovina sérica 0,2% e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4. Uma alíquota de 50µl de sobrenadante foi utilizada na realização dos ensaios com uso de kit comercial (Caspase-3 Assay kit, Fluorimetric®, Sigma).

8 - Avaliação da Função Renal

8.1 – Uréia plasmática

Foi realizada em plasma com utilização de Kit de diagnóstico (URÉIA CE Labtest®), conforme procedimento descrito pelo fabricante. As absorbâncias do teste e do padrão foram determinadas em 600 nm, contra o branco de reagentes.

8.2 – Creatinina plasmática

A creatinina foi determinada no plasma utilizando-se Kit de diagnóstico (CREATININA Labtest®), conforme procedimento descrito pelo fabricante. As absorbâncias foram determinadas em 510 nm, contra branco de reagentes.

9 - Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se teste não paramétrico (Mann-Whitney Test) com a utilização do programa “GraphPad Prism version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA”. Adotou-se $p < 0,05$ como nível de significância.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Na análise dos resultados foram adotados os seguintes critérios para determinação do nível de significância: (a) o grupo tratado com cisplatina foi comparado ao grupo controle, ou seja, aquele tratado com veículo (salina), para validação do modelo e comprovação dos efeitos nefrotóxicos; (b) o grupo tratado com DMTU + cisplatina foi comparado ao grupo tratado somente com cisplatina (agente nefrotóxico), a fim de investigar-se uma possível proteção; (c) finalmente, um outro grupo, tratado apenas com o suposto agente protetor, ou seja, DMTU, foi comparado ao grupo salina, para excluir-se a possibilidade de ocorrência de outros efeitos do DMTU sobre as mitocôndrias, além do suposto efeito protetor com relação à nefrotoxicidade.

Os resultados de todos os ensaios realizados no grupo tratado apenas com DMTU i.p. não apresentaram diferença significativa, isto é, valores de $p < 0,05$, quando comparados aos resultados dos grupos tratados com salina (controle), demonstrando que o DMTU não exerceu nenhum efeito direto sobre as mitocôndrias que pudessem interferir com a validade dos modelos experimentais e com as inferências decorrentes dos efeitos observados.

As médias e os valores de desvio padrão de todos os parâmetros avaliados nos quatro diferentes grupos de animais (controle, cisplatina, DMTU+cisplatina e DMTU), bem como os números das respectivas representações gráficas, estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos nos parâmetros relacionados às funções renal e mitocondrial, ao estado redox mitocondrial, ao estresse oxidativo mitocondrial e à apoptose em rim de ratos submetidos aos diferentes tratamentos: salina (controle), cisplatina, DMTU + cisplatina e DMTU.

Parâmetro	Unidade	Controle	Cisplatina	DMTU + cisplatina	DMTU	Figura
Uréia	mg/100 ml	80,20 (±23)	232,50 * (±35,91)	93,58 # (±15,52)	72,82 (±22)	8
Creatinina	mg/100 ml	0,54 (±0,062)	1,95 * (±2,02)	1,08 # (±0,8)	0,70 (±0,11)	9
ATP	%	100 (±3,8)	75,00 * (±5,8)	96,71 # (±3,7)	94,72 (±10,09)	10
Consumo O ₂ (estado 3)	nmol O ₂ /min/ mg proteína	105,4 (±25,8)	56,3 * (±12,6)	85,7 # (± 14,8)	95,8 (± 18,5)	11
Consumo O ₂ (estado 4)	nmol O ₂ /min/ mg proteína	22,6 (±5,7)	28,7 (±6,9)	25,2 (±5,3)	25,2 (±4,8)	11
RCR	-----	4,22 (±0,8)	2,06 * (±0,51)	3,40 # (±0,24)	3,80 (±0,9)	11
ADP/O	-----	1,88 (±0,06)	1,47 * (±0,05)	1,79 # (±0,09)	2,04 (±0,08)	12
Transporte de Ca ⁺²	-----	Traçado A	Traçado C	Traçado D	Traçado B	13
MDA + 4 HNE	nmoles/mg de prot	9,87 (± 0,76)	15,72 * (±1,48)	8,73 # (±1,56)	11,04 (±1,06)	14
P-SH	nmoles/mg prot	68,04 (± 8,28)	45,00 * (± 5,87)	76,37 # (± 11,94)	76,54 (±12,61)	15
GSH	nmoles/mg prot	3,69 (± 0,35)	2,38 * (± 0,35)	3,65 # (± 0,61)	4,20 (±0,52)	16
GSSG	nmoles/mg prot	0,041 (± 0,004)	0,060 * (± 0,003)	0,047 # (±0,007)	0,036 (±0,006)	16
GSH/GSSG	-----	90,24 (± 8,63)	37,77* (±5,48)	77,02# (±9,37)	116,16 (±12,83)	16
Proteína carbonilada	nmoles/mg prot	0,53 (± 0,13)	1,24 * (± 0,08)	0,63 # (±0,04)	0,53 (±0,19)	17
NADPH	%	100 (± 7,78)	74,37 * (± 8,57)	102,91 # (± 11,31)	93,06 (±11,02)	18
Aconitase	%	100 (± 12,55)	73,00 * (± 14,27)	108,20 # (± 23,62)	98,85 (±20,82)	19
Cardiolipina	%	100 (± 4,34)	80,91* (± 5,43)	96,59 # (± 6,47)	95,83 (±7,54)	20
Potencial de membrana	-----	Traçado A	Traçado C	Traçado D	Traçado B	21
Caspase-3	%	100 (± 11,03)	184 * (± 14,05)	108,20 # (± 17,89)	89,67 (±14,83)	22

* = significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle); # = significativo para $p < 0,05$ (em relação à cisplatina)

Os valores são expressos como média ± desvio padrão da média. Condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. GSH = glutatona reduzida; GSSG = glutatona oxidada; P-SH = proteína sulfidril; MDA = malondialdeído; 4HNE = 4-hidroxi-2 (E)-nonenal; RCR= Razão do Controle Respiratório

Nossos resultados indicam que a cisplatina foi capaz de induzir uma marcante insuficiência renal em ratos tratados com 10 mg/Kg do fármaco, avaliada pela determinação de uréia e creatinina plasmáticas. A concentração da uréia no plasma subiu de 80,2 ($\pm$ 23) mg/100 ml no grupo controle, para 232,50 ($\pm$ 35,91) mg/100 ml no grupo cisplatina, um aumento da ordem de 290% ($p < 0,05$). Nos animais tratados com DMTU + cisplatina o valor médio de uréia encontrado foi 93,58 ($\pm$ 15,52) mg/100 ml, portanto significativo ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo cisplatina, indicando que houve proteção (Figura 8). No caso da creatinina, a concentração do grupo controle passou de 0,54 ($\pm$ 0,062) mg/100 ml para 1,95 ($\pm$ 2,02) mg/100 ml no grupo da cisplatina (aumento de 361%, $p < 0,05$), sendo 1,08 ($\pm$ 0,8) mg/100 ml no grupo DMTU + cisplatina, significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo cisplatina (Figura 9).

O experimento relacionado à síntese de ATP (Figura 10) revelou uma significativa redução ($p < 0,05$) no grupo tratado com cisplatina (75% $\pm$ 5,8) em relação ao grupo controle, considerado como 100% ($\pm$ 3,8). O grupo DMTU + cisplatina, porém, apresentou valores bastante próximos daqueles do grupo controle, indicando a ocorrência de proteção (96,71% $\pm$ 3,7).

Figura 8 – Níveis de uréia em plasma de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Figura 9 – Níveis de creatinina em plasma de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Figura 10 – Determinação de ATP em rim de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

O consumo de O_2 demonstrou a interferência da cisplatina no estado 3 da respiração ($p < 0,05$), bem como a proteção ($p < 0,05$) pelo DMTU, tendo sido encontrados os seguintes valores: 105,4 (nmol O_2 /min/ mg proteína) para o grupo controle, 56,3 (nmol O_2 /min/ mg proteína) para o grupo cisplatina e 85,7 (nmol O_2 /min/ mg proteína) para o grupo DMTU + cisplatina. Não foram encontradas diferenças significativas no estado 4 da respiração mitocondrial. Os parâmetros respiratórios ADP/O e RCR foram significativamente ($p < 0,05$) alterados pela cisplatina, ficando também evidente a proteção ($p < 0,05$) pelo DMTU. Os valores de ADP/O para os grupos controle, cisplatina e DMTU + cisplatina foram respectivamente: 1,88, 1,47 e 1,79. O RCR encontrado no grupo controle foi 4,22, sendo 2,06 no grupo cisplatina e 3,40 no grupo protegido com DMTU (Figuras 11 e 12).

Na Figura 13 pode-se constatar uma menor captação de cálcio no grupo cisplatina com relação ao grupo controle, demonstrada pelo menor decaimento da absorbância do arsenazo III (indicador do cálcio livre) após a adição do succinato (traçado C). No grupo tratado com DMTU + cisplatina, embora o decaimento do traçado (D) após a adição do substrato seja menos acentuado que o do grupo controle, é bastante diferente daquele obtido com mitocôndrias de animais tratados com cisplatina, aproximando-se mais do perfil do grupo controle. O grupo tratado apenas com DMTU (traçado B) apresenta comportamento muito semelhante ao do grupo controle (A). As absorbâncias do arsenazo III ao final de 30 minutos de análise foram significativamente maiores no grupo cisplatina (0,059, $p < 0,05$) com relação ao grupo controle (0,005). No grupo DMTU + cisplatina os valores ao final de 30 minutos foram significativamente diferentes (0,012, $p < 0,05$) daqueles do grupo cisplatina.

Figura 11. Consumo de Oxigênio e Razão de Controle Respiratório (RCR) em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Avaliação do estado 3 (A) e do estado 4 (B) da respiração e determinação da Razão do Controle Respiratório - RCR (C). Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* = significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

= significativo para $p < 0,05$ (em relação à cisplatina)

Figura12 – Razão ADP/O em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Figura 13 - Transporte de cálcio em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

A ocorrência da oxidação de lipídios da membrana mitocondrial foi avaliada pela determinação de malondialdeído (MDA) e de 4 hidroxí 2 (E) nonenal (4-HNE). Observou-se aumento ($p < 0,05$) nos níveis de MDA e do 4-HNE nas mitocôndrias dos rins dos animais tratados com cisplatina, cujos valores atingiram $15,72 \pm 1,48$ (nmoles/mg de proteína), contra $9,87 \pm 0,76$ (nmoles/mg de proteína) no grupo controle. No grupo DMTU + cisplatina foi constatada a proteção ($8,73 \pm 1,56$ nmoles/mg de proteína, $p < 0,05$) (Figura 14).

Os níveis de proteína sulfidrílica do grupo cisplatina ($45 \pm 5,87$ nmoles/mg de proteína) foram significativamente ($p < 0,05$) inferiores aos níveis do grupo controle ($68,04 \pm 8,28$ nmoles/mg de proteína) e do grupo DMTU + cisplatina ($76,37 \pm 11,94$ nmoles/mg de proteína), indicando proteção (Figura 15).

Os efeitos sobre a principal defesa antioxidante da mitocôndria (glutathiona reduzida ou GSH), estão representados na Figura 16. Pode-se observar que houve uma marcante redução na concentração intra-mitocondrial de GSH, cujos valores passaram de $3,69 \pm 0,35$ nmoles/mg de proteína no grupo controle, para $2,38 \pm 0,35$ nmoles/mg de proteína no grupo cisplatina. Os animais previamente protegidos com DMTU praticamente não apresentaram alterações ($3,65 \pm 0,61$ nmoles/mg de proteína) com relação ao grupo controle, indicando a proteção. Os valores de glutathiona oxidada (GSSG), foram $0,041 \pm 0,004$ nmoles/mg de proteína no grupo controle; $0,060 \pm 0,003$ nmoles/mg de proteína no grupo cisplatina e $0,047 \pm 0,007$ nmoles/mg de proteína no grupo DMTU + cisplatina. Assim, o estado redox mitocondrial, representado pela relação GSH/GSSG foi significativamente alterado no grupo cisplatina ($37,77 \pm 5,48$, $p < 0,05$) com relação ao grupo controle ($90,24 \pm 8,63$) e ao grupo DMTU + cisplatina ($77,02 \pm 9,37$, $p < 0,05$), mais uma vez

constatando-se a prevenção de um efeito nefrotóxico pelo tratamento prévio com DMTU (Figura 16).

Figura 14 – Lipoperoxidação. Níveis de MDA e 4 HNE em mitocôndrias isoladas de córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Figura 15 – Níveis de proteínas sulfidrila (P-SH) em mitocôndrias isoladas de córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Figura 16 - Níveis de GSH (A); de GSSG (B) e relação GSH/GSSG (C) em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. Condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* = significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

= significativo para $p < 0,05$ (em relação à cisplatina)

Os níveis de proteína carbonilada foram significativamente mais altos nas mitocôndrias do grupo tratado com cisplatina ($1,24 \pm 0,08$ nmoles/mg de proteína, $p < 0,05$) com relação ao grupo controle ($0,53 \pm 0,13$ nmoles/mg de proteína) e ao grupo protegido previamente com DMTU ($0,63 \pm 0,04$ nmoles/mg de proteína, $p < 0,05$) (Figura 17).

Os níveis de NADPH apresentaram uma significativa redução no grupo tratado com cisplatina ($74,37\% \pm 8,57$), em relação ao grupo controle ($100\% \pm 7,78$) e ao grupo DMTU + cisplatina ($102,91\% \pm 11,31$) (Figura 18).

O grupo tratado com cisplatina apresentou uma significativa inibição da atividade da aconitase nas mitocôndrias do córtex renal, em comparação ao grupo protegido com DMTU e ao grupo controle, cuja atividade enzimática foi considerada 100% (Figura 19). Os resultados encontrados foram 73% ($\pm 14,27$), para o grupo cisplatina ($p < 0,05$) e 108,20% ($\pm 23,62$) para o grupo DMTU + cisplatina ($p < 0,05$).

No ensaio de determinação da cardiolipina (Figura 20) os valores encontrados no grupo controle foram considerados 100%, tendo sido observada a oxidação da cardiolipina no grupo tratado com a cisplatina ($80,91\% \pm 5,43$, $p < 0,05$). No grupo DMTU + cisplatina os níveis de cardiolipina ($96,59\% \pm 6,47$) mantiveram-se muito próximos aos do grupo controle, com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo cisplatina.

Figura 17 – Níveis de proteína carbonilada em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Figura 18 – Níveis de NADPH em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Figura 19 – Atividade da aconitase em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Figura 20 – Níveis de cardiolipina em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

O efeito da cisplatina no potencial elétrico transmembrana mitocondrial, está representado na Figura 21. Foram observadas diferenças significativas no grupo tratado com cisplatina (traçado C) em comparação aos grupos controle (salina) e DMTU, respectivamente A e B. Os traçados representam a diminuição da fluorescência do meio, conferida pela sonda fluorescente rodamina 123, em decorrência da captação dessa sonda pelas mitocôndrias. A intensidade da fluorescência é inversamente proporcional ao potencial de membrana. Assim, quanto maior o potencial de membrana, menor a fluorescência, sendo que decaimentos no traçado indicam aumento do potencial de membrana e vice-versa. Em todos os traçados após a adição do substrato succinato ocorre o desenvolvimento do potencial de membrana, com conseqüente decréscimo da fluorescência. A adição do ADP (estado 3 da respiração) causou um imediato decréscimo no potencial, correspondente à energia utilizada para sintetizar o ATP. Uma vez completo o ciclo da fosforilação, o potencial de membrana retornou aos níveis anteriores à adição de ADP nos grupos A (controle) e B (DMTU). No grupo tratado com cisplatina (traçado C) nota-se claramente que (1) a fosforilação do ADP ocorreu mais lentamente e (2) o potencial não retornou aos níveis pré-adição de ADP, desfazendo-se progressivamente. O grupo protegido com DMTU (traçado D) apesar de ter fosforilado o ADP mais lentamente do que o grupo controle, foi capaz de recuperar o potencial inicial. A adição do desacoplador FCCP (carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona) despolarizou completamente a membrana mitocondrial interna dos demais grupos (A, B e D), comprovando a validade do modelo experimental.

Figura 21. Potencial de Membrana. (A) Controle; (B) DMTU; (C) cisplatina ; (D) DMTU + cisplatina; suc=succinato de potássio; FCCP= carbonil cianeto p-trifluorometoxifenil hidrazona (desacoplador). Condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

O estudo envolvendo apoptose, realizado através da determinação da atividade da caspase-3, revelou resultados significativamente alterados para o grupo tratado com cisplatina. Considerando-se os valores do grupo controle como 100%, o grupo cisplatina apresentou aumento significativo ($184 \% \pm 14$, $p < 0,05$) da atividade enzimática. No grupo tratado com DMTU + cisplatina foi constatada a ocorrência da proteção ($108.81\% \pm 17.89$, $p < 0,05$) (Figura 22).

Figura 22 – Atividade da Caspase-3 em homogenato de córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

* significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle)

significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

DISCUSSÃO

V. DISCUSSÃO

Os rins são alvos freqüentes dos efeitos tóxicos de xenobióticos (DEKANT; VAMVAKAS, 1996). Muitos fatores estão envolvidos na suscetibilidade dos rins a um grande número de agentes tóxicos, porém o alto fluxo sanguíneo e a concentração de xenobióticos pelo processo de reabsorção do fluido tubular são sem dúvida os mais importantes. Embora os rins constituam menos que 1% da massa corporal, recebem cerca de 25% do fluxo sanguíneo bombeado pelo coração. Assim, elevadas quantidades de substâncias químicas e/ou seus metabólitos são enviadas aos rins. Outro importante fator que afeta a susceptibilidade renal aos agentes tóxicos é a sua capacidade de concentrar o fluido tubular através da reabsorção seletiva de água e solutos, acarretando a concentração das substâncias químicas presentes nesse fluido. Dessa maneira, concentrações não tóxicas de xenobióticos presentes no plasma transformam-se em concentrações tóxicas nos rins. As características do processo de transporte também contribuem para que substâncias químicas atinjam concentrações potencialmente tóxicas nos rins. Quando um agente químico é ativamente secretado do plasma para o fluido tubular, inicialmente esse agente acumula-se entre as células do túbulo proximal e se for reabsorvido, entrará nas células do túbulo proximal em concentrações relativamente altas. A biotransformação de substâncias químicas a metabólitos reativos potencialmente tóxicos é um fator chave no desenvolvimento da nefrotoxicidade. Muitas das reações de ativação que acontecem no fígado também ocorrem nos rins e muitos toxicantes são ativados nesses órgãos, sendo tanto nefrotóxicos quanto hepatotóxicos. Algumas regiões dos rins têm consideráveis níveis de enzimas metabolizadoras de xenobióticos, particularmente as enzimas do citocromo P450 na porção reta do túbulo proximal, uma região particularmente susceptível aos danos

químicos. Como os metabólitos são geralmente instáveis e portanto transitórios, tendem a interagir com as macromoléculas próximas ao sítio onde foram gerados. Então, embora sua ativação seja menor nos rins do que no fígado, as enzimas do citocromo P450 têm um papel importante na nefrotoxicidade pela proximidade do sítio de ação. Assim como em outros órgãos, a toxicidade é o resultado do balanço entre a geração de metabólitos reativos e a sua detoxificação. Os elevados níveis de glutathione encontrados nos rins indubitavelmente exercem um papel importante no processo de detoxificação (HODGSON; LEVI, 2004).

Os rins acumulam cisplatina de maneira mais acentuada do que os demais órgãos, possivelmente devido aos seus mecanismos de transporte (ARANY; SAFIRSTEIN, 2003). A cisplatina tem os rins como o alvo principal dos seus efeitos tóxicos e altera completamente as suas funções normais, podendo estabelecer uma insuficiência renal aguda. No nosso estudo, a insuficiência renal aguda ficou caracterizada pelas alterações significativas nas concentrações plasmáticas de uréia e de creatinina encontradas nos animais tratados com cisplatina, devido às lesões provocadas nas células dos túbulos renais. Essas lesões são responsáveis pela diminuição do índice de filtração glomerular, fazendo com que haja acúmulo no plasma dos produtos gerados no metabolismo do nitrogênio, representado pelo aumento dos níveis de nitrogênio não protéico (nitrogênio uréico no sangue) e da creatinina, substância endógena resultante da desidratação da creatina muscular, sendo que a produção e a excreção dessa substância está primariamente relacionada à massa muscular (HENRY, 1995). Assim, a concentração plasmática de creatinina é bastante estável, variando menos de 10% ao longo do dia em indivíduos normais. A creatinina é filtrada livremente nos glomérulos e não é reabsorvida nos túbulos. Uma pequena quantidade de creatinina é derivada de

secreção tubular (FIRST, 1996). Um aumento dos níveis de creatinina sérica reflete danos renais cumulativos e recomenda-se que a cisplatina não seja administrada a pacientes com concentrações de creatinina sérica superior a 1,5 mg/dl (CVITKOVIC, 1998). A creatinina sérica encontra-se aumentada sempre que a razão de filtração glomerular estiver baixa, devido a processos pré-renais (síntese aumentada de creatinina ou perfusão renal diminuída); doença renal ou à obstrução pós-renal (HARTMANN, 1994).

A uréia é o principal metabólito proveniente da degradação de proteína. Sua concentração na corrente sanguínea depende de fatores como: sua produção, volume corporal hídrico e sua eliminação, podendo também variar em função da dieta e em consequência da degradação acentuada de proteínas. Uma vez que a excreção da uréia depende da relação entre a filtração glomerular e a reabsorção tubular, sua concentração plasmática aumenta em pacientes com doença renal, sendo insensível a pequenas variações na filtração glomerular, mas extremamente aumentada nos casos onde 40 a 60% dos néfrons estão comprometidos. A uréia plasmática aumenta em função hiperbólica com relação à diminuição da filtração glomerular acarretada pela progressão da doença renal, de tal forma que um decréscimo de 50% na filtração glomerular aumenta em aproximadamente duas vezes a concentração plasmática de uréia (HARTMANN, 1994; FIRST, 1996).

As alterações plasmáticas de uréia e creatinina, encontradas nos animais tratados com cisplatina nesse estudo, são convergentes com os resultados obtidos por Nishikawa et al. (2001) e Cvitkovic (1998), ao avaliar e relatar a disfunção renal produzida por esse quimioterápico. Segundo Kintzel (2001) uma redução na razão de filtração glomerular (GFR) de 20 a 40% é um achado freqüente em pacientes submetidos ao tratamento com cisplatina.

Acredita-se que a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina seja acompanhada de alterações na função e na estrutura mitocondrial (GORDON; GATTONE, 1986).

O consumo de oxigênio por grama de tecido é extremamente alto nos rins, sendo excedido apenas pelo coração. O túbulo proximal tem alta demanda metabólica e o ATP necessário para suprir essa demanda é quase que exclusivamente produzido pela fosforilação oxidativa mitocondrial (LI-PING et al., 2000). Em nossos estudos demonstramos que os animais tratados com cisplatina apresentaram redução significativa na síntese de ATP. Muitas drogas ou fármacos podem diminuir a eficiência da produção de ATP pela mitocôndria, incluindo uma ampla variedade de fármacos antitumorais. Essa alteração na produção de ATP revela a interação do fármaco com a fosforilação oxidativa, que inclui a FoF1-ATPase (WALLACE; STARKOV, 2000). De acordo com Kruidering et al. (1997) há evidências de que a cisplatina promove uma disfunção mitocondrial que leva à inibição dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória, a qual resulta em decréscimo dos níveis intracelulares de ATP e ainda no decréscimo do potencial de membrana mitocondrial. Gerschenson et al. (2001) avaliaram o efeito da administração de 15mg/kg de cisplatina a ratas no 18º dia de gestação e demonstraram a ocorrência de uma significativa redução na atividade das enzimas da fosforilação oxidativa, com danos nos complexos II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, 24 horas após a exposição, sugerindo que a mitocôndria é um alvo essencial no mecanismo de morte celular induzido pela cisplatina.

A cadeia respiratória mitocondrial constitui a principal fonte intracelular de ERO na maioria dos tecidos. A concentração desses oxidantes é mantida em níveis não tóxicos por uma variedade de defesas antioxidantes e de enzimas. O delicado balanço entre as defesas antioxidantes e a produção de ERO pode ser interrompido

por deficiência nas defesas antioxidantes, inibição do fluxo de elétrons ou exposição a xenobióticos. Esse desequilíbrio aparece como um fator comum em vários processos patológicos que resultam em danos oxidativos ao tecido e morte celular (TURRENS, 2003).

Nossos resultados sugerem uma inibição do fluxo de elétrons da cadeia respiratória pela cisplatina, indicando o seu efeito deletério sobre a fosforilação oxidativa mitocondrial. Foi constatada uma redução no consumo de oxigênio e na relação ADP/O para o grupo tratado com cisplatina. A relação ADP/O está associada à eficiência da mitocôndria em sintetizar ATP. Os estados clássicos da respiração mitocondrial são a respiração do estado 4 (basal, na presença de substrato) e a respiração do estado 3 (ADP ativado). A relação entre a respiração do estado 3 e a do estado 4, a Razão do Controle Respiratório (RCR), é um parâmetro relacionado à função mitocondrial e indica o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a síntese de ATP. No presente estudo observou-se que os efeitos da cisplatina manifestaram-se sobre o estado 3 da respiração, indicando que este fármaco afetou a fosforilação oxidativa.

Kruidering et al. (1997) demonstraram que a cisplatina inibe os complexos I, II, III e IV da cadeia respiratória em 15 a 55% após 20 min de incubação com 50 a 500 μ M do fármaco respectivamente. Iguchi et al. (2004) avaliaram a respiração de mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos tratados com 5 mg/Kg de cisplatina e sacrificados 5 dias após o tratamento. Estes autores encontraram um marcante decréscimo no estado 3 da respiração, na razão ADP/O e no RCR, já no primeiro dia após o tratamento, sendo que, no quinto dia após a administração de cisplatina, a diminuição nas funções mitocondriais foi ainda mais pronunciada.

A diminuição na captação de cálcio, encontrada no grupo tratado com cisplatina, indica que houve comprometimento dos transportadores deste íon e da integridade da membrana mitocondrial. O grupo controle apresentou uma maior integridade da membrana mitocondrial, evidenciada através de uma maior captação do cálcio do meio, que foi liberado lentamente. O cálcio pode ser transportado para a matriz mitocondrial utilizando a energia do gradiente eletroquímico de prótons na membrana interna da mitocôndria. O influxo ocorre em resposta ao potencial negativo existente no interior da membrana, enquanto que o efluxo ocorre por troca com o H^+ do exterior, ou com o sódio do citosol. Entre outros fatores, a manutenção da baixa concentração citosólica de cálcio é o resultado do balanço entre influxo e efluxo do cátion na mitocôndria. Embora o cálcio apresente importante função regulatória, ativando desidrogenases mitocondriais, sua presença em concentrações não fisiológicas é responsável pelo comprometimento da função energética mitocondrial (VERCESI; REYNAFARJE; LEHNINGER, 1978). A perturbação da homeostase celular do cálcio é um importante mecanismo envolvido nas alterações do metabolismo celular e, em alguns casos, no mecanismo de citotoxicidade que conduz à apoptose (BOWSER et al., 2002). Segundo McConkey e Orrenius, (1997), existem evidências de que o cálcio intramitocondrial pode ser alterado quando há colapso do potencial de membrana mitocondrial, levando à disfunção da mitocôndria e subsequente ocorrência de estresse oxidativo. Ainda segundo estes autores, o aumento do cálcio citosólico é um evento que precede o surgimento de apoptose. Deste modo, o decréscimo na captação do cálcio pela mitocôndria, pode contribuir para um acúmulo de cálcio citosólico, prejudicando a manutenção da homeostase do cálcio.

De acordo com Zhang e Lindup (1996), em um estudo *in vitro* utilizando fatias do córtex renal, a cisplatina provoca um aumento significativo da concentração do cálcio citosólico, devido, pelo menos em parte, à inibição da captação de cálcio pela mitocôndria, o que estaria diretamente relacionado à depleção mitocondrial de GSH e proteínas tióis. Kawai et al. (2006) investigaram o envolvimento de ERO e cálcio intracelular no desenvolvimento da nefrotoxicidade da cisplatina em células epiteliais renais (LLC-PK1) e reportaram que, em concentrações de 250 μM ou mais, a cisplatina promoveu o aumento dos níveis de cálcio intracelular de maneira dose-dependente, porém, os autores sugerem que a cisplatina aumenta a liberação de cálcio dos sítios de armazenamento intracelular, como é o caso da mitocôndria, em uma fase inicial do dano renal. Nossos resultados demonstraram que mitocôndrias isoladas de animais tratados com cisplatina perdem a capacidade de captar o cálcio, comprovando *in vivo*, esses estudos anteriores realizados *in vitro*. Essa incapacidade pode ser atribuída à queda do potencial de membrana, devido à inibição da cadeia transportadora de elétrons e/ou ao acúmulo do cálcio intramitocondrial *in vivo*. A quebra da homeostase do cálcio (MCCONKEY; ORRENIUS, 1997), a lipoperoxidação e, possivelmente, as alterações nos grupamentos sulfidríla presentes na membrana mitocondrial (KANNAN; JAIN, 2000) podem ser responsáveis pelo colapso do potencial da membrana mitocondrial. Todos esses eventos foram observados no grupo cisplatina de nossos experimentos. O efeito da cisplatina no potencial elétrico transmembrana mitocondrial fornece uma indicação direta da capacidade de transdução de energia da membrana mitocondrial interna (MASINI et al., 1997).

A TPM (transição da permeabilidade mitocondrial) é regulada por uma série de moduladores, dentre eles, o potencial de membrana, Ca^{2+} , pH e estado redox

mitocondrial, através de um mecanismo sensível à voltagem. Assim, uma hipótese para o mecanismo da TPM é que o fenômeno depende de uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, cujo valor limite é aumentado por modificação de grupos sulfidrilas (BERNARDI et al., 2001). Outra hipótese propõe que as espécies reativas de oxigênio, acumuladas devido à exaustão de defesas antioxidantes, tais como GSH e nucleotídeos de piridina, interagem com grupos sulfidrilas de proteínas de membrana, abrindo canais dependentes da ligação do cálcio (CASTILHO et al., 1995; KOWALTOWSKY et al., 1996). A lipoperoxidação da membrana mitocondrial também pode estar envolvida quando o indutor é o fosfato inorgânico (KOWALTOWSKY et al., 1996). A TPM pode ocasionar a liberação do citocromo c intramitocondrial para o meio extracelular, achado usualmente associado com a indução de apoptose. Diferentes condições indutoras de apoptose promovem a dissipação do potencial de membrana mitocondrial, às vezes precedida por uma transitória fase de hiperpolarização (LOEFFLER; KROEMER, 2000). A habilidade de formação do potencial de membrana é uma função afetada em mitocôndrias tratadas com cisplatina (NISHIKAWA et al., 2001), bem como a subsequente redução da produção de ATP (ZHANG; LINDUP, 1994). Em nossos estudos com mitocôndrias isoladas de rins de ratos tratados com a cisplatina, não foi possível demonstrar a indução do poro de transição, mesmo na presença do vermelho de rutênio, o que poderia ser explicado pela dificuldade das mitocôndrias em captar e manter o cálcio intramitocondrial, bem como o potencial de membrana, parâmetros essenciais para a ocorrência da TPM (dados não mostrados). Não se pode, portanto, excluir a possibilidade de que a TPM já tivesse sido induzida anteriormente *in vivo*.

Zhang e Lindup (1994) investigaram os efeitos da cisplatina (2mM) *in vitro* e relataram depleção de proteína-sulfidrilas, seguida de diminuição substancial na

captação de cálcio e diminuição do potencial de membrana mitocondrial, o qual foi avaliado pela captação da rodamina 123. Todos esses achados foram confirmados em nossos estudos *in vivo*.

A peroxidação lipídica está envolvida em um mecanismo de morte celular bem estabelecido e utilizado como indicador de estresse oxidativo. Os lipoperóxidos são instáveis e se decompõem formando uma complexa série de compostos incluindo compostos carbonílicos reativos. O MDA (malondialdeído) e o 4-HNE (4-hidroxi-2(E)-nonenal) são produtos originários da decomposição dos peróxidos de ácidos graxos polinsaturados da membrana mitocondrial. Esses compostos eletrofílicos estáveis são capazes de se difundir através das células causando danos aos componentes celulares e interferindo nas funções celulares. Os aldeídos são potentes inibidores enzimáticos, pois podem se ligar aos grupos nucleofílicos dos aminoácidos (ex: tirosina, cisteína, serina, lisina, histidina), componentes críticos dos sítios ativos enzimáticos ou necessários para a manutenção da estrutura terciária das enzimas (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991). O aumento das concentrações destes compostos, demonstrado em nossos experimentos, é apontado como marcador da lipoperoxidação que ocorre após a diminuição das defesas naturais, como GSH e as enzimas glutathione redutase e superóxido dismutase.

A oxidação dos ácidos graxos da membrana afeta as demais funções mitocondriais e, portanto, a peroxidação lipídica está envolvida nas alterações funcionais da mitocôndria e nos mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina (ORELLANA et al., 2000; RAFIQUE; SCHAPIRA; COOPER, 2001).

Proteínas com grupamentos sulfidríla são muito sensíveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio e parte dos grupos sulfidríla são oxidados na presença

das espécies reativas de oxigênio. A modificação na estrutura dessas proteínas pelo estresse oxidativo geralmente é acompanhada do enfraquecimento de várias funções mitocondriais e quebra da homeostase intracelular do cálcio. Esses grupamentos são importantes para a atividade biológica de muitas enzimas, entre elas as ATPases e desempenham importante função na permeabilidade mitocondrial transitória (TPM), responsável por disfunção mitocondrial irreversível. Nossos resultados provenientes de estudos *in vivo* são congruentes com aqueles relatados por Zhang e Lindup (1994), que demonstraram *in vitro* que a cisplatina provoca depleção de proteínas com grupamentos sulfidrila, em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos, incubadas com 2 mM do fármaco por 120 minutos. Senturker et al. (2002), também avaliaram a depleção de proteínas com grupamentos sulfidrila, usando linfoma de células B humanas como alvo da ação pró-apoptótica da cisplatina. Estes autores avaliaram a oxidação das proteínas sulfidrila por técnicas de imunensaio ("Western blot") e evidenciaram a ocorrência de oxidação dos grupamentos -SH, em consequência da ação de radicais livres de oxigênio, embora os próprios autores considerem este tipo de ensaio ainda pouco sensível para avaliar adequadamente este tipo de alteração.

As reações da glutathiona reduzida são de fundamental importância para a proteção celular contra o estresse oxidativo, por manter a célula em um ambiente reduzido sob condições fisiológicas normais. A oxidação dos tióis em células tratadas com pró-oxidantes provoca um enfraquecimento do sistema de transporte do cálcio mediado pelas Ca-ATPases, com consequente aumento intracelular da concentração de cálcio e ativação de várias enzimas Ca-dependentes (fosfolipases, proteases e endonucleases) relacionadas aos processos de degradação de macromoléculas e morte celular (ORRENIUS et al., 1989; VERCESI, 1993; TRUMP;

BEREZESKY, 1995). A ação da glutathione peroxidase leva à produção da glutathione dissulfeto ou glutathione oxidada (GSSG), a qual é tóxica para a célula pela formação de derivados cisteinil, especialmente na presença de metais de transição (JENNER, 1994). A GSSG pode retornar novamente à sua forma GSH, por uma reação catalisada pela enzima glutathione redutase, na presença de NADPH (SHAN; AW; JONES, 1990). A cisplatina pode reagir diretamente com a glutathione (DEDON; BORCH, 1987; ISHIKAWA; ALI-OSMAN, 1993), resultando em redução nos níveis de GSH, depleção de NADPH, com conseqüente aumento nos níveis do GSSG, eventos observados em nossos experimentos com as mitocôndrias do grupo tratado com cisplatina. Dessa forma tem-se alteração do estado redox mitocondrial, representado pela diminuição da relação GSH/GSSG, fato indicativo do estabelecimento de um estado pró-oxidativo na mitocôndria pela ação da cisplatina.

As proteínas mitocondriais são modificadas por vários graus de oxidação sob condições controladas e são susceptíveis à oxidação induzida por hipoxia/reoxigenação (REINHECKEL et al., 2000). Em nosso estudo evidenciamos a elevação dos níveis de proteína carbonilada no grupo de animais tratados com cisplatina. Como a proteína carbonilada é gerada em uma grande variedade de processos oxidativos, a avaliação da função bioenergética mitocondrial e a geração de danos pelas espécies reativas de oxigênio podem ser estimadas pela determinação dessa proteína (DAVIES et al., 2001). A oxidação de proteínas resulta do ataque oxidativo das espécies reativas de oxigênio aos resíduos de aminoácidos das proteínas (particularmente, histidina, arginina, lisina e prolina), resultando na formação da função carbonil e, portanto, acarretando alterações estruturais e funcionais das proteínas afetadas. Modificações oxidativas das proteínas *in vivo* podem afetar uma grande variedade de funções celulares desempenhadas por

proteínas: receptores, mecanismos de transdução de sinal, sistemas de transporte e enzimas. Esse fato também pode contribuir para danos secundários a outras biomoléculas, como por exemplo, falhas no reparo do DNA devido à perda da fidelidade da DNA polimerase durante a replicação do DNA (SENTURKER et al., 2002).

A constatação da oxidação do NAD(P)H intramitocondrial no grupo tratado com cisplatina reforça a hipótese de que o estado redox mitocondrial foi alterado em decorrência do estresse oxidativo, pois esse parâmetro é tido como o melhor indicador para avaliação do estado redox celular. Soma-se a isso o fato de que a homeostase intracelular do cálcio e os grupamentos tiólicos das proteínas mitocondriais estão de tal forma relacionados, de maneira direta ou indireta, que o comportamento de um afeta o estado do outro. Esse conjunto de fatores também causa a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) como descrito por Vercesi e Hoffman (1993). Tal conjunto de fatores foi observado em nossos experimentos com cisplatina, o que nos permite especular que a TPM pode ter uma participação importante na indução da morte celular pela cisplatina. O aumento da formação de ERO, em conjunto com a inibição da cadeia respiratória, e a possibilidade da abertura do poro de transição de membrana, poderiam ser apontados como responsáveis pela oxidação do NAD(P)H, prejuízo na síntese de ATP e depleção da GSH. Todas estas alterações têm sido descritas na ocorrência de apoptose e são intrinsecamente letais (LOEFFLER; KROEMER, 2000).

A aconitase mitocondrial e a aconitase citosólica contém um aglomerado ferro-enxofre (4Fe-4S) no seu sítio catalítico, com um átomo de ferro particularmente instável. A aconitase mitocondrial catalisa a interconversão entre L-citrato e isocitrato no ciclo do ácido tricarboxílico, uma reação essencial para o metabolismo

energético celular (ZHENG; SEAN; GRAZIANO, 1998). Em nosso estudo, a cisplatina inibiu significativamente a atividade da aconitase, dado indicativo de que essa alteração pode constituir um evento importante no estresse oxidativo mitocondrial induzido pela cisplatina e que culmina com a morte celular. O decréscimo da atividade da aconitase é devido a uma susceptibilidade particular do centro ferro-enxofre, no seu sítio ativo, às espécies reativas do oxigênio. A inativação da aconitase pode bloquear o fluxo normal de elétrons para o oxigênio, levando ao acúmulo de metabólitos reduzidos, como o NAD(P)H, o que pode iniciar uma cascata de eventos, envolvendo uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, aumentando o dano oxidativo provocado a macromoléculas (YAN ; LEVINE; SOHAL, 1997).

Gardner e Fridovichs (1991) estudaram a sensibilidade da aconitase às espécies reativas de oxigênio (superóxido) em mutantes de *E. coli* deficientes em SOD e demonstraram que os altos níveis de SOD normalmente presentes em células aeróbicas são elementos vitais na proteção da aconitase contra o ataque dessas espécies, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, sendo que a inativação da aconitase pelos radicais superóxido envolve o ataque oxidativo do aglomerado ferro-enxofre (4FE-4S). O estudo também sugere que essa inativação é um evento precoce no estresse oxidativo induzido por diferentes agentes tóxicos, uma vez que a aconitase é extremamente sensível a esse ataque oxidativo.

Determinadas condições como: estresse oxidativo, quebra da homeostase intracelular do cálcio e alteração do estado redox, podem levar a permeabilização inespecífica da membrana mitocondrial interna, com a formação de um estado conhecido como transição da permeabilidade mitocondrial (TPM), o que torna a membrana permeável a solutos de peso molecular até 1,5 kDa, impedindo a

ocorrência de fosforilação oxidativa (ZORATTI; SZABO, 1995; LEMASTERS et al., 1998). Todas essas condições que podem levar à transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPM) foram também observadas em nosso estudo. A TPM provavelmente exerce um papel fundamental na morte celular induzida por apoptose, pois provavelmente resulta na liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais, como o citocromo c, com consequente ativação da caspase 9 e caspase 3 (GREEN; REED, 1998; LIU et al., 1996; RAVAGNAN; ROUMIER; KROEMER, 2002).

O tipo de morte celular induzida pela cisplatina ainda é um assunto controverso. A cisplatina tem sido associada a dois diferentes tipos de morte celular: necrose e apoptose (WANG; LIPPARD, 2005). Embora os danos celulares mediados por espécies reativas de oxigênio tenham sido comumente associados à necrose, observações mais recentes sugerem o potencial papel da apoptose sob essas condições (TSURUYA et al., 2003). Alguns estudos propõem a apoptose como principal mecanismo de morte celular associado ao dano renal induzido pela cisplatina (KAUSHAL et al., 2001; HANIGAN; DEVARAJAN, 2003). Outros autores propõem a ocorrência de ambos os tipos de morte celular de maneira dose dependente, sendo que a necrose estaria associada a concentrações mais elevadas e a apoptose a concentrações mais baixas de cisplatina (BAEK et al., 2003; WANG; LIPPARD, 2005). No presente estudo avaliou-se a morte celular por apoptose através determinação da atividade da caspase -3, revelando resultados significativamente alterados para o grupo tratado com cisplatina. A ativação das caspases é tida como elemento chave na gênese da apoptose e numerosos estímulos ativam as caspases inclusive aqueles que ativam os receptores de morte localizados na membrana celular (caspase-8) e os que causam disfunção

mitocondrial (caspase-9) (SALVESEN; DIXIT, 1997). As caspases podem ser iniciadoras (caspases-8 e 9) ou executoras (caspases 3 e 7), sendo as executoras responsáveis por muitos mecanismos bioquímicos característicos da apoptose e que levam à fragmentação do DNA. Lieberthal et al. (1996) demonstraram que as características morfológicas da apoptose estavam presentes nas células dos túbulos proximais renais de ratos tratados com cisplatina, mas as caspases envolvidas não foram estudadas. Lau (1999) relatou que a caspase 3, e não a caspase 1, estava ativada em células epiteliais renais (LLC-PK1) tratadas com cisplatina. Schumer et al. (1992) e Zhan et al. (1999) demonstraram em seus estudos que a caspase 3 pode ser ativada pela caspase 9, a qual por sua vez é ativada pela liberação do citocromo c da mitocôndria. Estudos em células não renais revelaram que a caspase 3 é ativada por vários estímulos, incluindo ativação da caspase 8 mediada por receptor (SUN et al., 1999), ativação da caspase 9 (SCHULER et al., 2000), alterações na expressão das proteínas apoptóticas Bax e Bcl-2 (SAWADA et al., 2000), e ERO (YE et al., 1999). Kaushal et al. (2001) reportaram que a cisplatina induz ativação seletiva e diferencial das caspases, incluindo caspase-3 (executor) e os iniciadores caspase 8 (via não mitocondrial) e caspase 9 (ativada pelo citocromo c mitocondrial) em células do epitélio tubular renal. Nossos estudos comprovam esses achados em modelo *in vivo*.

A cardiolipina está presente em todas as células de mamíferos que contêm mitocôndrias, sendo mais abundante em células com elevado número de mitocôndrias, como os miócitos cardíacos e esqueléticos. Sua ocorrência limita-se quase que exclusivamente à membrana mitocondrial interna, tendo sido demonstrada a síntese *de novo* em mitocôndrias de células de mamíferos (HATCH, 2004). É necessária para que muitas proteínas mitocondriais exerçam

adequadamente suas funções, particularmente aquelas pertencentes à cadeia respiratória, estando também envolvida nos processos apoptóticos mediados pela mitocôndria (HAUFF; HATCH, 2006). O citocromo c é ligado à superfície externa da membrana mitocondrial interna, pela associação com a cardiolipina (SHIDOJI et al., 1999). A perda da interação molecular entre citocromo c e cardiolipina devido à peroxidação lipídica causa a liberação do citocromo c para o citosol, no processo apoptótico (PETROSILLO; RUGGIERO; PARADIES, 2003).

Uma das funções da cardiolipina é manter coesa a cadeia transportadora de elétrons (ZHANG; MILEYKOVSKAYA; DOWHAN, 2002). Os componentes dos complexos III e IV da cadeia respiratória formam um supercomplexo na membrana mitocondrial, através do qual prótons e elétrons se movem para produzir ATP. Para a formação desse supercomplexo é necessária uma forte coesão, o que é possível graças a cardiolipina. Também foi demonstrado que o translocador ADP/ATP está fortemente associado a seis moléculas de cardiolipina, condição essencial para que exerça sua função (HOFFMANN et al., 1994). Adicionalmente a essa função relacionada a fosforilação oxidativa, o metabolismo da cardiolipina também tem implicações na apoptose mediada pela mitocôndria (FARISS et al., 2005). Em experimentos com hamsters mutantes (com diminuída síntese de cardiolipina) foram encontradas alterações mitocondriais funcionais e morfológicas que incluem redução na produção de ATP e no consumo de oxigênio. Essas alterações foram atribuídas a danos na cadeia transportadora de elétrons, sendo que o complexo I apresentou maior disfunção (KAWASAKI et al., 1999). Nossos resultados são convergentes com esses dados, uma vez que a oxidação da cardiolipina foi detectada no grupo tratado com a cisplatina, muito provavelmente em decorrência do estresse oxidativo. Esse achado comprova os danos causados pelo fármaco na cadeia transportadora

de elétrons, bem como confirma o provável envolvimento da oxidação da cardiolipina no evento que precede a liberação do citocromo c no processo apoptótico, demonstrado no presente estudo pela aumentada atividade da caspase 3.

Os efeitos protetores de quelantes de ferro e de seqüestradores de radicais hidroxila em vários modelos de dano renal têm sido geralmente considerados como evidência para a participação do radical hidroxila no dano renal induzido por diferentes agentes, uma vez que o ferro é crítico na geração desses radicais via reações de Fenton e Haber-Weiss (WALKER; SHAH, 1988; PALLER; HEDLUND, 1988; SHAH; WALKER, 1988; PALLER; HOIDAL; FERRIS, 1984). Baliga et al. (1998) demonstraram *in vitro* e *in vivo* que a cisplatina induz um aumento da formação de radicais hidroxila e que o DMTU fornece significativa proteção contra falência renal aguda induzida por esse quimioterápico, sem contudo investigar os mecanismos envolvidos. Segundo esses autores, o ferro desempenha um papel importante no dano tecidual renal induzido pela cisplatina, sendo que este efeito é mediado pela formação de radicais hidroxila.

Em nossos estudos, o DMTU, um conhecido seqüestrador de radicais hidroxila, foi capaz de proteger os rins contra a falência renal aguda induzida pela cisplatina, o que pôde ser evidenciado pelos vários experimentos envolvendo (a) função renal, (b) função mitocondrial, (c) estresse oxidativo mitocondrial, (d) estado redox mitocondrial e (e) apoptose. Em todos esses ensaios, a administração prévia de DMTU forneceu proteção às mitocôndrias renais, como comprovado pelas diferenças significativas obtidas a partir da comparação entre o grupo cisplatina e o grupo DMTU + cisplatina.

A ação benéfica do DMTU com relação à citotoxicidade tem sido descrita em outros tecidos. Roychoudhury et al. (1996) relatam que o pré-tratamento com DMTU

em mitocôndrias de músculo liso da artéria pulmonar de bovinos preveniu a produção de radicais hidroxila e reduziu dramaticamente a lipoperoxidação induzida pelo H_2O_2 , sem no entanto, causar diminuição no ferro liberado. Cameron et al. (2001) reportam o efeito benéfico do DMTU com relação às complicações neurovasculares associadas ao *diabetes mellitus*, induzido experimentalmente em ratos com a administração de estreptozotocina.

Baek et al.(2003) salientam que o DMTU tem marcado efeito contra a morte celular por apoptose em células epiteliais do túbulo proximal renal, e nenhum efeito sobre a morte celular por necrose e concluem que no caso da cisplatina, a morte por necrose é mediada por H_2O_2 e a morte por apoptose (via mitocondrial) é mediada por radicais hidroxila. Nossos resultados estão em concordância com esta última hipótese. Um outro estudo (TSURUYA et al., 2003) destaca o efeito do DMTU na morte celular por apoptose mediada por receptores de morte, e mais precisamente na atividade da caspase 8, uma via não mitocondrial e propõem, como outros autores (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003), que as duas vias (mitocondrial e não mitocondrial) estão envolvidas na morte celular por apoptose resultante da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (Figura 6).

Nossos estudos destacam a importante participação da mitocôndria não só no processo de morte celular por apoptose, mas também em todas as demais alterações induzidas pela cisplatina e que levam ao desenvolvimento de falência renal aguda, demonstrando o envolvimento das espécies reativas de oxigênio, particularmente dos radicais hidroxila cujo seqüestro pelo DMTU é suficiente para prevenir o dano renal. É importante salientar o estudo de Tsuruya et al. (2003), no qual os autores demonstram que a concentração de platina, tanto em células epiteliais renais tubulares quanto em rins de animais tratados *in vivo*, se mantém

inalterada, independentemente do tratamento com DMTU, o que comprova a ação do antioxidante DMTU prevenindo os efeitos da cisplatina e não simplesmente impedindo sua chegada ao sítio de ação tóxica.

CONCLUSÕES

VI. CONCLUSÕES

Em nossos estudos demonstramos o papel central dos radicais hidroxila não só na apoptose por via mitocondrial, mas também numa série de eventos mitocondriais induzidos pela cisplatina em rim de rato, e que foram inibidos, todos, sem exceção, pelo seqüestrador de radicais hidroxila, DMTU. Dessa forma, fica clara a participação específica desses radicais nas alterações provocadas pela cisplatina na mitocôndria renal, como: comprometimento da síntese de ATP, oxidação de lipídeos e proteínas de membrana e depleção de defesas antioxidantes.

Tem sido descrito por diferentes autores que a administração de antioxidantes diminui a nefrotoxicidade, bem como a neurotoxicidade provocadas pela cisplatina em várias espécies animais. Em nosso estudo, o tratamento com o seqüestrador de radicais hidroxila, DMTU, mostrou-se eficiente na prevenção dos danos oxidativos provocados pela cisplatina em rim de ratos. Embora alguns autores considerem possível utilização terapêutica do DMTU no homem, há estudos que reportam a ocorrência de efeitos tóxicos tais como fetotoxicidade e aumento da permeabilidade alveolar à albumina em ratos tratados com este antioxidante. Apesar disso, devido à sua alta eficácia comparativamente a outros seqüestradores de radicais livres, é plausível supor-se que esta droga possa ser utilizada como modelo para o desenvolvimento de potentes seqüestradores de radicais hidroxila com menor nível de toxicidade e, portanto passíveis de uso terapêutico no homem, o que ajudaria grandemente a abordagem antioxidante na quimioterapia com cisplatina.

Em conclusão, com o presente estudo demonstramos o papel central da mitocôndria nos processos moleculares envolvidos no desenvolvimento da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina bem como a importância da terapia antioxidante na prevenção do dano epitelial tubular renal associado ao uso da cisplatina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ARANY, I.; SAFIRSTEIN, R. L. Cisplatin nephrotoxicity. **Semin. Nephrol.**, New York, v. 23, n. 5, p. 460-64, 2003.

ARCH, R. H.; THOMPSON, C. B. Lymphocyte survival: the struggle against death. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, Palo Alto, v. 15, p. 113-40, 1999.

BABU, E.; GOPALAKRISHNAN, V. K.; SRIGANTH, I. N.; GOPALAKRISHNAN, R.; SAKTHISEKARAN, D. Cisplatin induced nephrotoxicity and the modulating effect of glutathione ester. **Mol. Cell. Biochem.**, The Hague, v. 144, p. 7-11, 1995.

BADARY, O.A.; ABDEL-MAKSoud, S.; AHMED, W.A.; OWIEDA, G.H. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. **Life Sci.**, New York, v.76, n. 18, p. 2125-35, 2005.

BAEK, S. M.; KWON, C. H.; KIM, J. H.; 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.**, St Louis, v. 142, n. 3, p.178-86, 2003.

BAJORIN, D. F.; BOSL, G. J.; ALOCK, N. W.; NIEDZWIECKI, D.; GALLINA, E.; SHURGOT, B. Pharmacokinetics of *cis*-diamminedichloroplatinum (II) after administration in hypertonic saline. **Cancer Res.**, Chicago, v. 46, p. 5969-72, 1986.

BALIGA, R.; ZHANG, Z.; BALIGA, M. UEDA, N.; SHAH, S. V. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Kidney Int.**, New York, v.53, n.2, p.394-401, 1998.

BALIGA, R.; UEDA, N.; WALKER, P.D.; SHAH, S.V. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. **Drug Metab Rev.**, Philadelphia, v. 31, n.4, p. 971-97, 1999.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEHL, C.; DAVIS, J. B.; LESLEY, R.; SCHUBERT, D. Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. **Cell**, Cambridge, v. 77, p. 817-27, 1994.

BENZI, G.; MORETTI, A. Age-and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 19, p. 77-101, 1995.

BERNARDI, P.; PETRONILLI, V.; DI LISA, F.; FORTE, M. A mitochondrial perspective on cell death. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, v. 26, p. 112-7, 2001.

BERRY, M. N.; EDWARDS, A. M.; BARRITT, G. J. High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. In: BURDON, R. H.; KNIPPENBERG, P.H. (Eds). **Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Isolated hepatocytes preparation, properties and applications**, Amsterdam: Elsevier, 1991. cap. 2, p.15-58.

BOISDROM - CELLE, M.; LEBOUIL, A.; ALLAIN, P.; GAMELIN, E. Pharmacokinetic properties of platinum derivatives. **Bull. Cancer**, Paris, v. 88, p.14-19, 2001.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. **Oncol. Rep.**, Athens, v. 10, n. 6, p. 1663-82, 2003.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation off hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochem. J.**, London, v. 134, p. 707-16, 1973.

BOWSER, D. N.; PETROU, S.; PANCHAL, R. G.; SMART, M. L.; WILLIAMS, D. A. Release of mitochondrial Ca^{+2} via the permeability transition activates endoplasmic reticulum Ca^{+2} uptake. **FASEB J.**, Bethesda, v.16, p.1105-07, 2002.

BROOKES, P. S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J. L.; ANDERS, M. W.; SHEU, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, Bethesda, v. 287, p. C817–33, 2004.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (Eds). **Biochemical toxicology. A practical approach**, Oxford: IRL Press, 1987, cap.9, p. 217-54.

CAMERON, N. E.; TUCK, Z.; MCCABE, L.; COTTER, M. A. Effect of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes. **Diabetologia**, Berlin, v. 44, n. 9, p. 1161-91, 2001.

CASTILHO, R. F.; KOWALTOWSKI, A. J.; MEINICKE, A. R.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. E. Permeabilization of inner mitochondrial membrane by Ca^{+2} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 18, p. 479-86, 1995.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. **Adv. Enzymol.**, New York, v. 17, p. 65-134, 1956.

COHEN, S. M.; LIPPARD, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, New York, v. 67, p. 93-130, 2001.

CONKLIN, K.A. Cancer chemotherapy and antioxidants. **J. Nutr.**, Bethesda, v. 134, n. 11, p. 3201S-04S, 2004.

CORNELISON, T. L.; REED, E. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin e ormaplatin. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 50, p. 147-158, 1993.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem. J.**, London, v. 341, p. 233-49, 1999.

CVITKOVIC, E. Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. **Cancer Treat. Rev.**, London, v. 24, n. 4, p. 265-81, 1998.

DAUGAARD, G.; ABILDGAARD, U.; HOLSTEIN-RANTHLOU, N. H.; EYSAAC, P. P.; AMTORP, O.; DIKHOFF, T. G. Acute effect of cisplatin on renal hemodynamics and tubular function in dog kidneys. **Ren. Physiol.**, Basel, v. 9, p. 308-316, 1986.

DAVIES, S.M.K.; POLJAK, A.; DUNCAN, M.W.; SMYTHIE, G.A.; MURPHY, M.P. Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 31, p. 181-90, 2001.

DE GRAAF, T. W.; DE JONG, S.; DE VRIES, E. G.; MULDER, N. H. Expression of proteins correlated with the unique cisplatin-sensitivity of testicular cancer. **Anticancer Res.**, Athens, v. 17, p. 369-75, 1997.

DEDON, P. C.; BORCH, R. F. Characterization of reactions of platinum antitumor agents with biologic and nonbiologic sulfur-containing nucleophiles. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 36, p. 1955-64, 1987.

DEKANT, W.; VAMVAKAS, S. Biotransformation and Transport Membrane in Nephrotoxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 26, p. 309-334, 1996.

DRODGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, Washington, v. 82, p. 47-95, 2002.

DZEJA, P. P.; HOLMUHAMEDOV, E. L.; OZCAN, C.; PUCAR, D.; JAHANDIR, A.; TERZIC, A. Mitochondria: gateway for citoprotection. **Circ. Res.**, Baltimore, v. 89, n. 9, p. 744-46, 2001.

DZEJA, P. P.; REDFIELD M. M.; BURNETT, J. C.; TERZIC, A. Failing energetics in failing hearts. **Curr. Cardiol. Rep.**, Philadelphia, v. 2, p. 212-17, 2000.

EASTMAN, A. The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis. In: LIPPERT, B. (Ed) **Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1999. p.111-35.

EMAUS, R. K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J. J. Rhodamine-123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria - spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta**, Budapest, v. 850, p. 436-48, 1986.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

FARISS, M. W.; CHAN, C. B.; PATEL, M. VAN HOUTEN, B. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Mol. Interv.**, Bethesda, v. 5, n. 2, p. 94-111, 2005.

FAURSKOV, B.; BJERREGAARD, H. F. Effect of cisplatin on transepithelial resistance and ion transport in the A6 renal epithelial cell line. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p. 611-617, 1999.

FIELD, M.J.; BOSTROM, T.E.; SEOW, F.; GYORY, A.Z. COCKAYNE DJ. Acute cisplatin nephrotoxicity in the rat. Evidence for impaired entry of sodium into proximal tubule cells. **Pflugers Arch.**, Berlin, v. 414, n.6, p.647-50, 1989.

FIRST, M. R. Renal function. In: KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Clinical chemistry. Theory, analysis and correlation**. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1996. cap.26, p.346-358.

FOX, R.B. Prevention of granulocyte-mediated oxidant lung injury in rats by a hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea. **J Clin Invest.**, Ann Arbor, v. 74, n. 4, p.1456-64, 1984.

FROISSARD, P.; MONROCQ, H.; DUVAL, D. Role of glutathione metabolism in the glutamate-induced programmed cell death of neuronal-like PC12 cells. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 326, p. 93-9, 1997.

GALLET, P. F.; MAFTAH, A.; PETIT, J. M.; DENIS-GAY, M.; JULIEN, R. Direct cardiolipin assay in yeast using the red fluorescence emission of 10-N-nonyl acridine orange. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 15, n. 228, p. 113-19, 1995.

GARDNER, P. R.; FRIDOVICH, I. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 266, n. 29, p.19328-33, 1991.

GERSCHENSON, M.; PAIK, C.Y.; GAUKLER, E.L.; DIWAN, B.A.; POIRIER, M.C. Cisplatin exposure induces mitochondrial toxicity in pregnant rats and their fetuses. **Reprod. Toxicol.**, Elmsford, v. 15, p. 525-531, 2001.

GOLDSTEIN, R.S.; Biochemical heterogeneity and site-specific tubular injury. In: HOOK, J. B.; GOLDSTEIN, R. S. **Toxicology of the kidney**, New York, Raven Press, 1993. p.201-48.

GORDON, J. A.; GATTONE, V. H. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.250, n. 6, p. F991-98, 1986.

GORMAN, A.; MCGOWAN, A.; COTTER, T.G. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.404, p.27-33, 1997.

GRATTAGLIANO, I.; VENDEMIALE, G.; SABBÁ, C.; BUONAMICO, P.; ALTOMARE, E. Oxidation of circulating proteins in alcoholics: role of acetaldehyde and xantine oxidase. **J. Hepatol.**, Oxford, v.25, p.28-36, 1996.

GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, Washington, v.281, p.1309-12, 1998.

GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHEREIER, S. Ca^{+2} induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca^{+2} – stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry**, Washington, v. 38, p. 13279-87, 1999.

GRUBB, A. Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biologic fluids. **Clin. Nephrol.**, Munchen-Deisenhofen, v. 38, n.1, p. S20-7, 1992.

GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 899, p. 136-47, 2000.

HALABE, A.; WONG, N. L. M.; SUTTON, R. A. L. Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. **Nephron**, Basel, v. 57, p. 197-200, 1991.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics - what they are and how to evaluate them. **Adv. Pharmacol.**, New York, v. 38, p. 3-20, 1997.

HANIGAN, M. H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther.**, Athens, v. 1, p. 47-61, 2003.

HARTMANN, A. E. Nitrogen metabolites and renal function. In: MACCLATCHEY, K. D. **Clinical laboratory medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. cap.16, p. 371-85.

HATCH, G. M. Cell biology of cardiac mitochondrial phospholipids. **Biochem. Cell. Biol.**, Ottawa, v. 82, n. 1, p. 99-112, 2004.

HATCH, G.M.; MCCLARTY, G. Regulation of cardiolipin biosynthesis in H9c2 cardiac myoblasts by cytidine 5'-triphosphate. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 42, p. 25810-16, 1996.

HAUFF, K. D.; HATCH, G. M. Cardiolipin metabolism and Barth Syndrome. **Prog. Lipid Res.**, Elmsford, v.45, n. 2, p. 91-101, 2006.

HENRY, J.B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. In: **Avaliação da função renal e da água, eletrólitos e balanço ácido-básico**. 18. ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 135-58.

HERAK-KRAMBERGER, C. M.; SABOLIC, I. The integrity of renal cortical brush-border and basolateral membrane vesicles is damaged *in vitro* by nephrotoxic heavy metals. **Toxicology**, Amsterdam, v.156, n. 2-3, p.139-47, 2001.

HODGSON, E.; LEVI, P. E. Susceptibility of the renal system. In: HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology**. 3rd edition. New York: John Wiley & Sons, 2004. cap. 15, p. 273-78.

HOFFMANN, B.; STOCKL, A.; SCHLAME, M.; BEYER, K.; KLINGENBERG, M. The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 3, p. 1940-4, 1994.

HOFMAN, W.; ROSSMULLER, B.; GUDER, W. G. a new strategy for characterizing proteinuria and haematuria from single pattern of defined proteins in urine. **Eur. J. Clin. Chem. Biochem.**, Berlin, v. 30, p. 707-12, 1992.

HUTCHISON, F.N.; PEREZ, E.A.; GANDARA, D.R.; LAWRENCE, H.J.; KAYSEN GA. Renal salt wasting in patients treated with cisplatin. **Ann Intern Med.**, Philadelphia, v.108, n.1, p.21-5, 1988.

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.**, London, v. 38, n. 4, p. 333-41, 2004.

ISHIDA, S.; LEE, J.; THIELE D. J.; HERSKOWITZ, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.99, n. 22, p. 14298-302, 2002.

ISHIKAWA, T.; ALI-OSMAN, F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.268, p.20116-25, 1993.

JABS, T.; DIETRICH, R .A.; DANG, J.L. Initiation of runaway cell death in a *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. **Science**, Washington, v.273, p.1853-6, 1996.

JACOBSON, M.D.; RAFF, M.C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. **Nature**, London, v. 374, p. 814-6, 1995.

JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet**, London, v. 344, p. 769-78, 1994.

KADIKOYLU, G.; BOLAMAN, Z.; DEMIR, S.; BALKAYA, M.; AKALIN, N.; ENLI, Y. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. **Hum. Exp. Toxicol.**, London, v. 23, n.1, p.29-34, 2004.

KANNAN, K.; JAIN, S. K. Oxidative stress and apoptosis. **Pathophysiology**, Amsterdam, v. 7, p.153-63, 2000.

KAUSHAL, G. P.; KAUSHAL, V.; HONG, X.; SHAH, S. V. Role and regulation of caspases in cisplatin induced injury to renal tubular epithelial cells. **Kidney Int.**, New York, v. 60, p. 1726-36, 2001.

KAWAI, Y.; NAKAO, T.; KUNIMURA, N.; KOHDA, Y.; GEMBA, M. Relationship of intracellular calcium and oxygen radicals to cisplatin-related renal cell injury. **J. Pharmacol. Sci.**, v. 100, n. 1, p. 65-72, 2006.

KAWASAKI, K.; KUGE, O.; CHANG, S. C.; HEACOCK, P. N.; RHO, M.; SUZUKI, K.; NISHIJIMA, M.; DOWHAN, W. Isolation of a chinese hamster ovary (CHO) cDNA encoding phosphatidylglycerophosphate (PGP) synthase, expression of which corrects the mitochondrial abnormalities of a PGP synthase-defective mutant of CHO-K1 cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, n. 3, p. 1828-34, 1999.

KINTZEL, P. E. Anticancer drug-induced kidney disorders. Incidence, prevention and management. **Drug Saf.**, Auckland, v. 24, n. 1, p. 19-38, 2001.

KLUCK, R.M.; BOSSY-WETZEL, E.; GREEN, D.R.; NEWMAYER, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl regulation of apoptosis. **Science**, Washington, v. 275, p. 1132-36, 1997.

KOBERLE, B.; GRIMALDI, K.A.; SUNTERS, A.; HARTLEY, J.A.; KELLAND, L.R.; MASTERS, J.R. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumour cells. **Int. J. Cancer**, New York, v. 70, p. 551-5, 1997.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; GRIJALBA, M. T.; BECHARA, E. J.; VERCESI, A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.271, n. 6, p. 2929-34, 1996.

KOWALTOWSKI, A.J.; NETTO, L.E.S.; VERCESI, A.E. The thiol specific antioxidant enzyme prevents mitochondrial permeability transition: Evidence for the reactive oxygen species in this mechanism. **J. Biol. Chem**, Baltimore, v. 273, p. 12766-9, 1998.

KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 26, p. 463-71, 1999.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E; FISKUM, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. **Cell Death Differ.**, London, v.10, p. 903-10, 2000.

KRUIDERING, M.; DE WATER, B. V.; DE 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.**, Bethesda, v.280, p.638-49, 1997.

LAMSON, D. W.; BRIGNALL, M. S. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. **Altern. Med. Rev.**, Sandpoint, v. 4, n. 5, p. 304-29, 1999.

LAU, A. H. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. **Kidney Int.**, New York, v. 56, p. 1295-8, 1999.

LEE, R. H.; SONG, J. M.; PARK, M. Y.; KANG, S. K.; KIM, Y. K.; JUNG, J. S. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 1013-23, 2001.

LEIST, M.; SINGLE, B.; CASTOLDI, A. F.; KUHNLE, S.; NICOTERA, P. Intracellular ATP concentration: a switch deciding between apoptosis and necrosis. **J. Exp. Med.**, New York, v. 185, p. 1481-6, 1997.

LEMASTERS, J. J.; NIEMINEN, A. L.; QIAN, T.; TROST, L. C.; ELMORE, S. P.; NISHIMURA, Y.; CROWE, R. A.; CASCIO, W. E.; BRADHAM, C. A.; BRENNER, D. A.; HERMAN, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1366, n. 1-2, p. 177-96, 1998.

LEMASTERS, J. J.; QIAN, T.; BRADHAM, C. A.; BRENNER, D. A.; CASCIO, W. E.; TROST, L. C.; NISHIMURA, Y.; NIEMINEN, A. L.; HERMAN, B. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v. 31, n. 4, p. 305-19, 1999.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHardJO, I.; SRINIVASULA, S. M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E. S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiate apoptic protease cascade. **Cell**, Cambridge, v. 91, p. 479-89, 1997.

LIEBERTHAL, W.; LEVINE, J. S. Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 271, n. 3 Pt 2, p. F477-88. 1996.

LI-PING, X.; SKREZEK, C.; WAND, H.; REIBE, F. Mitochondrial dysfunction at the early estage of cisplatin-induced acute renal failure in rats. **J. Zhejiang Univ. Sci.**, Hangzhou, v. 1, n. 1, p. 91-6, 2000.

LIPPARD, S. J. Chemistry and molecular biology of cisplatin anticancer drugs. **Pure Appl.Chem.**, London, v. 59, p. 731-42, 1987.

LIU, X.; KIM, C. N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, Cambridge, v. 86, p. 147-57, 1996.

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 256, p. 19-26, 2000.

LUND, B. O.; MILLER, D. M.; WOODS, J. S. Studies on Hg (II)- induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 45, n. 10, p. 2017-24, 1993.

MASINI, A.; GALLES, D.; GIOVANNINI, F.; TRENTI, T.; CECCARELLI, D. Membrane potential of hepatic mitochondria after acute cocaine administration in rats – the role of mitochondrial reduced glutathione. **Hepatology**, Baltimore, v. 25, n. 2, p. 385-90, 1997.

MCCONKEY, D. J.; ORRENIUS, S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 239, p. 357-66, 1997.

MEGYESI, J.; SAFIRSTEIN, R. L.; PRICE, P. M. Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced renal failure. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 101, p. 777-82, 1998.

MILLS, E. M.; GUNASEKAR, P. G.; PAVLAKOVIC, G.; ISOM, G. E. Cyanide-induced apoptosis and oxidative stress in differentiated PC12 cells. **J. Neurochem.**, Oxford, v.67, p.1039-46, 1996.

MITCHELL, P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, London, v. 3, p. 445-502, 1966.

MIYASAKI, J.; KAWAI, K. Prevention and management of nephrotoxicity from anti-cancer agents. **Nippon Rinsho.**, Osaka, v. 61, n. 6, p. 973-7, 2003.

NAKAGAWA, Y.; TAYAMA, K. Mechanism of mitochondrial dysfunction and cytotoxicity induced by tropolones in isolated rat hepatocytes. **Chem. Biol. Interact.**, Amsterdam, v. 6, n. 116, p. 45-60, 1998.

NERI, B.; CINI-NERI, G.; BARTALUCCI, S.; BANDINELLI, M. Protective effect of L-carnitine on cardiac metabolic damage induced by doxorubicin in vitro. **Anticancer Res.**, Athens, v.6, n.4, p.659-62, 1986.

NICOTERA, P.; LEIST, M.; FERRANDO-MAY, E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v. 13142, p.102-3, 1998.

NISHIKAWA, M.; NAGATOMI, H.; CHANG, B.J.; SATO, E.; INOUE, M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.387, n.1, p. 78-84, 2001.

ORELLANA, M.; RODRIGO, R.; THIELEMANN, L.; GUAJARDO, V. Bile duct ligation and oxidative stress in the rat: effects in liver and kidney. **Comp. Biochem. Physiol.**, Oxford, v. 126, p. 105-11, 2000.

ORRENIUS, S.; McCONKEY, D. J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{+2} in toxic cell killing. **Trends Pharmacol. Sci.**, Amsterdam, v. 10, p. 281-5, 1989.

PALLER, M. S.; HEDLUND, B. E. Role of iron in postischemic renal injury in the rat. **Kidney Int.**, New York, v. 34, p. 474-80, 1988.

PALLER, M. S.; HOIDAL, J. R.; FERRIS, T. F. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 74, p. 1156-64, 1984.

PEDERSEN, P. L.; GRENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMANTE, E. Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver-derived tissues. **Methods Cell Biol.**, New York, v. 20, p. 411-81, 1978.

PETIT, J. M.; MAFTAH, A.; RATINAUD, M. H.; JULIEN, R. 10-*N*-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 209, p. 267–73, 1992.

PETROSILLO G.; RUGGIERO, F. M.; PARADIES, G. Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. **FASEB J.**, Bethesda, v. 17, p. 2202-8, 2003.

RAFFRAY, M.; COHEN. G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 75, p. 153-77, 1997.

RAFIQUE, R.; SCHAPIRA, A. H. V.; COOPER, J. M. Sensivity of respiratory chain activities to lipid peroxidation: effect of vitamina E deficiency. **Biochem. J.**, London, v. 357, p. 887-92, 2001.

RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **J. Cell Physiol.**, New York, v. 192, p. 131-7, 2002.

REINHECKEL, T.; KORN, S.; MOHRING, S.; AUGUSTIN, W.; HALANGK, W.; SCHILD, L. Adaptation of protein carbonyl detection to the requeriments of proteome analysis demonstrated for hypoxia/reoxygenation in isolated rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 376, p. 59-65, 2000.

ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer**, New York, v.55, p.2303-16, 1985.

ROSENBERG, B. Platinum antitumor agents. In: SPIRO, T. G. (Ed.). **Nucleic Acid-Metal Ion Interactions**. New York: John Wiley & Sons, 1980. vol. 1, p. 1-29.

ROSENBERG, B.; MANSY, S.; THOMSON, A. J. Binding of *cis*- and *trans*-dichlorodiammineplatinum (II) to nucleosides.I. Location of the binding sites. **J. Am. Chem. Soc.**, Washington, v. 95, p. 1633-40, 1973.

ROYCHOUDHURY, S.; GHOSH, S. K.; CHAKRABORTI, T.; CHAKRABORTI, S. H₂O₂ - induced lipoperoxidation in mitochondria of pulmonary vascular smooth muscle tissue and its modification by DFO, DMTU and DIDS. **Indian J. Exp. Biol.**, New Delhi, v. 34, n. 12, p. 1220-30, 1996.

SADZUKA, Y.; SHOJI, T.; TAKINO, Y. Effects of cisplatin on the activities of enzymes, which protect against lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 43, p. 1872-5, 1992.

SALVESEN, G, S.; DIXIT, V. M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, Cambridge, v. 91, n. 4, p. 443-6, 1997.

SANDSTROM, P. A.; TEBBEY, P. W.; VANCLEAVE, S.; BUTKE, T. M. Lipid hydroperoxides induce apoptosis in T cells displaying a HIV-associated glutathione peroxidase deficiency. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, p. 798-801, 1994.

SANTOS, A. C.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, N. A. G.; MINGATTO, F. E.; CURTI, C. Hg(II)-induced renal cytotoxicity: in vitro and in vivo implications for the bioenergetic and oxidative status of mitochondria. **Mol. Cell Biochem.**, The Hague, v.177, n. 1-2, p. 53-9, 1997.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. **Science**, Washington, v. 283, p. 1488-93, 1999.

SAWADA, M.; NAKASHIMA, S.; BANNO, Y.; YAMAKAWA, H.; HAYASHI, K.; TAKENAKA, K.; NISHIMURA, Y.; NOZAWA, Y. Ordering of ceramide formation, caspase activation and Bax/Bcl-2 expression during etoposide-induced apoptosis in C6 glioma cells. **Cell Death Dif.**, London, v. 7, p. 761-72, 2000.

SCARPA, A. Measurements of cation transport with metallochromic indicators. In: FLEISHER, S.; PACKER, L. **Methods in enzymology**, New York : Academic Press, 1979. v. 56, p. 301-52.

SCHNELLMANN, R. G. Toxic Responses of the kidney. In: KLAASSEN, C.D. **Casarett & Doull's toxicology. The basic science of poisons**. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001. cap. 14, p. 491-514.

SCHULER, M.; BOSSY-WETZEL, E.; GOLDSTEIN, J. C.; FITZGERALD, P.; GREEN, G. R. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 275, p. 7337–42, 2000.

SCHUMER, M.; COLOMBEL, M. C.; SAWCZUK, I. S.; GOBE, G.; CONNOR, J.; O'TOOLE, K. M.; OLSSON, C. A.; WISE, G. J.; BUTTYAN, R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.140, n. 4, p. 831-8, 1992.

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

SENTURKER, S.; TSCHIRRET-GUTH, R.; MORROW, J.; LEVINE, R.; SHACTER, E. Induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs without generation of reactive oxygen species. **Arch. Biochem. Biophys.**, San Diego, v.397, p.262-72, 2002.

SHAH, S.V.; WALKER, P.D. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in glycerol-induced acute renal failure. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 255, p. F438-43, 1988.

SHAN, X.Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, Oxford, v. 47, p. 61-67, 1990.

SHERMAN, S. E.; LIPPARD, S. J. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. **Chem. Rev.**, Washington, v. 87, p. 1153-81, 1987.

SHEU, S. S.; NAUDURI, D.; ANDERS, M. W. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1762, n. 2, p. 256-65. 2006.

SHIDOJI, Y.; HAYASHI, K.; KOMURA, S.; OHISHI, N.; YAGI, K. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 264, n. 2, p. 343-7, 1999.

SKULACHEV, V. P. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. **Q. Rev. Biophys.**, London, v. 29, n. 2, p. 169-202, 1996.

SORDHAL, L. A.; JOHNSON, C.; BLALOCK, L.R.; SCHWARTZ, A. The mitochondrion. **Meth. Pharmacol.**, Bethesda, v. 1, p. 247-86, 1971.

SQUID, A. K.; TACKA, K. A.; GALVAN, K. A.; PENEFSKY, H. S. Immediate effects of anticancer drugs on mitochondrial oxygen consumption. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 66, n. 6, p. 977-87, 2003.

SOUZA, C. A.; VIGORITO, A. C.; ARANHA, F. J. P.; OLIVEIRA, G. B.; EID, K. A. B.; RUIZ, M. A. Terapêutica citoprotetora em paciente tratados com quimio e/ou radioterapia antineoplásica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p.123-8, 2000.

STOCCHI, V.; CUCCHIARINI, L.; MAGNANI, M.; CHIARANTINI, L. PALMA, P.; CRESCENTINI, G. Simultaneous extraction and reverse-phase high-performance liquid chromatographic determination of adenine and pyridine nucleotides in human red blood cells. **Anal. Biochem.**, New York, v. 146, n. 1, p. 118-24, 1985.

SUEISHI, K.; MISHIMA, K.; MAKINO, K.; ITOH, Y.; TSURUYA, K.; HIRAKATA, H.; OISHI, R. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Eur. J. Pharmacol.** Amsterdam, v. 451, n. 2, p. 203-8, 2002.

SUN, E. C.; CURTIS, R.; MELBYE, M.; GOEDERT, J. J. Salivary gland cancer in the United States. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 8, n.12, p.1095-100, 1999.

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, Washington, v. 267, p. 1456-62, 1995.

TIETZE, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. **Anal. Biochem.**, New York, v. 27, p. 502-22, 1969.

TRUMP, B. F.; BEREZESKY, J.K. Calcium-mediated cell injury and cell death. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, p. 219-228, 1995.

TSURUYA, K.; TOKUMOTO, M.; NINOMIYA, T.; HIRAKAWA, M.; MASUTANI, K.; TANIGUCHI, M.; FUKUDA, K.; KANAI, H.; HIRAKATA, H.; IIDA, K. Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. **Am. J. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 285, p. F208-18, 2003.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiol.**, Oxford, v. 552, n. 2, p. 335-44, 2003.

TURRENS, J. F. Superoxide production by mitochondrial respiratory chain. **Biosci. Rep.**, New York, v. 17, p. 3-8, 1997.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochem. J.**, London, v. 191, p. 421-27, 1980.

VAN HOORN, E. C.; SUTMULLER-OOMS, M.; DE VRIJ, G.; VAN LEEUWEN, P. A.; VAN NORREN, K. A fast and accurate method to measure both oxidative stress and vitality in a single organ slice. **Anal. Biochem.**, New York, v. 320, n. 1, p. 82-7, 2003.

VERCESI, A. E.; REYNAFARJE, B.; LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of H^+ ejection and Ca^{2+} uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 253, p. 6379-85, 1978.

VERCESI, A. E. Ca^{2+} transport and oxidative damage of mitochondria. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 26, p. 441-57, 1993.

VERCESI, A. E. KOWALTOWSKI, A. J.; GRIJALBA, M. T.; EININKE, A. R.; CASTILHO, R. F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Biosci. Rep.**, New York, v. 17, p. 43-52, 1997.

VERCESI, A. E.; HOFFMANN, M. E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: The role of calcium. In: JONES, D. P.; LASH, L. H. (Eds.). **Methods in Toxicology**, New York: Academic Press, 1993. p. 256-65.

VOTYAKOVA, T. V.; REYNOLDS, I. J. $\Delta\Psi(m)$ -Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. **J. Neurochem.**, Oxford, v. 79, n. 2, p. 266-77, 2001.

WALKER, P. D.; SHAH, S. V. Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 81, p. 334-41, 1988.

WALLACE, K. B.; STARKOV, A. A. Mitochondrial targets of drug toxicity. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 40, p. 353-88, 2000.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat. Rev. Drug Discov.**, London, v. 4, n. 4, p. 307-20, 2005.

WANG, P.; SONG, J. H.; SONG, D. K.; ANG, J.; HAO, C. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. **Cell Signal.**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 1528-35, 2006.

- WASIL, M.; HALLIWELL, B.; GROOTVELD, M.; MOORHOUSE, C.P.; HUTCHISON, D.C.; BAUM, H. The specificity of thiourea, dimethylthiourea and dimethyl sulphoxide as scavengers of hydroxyl radicals. Their protection of alpha 1-antiproteinase against inactivation by hypochlorous acid. **Biochem J.**, London, v.243, n.3, p.867-70, 1987.
- WEIJL, N. I.; HOPMAN, G. D.; WIPKINK-BAKKER, A.; LENTJES, E. G.; BERGER, H. M.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. **Ann. Oncol.**, London, v. 9, n. 12, p. 1331-7, 1998.
- WERNER, M.; COSTA, M. J. Nephrotoxicity of xenobiotics, **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 237, p. 107-54, 1995.
- WILSON, M. R. Apoptosis: unmasking the executioner. **Cell Death Differ.**, London, v. 5, p. 646-52, 1998.
- WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, London, v. 284, p. 555-6, 1980.
- YAN, L-J; LEVINE, R. L.; SOHAL, R. S. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. **Biochemistry**, Washington, v.94, p.11168-72, 1997.
- YANG, J.; LIU, X.; BHALLA, K.; KIM, C. N.; IBRADO, A. M.; CAI, J.; PEN, T-I.; YANG, J. C.; CORTOPOSSI, G. A. Induction of the mitochondrial permeability transition causes releaes of the apoptogenic factor cytochrome c. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 24, p. 624-31, 1997.
- YE, J.; WANG, S.; LEONARD, S. S.; SUN, Y.; BUTTERWORTH, L.; ANTONIN, J.; DING, M.; ROJANASAKUL, Y.; VALLYATHAN, V.; CASTRANOVA, V.; SHI, X. Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis. **J. Biol. Chem**, Baltimore, v. 274, p. 34974–80, 1999.
- ZETTL, U. K.; MIX, E.; ZIELASEK, J.; STANGEL, M.; HARTUNG, H. P.; GOLD, R. Apoptosis of myelin-reactive T cells induced by reative oxigen and nitrogen intermediates *in vitro*. **Cell Immunol.**, Orlando, v. 178, p. 1-8, 1997.

ZHAN, Y.; VAN DE WATER, B.; WANG, Y.; STEVENS, J. L. The roles of caspase-3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells. **Oncogene**, Basingstoke, v. 18, n. 47, p. 6505-12, 1999.

ZHANG, J. G; LINDUP, W. E. Cisplatin nephrotoxicity: decreases in mitochondrial protein sulphydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 47, p. 1127-35, 1994.

ZHANG, J. G; LINDUP, W. E. Role of calcium in cisplatin-induced cell toxicity in rat renal cortical slices. **Toxicology In Vitro**, Oxford, v. 10, p. 205-9, 1996.

ZHANG, L.; YU, L.; YU, C. A. Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, p. 33972-6, 1998.

ZHANG, M.; MILEYKOVSKAYA, E.; DOWHAN, W. Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 277, n. 46, p. 43553-6, 2002.

ZHENG, W.; SEAN, R.; GRAZIANO, J. H. Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity. **Brain Res.**, Amsterdam, v. 799, p. 334-42, 1998.

ZORATTI, M.; SZABO, I. The mitochondrial permeability transition. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 42, p. 1-44, 1995.

ZUCKER, B.; HANUSCH, J.; BAUER, G. Glutathione depletion in fibroblasts is the basis for apoptosis-induction by endogenous reactive oxygen species. **Cell Death Differ.**, London, v. 4, p. 388-95, 1997.

ZWELLING, L. A.; KOHN, L. W. Mechanism of action of cisdiammineplatinum-II. **Cancer Treat. Rep.**, Bethesda, v.63, p. 1439, 1979.

ANEXOS

ARTIGOS COMPLETOS

ANEXO 1

Data: Thu, 26 Oct 2006 04:46:06 -0400 (EDT)
De: bolt@ifado.de
Para: acsantos@fcfrp.usp.br, neife@fcfrp.usp.br
Assunto: Archives of Toxicology - Decision on Manuscript ID ATOX-06-0130

26-Oct-2006

Dear Prof. Santos:

Manuscript ID ATOX-06-0130 entitled "Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria." which you submitted to the Archives of Toxicology, has been reviewed

The reviewer(s) have recommended publication, but also suggest some revisions to your manuscript. Therefore, I invite you to respond to the reviewer(s)' comments and revise your manuscript.

Once again, thank you for submitting your manuscript to the Archives of Toxicology and I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Prof. Hermann Bolt
Editor-in-Chief, Archives of Toxicology

Data: Mon, 30 Oct 2006 14:38:03 -0500 (EST)
De: graf@ifado.de
Para: acsantos@fcfrp.usp.br, neife@fcfrp.usp.br
Assunto: Archives of Toxicology - Manuscript ID ATOX-06-0130.R1

30-Oct-2006

Dear Prof. Santos,

Your manuscript entitled "Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria." has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Archives of Toxicology.

Your revised manuscript ID is ATOX-06-0130.R1.

Sincerely,
Prof. Hermann Bolt
Editor-in-Chief, Archives of Toxicology

Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria.

Journal:	<i>Archives of Toxicology</i>
Manuscript ID:	ATOX-06-0130.R1
Manuscript Type:	Original Investigation
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Santos, Neife Aparecida Guinaim; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas Catão, Cícera Simone; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas Martins, Nadia Maria; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas Pires Bianchi, Maria Lourdes; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas Curti, Carlos; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Departamento de Física e Química Santos, Antonio Cardozo; Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas
Keywords:	cisplatin, mitochondria, nephrotoxicity, ROS

Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria.

Santos NAG¹, Catão CS¹, Martins NM¹, Curti C², Pires Bianchi ML¹, Santos AC¹

¹ Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas and ² Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Av do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to: Antonio Cardozo dos Santos. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP , Av do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil (telephone: 551636024725, fax: 551636024725, e-mail: acsantos@fcfrp.usp.br)

ABSTRACT

The clinical use of cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) is highly limited by its nephrotoxicity. The precise mechanisms involved in cisplatin-induced mitochondrial dysfunction in kidney have not been completely clarified. Therefore, we investigated *in vivo* the effects of cisplatin on mitochondrial bioenergetics, redox state and oxidative stress as well as the occurrence of cell death by apoptosis in cisplatin-treated rat kidney. Adult male Wistar rats weighing 200 to 220g were divided into 2 groups. The control group (n=8) was treated only with an intraperitoneal (i.p.) injection of saline solution (1ml/100g body weight), and the cisplatin group (n=8) was given a single injection of cisplatin (10 mg/kg body weight, i.p.). Animals were sacrificed 72 hours after the treatment. The cisplatin group presented acute renal failure characterized by increased plasmatic creatinine and urea levels. Mitochondrial dysfunction was evidenced by the decline in membrane electrochemical potential and the substantial decrease in mitochondrial calcium uptake. The mitochondrial antioxidant defense system was depleted, as shown by decreased GSH and NADPH levels, GSH/GSSG ratio and increased GSSG level. Moreover, cisplatin induced oxidative damage to mitochondrial lipids, including cardiolipin (CL), and oxidation of mitochondrial proteins, as demonstrated by the significant decrease of sulfhydryl protein (P-SH) concentrations and increased levels of carbonylated proteins. Additionally, aconitase activity, which is essential for mitochondrial function, was also found to be lower in the cisplatin group. Renal cell death via apoptosis was evidenced by the increased caspase-3 activity. Results show the central role of mitochondria and the intensification of apoptosis in cisplatin-induced acute renal failure, highlighting a number of steps that might be targeted to minimize cisplatin-induced nephrotoxicity.

Key words: cisplatin; mitochondria; nephrotoxicity; reactive oxygen species (ROS)

INTRODUCTION

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) is one of the most effective chemotherapeutic agents, and it is used in the management of a variety of tumors, including testicular cancer, ovarian germ cells tumors, epithelial ovarian cancer, head and neck cancer, bladder cancer, endometrial cancer, cervical cancer, non-small cell lung cancer, malignant melanoma, penile cancer and adrenocortical carcinoma. Its therapeutic activity is dose dependent, but the exploitation of its full therapeutic potential is limited predominantly due to its nephrotoxicity (Cvitkovic, 1998; Hanigan and Devarajan, 2003).

Many studies have shown that cisplatin causes apoptotic cell death in renal tubular cells, but the underlying injury mechanisms remain unclear. It has been postulated that the cytotoxic effects of cisplatin occur via several mechanisms, including the inhibition of protein synthesis, mitochondrial injury, and DNA damage, leading ultimately to the activation of programmed cell death pathways in tumor cells, as well as in renal tubular cells (Park et al., 2001). It has been proposed that mitochondrial dysfunction may be a very early event in cisplatin-induced acute renal failure in rats (Li-ping et al., 2000). Although the molecular mechanisms responsible for this injury are not yet fully elucidated, several lines of evidence suggest that reactive oxygen species (ROS) or free radicals are involved in the nephrotoxicity of cisplatin (Somani et al., 2000; Baek et al., 2003). Mitochondria are the main target for many xenobiotics. Oxidative stress and mitochondrial oxidative damage have been implicated in the etiology of several toxic effects resulting from exposure to many anticancer drugs, including the platinum compounds. Therefore, investigation should be conducted to fully understand the role that oxidative stress plays in the development of chemotherapy-induced adverse effects (Souid et al., 2003; Conklin, 2004). Understanding the molecular mechanisms by which cisplatin induces nephrotoxicity is of critical importance for designing less toxic and more efficient platinum-based drugs, which could greatly contribute to the improvement in chemotherapy of patients with cancer.

The purpose of this study was to examine *in vivo* the exact molecular mechanisms involving renal mitochondria, which underlie cisplatin-induced nephrotoxicity. These events were studied by assessing the effects of cisplatin on renal mitochondrial function as well as alterations on redox state and the implication of oxidative stress and apoptotic cell death.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. *Cis*-Diammineplatinum (II) dichloride (cisplatin), rhodamine 123, rotenone, ADP, ATP and NADPH were obtained from Sigma-Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other reagents were analytical grade. Heparin (liquemine®) was obtained from Roche (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Sodium thiopental was obtained from Cristalia (Itapira, SP, Brazil). All solutions were prepared with ultra-pure water purified by a Milli-Q Gradient system (Millipore, Bedford, USA). Cisplatin solution was prepared in saline.

Animals. Research protocols were in strict accordance with the “Ethical principles and guidelines for experiments on animals” of the Swiss Academy of Medical Sciences and Swiss Academy of Sciences.

Animals Treatment. Male Wistar rats (200-220 g) were housed 4 per cage and were maintained in a 12-hour light/dark cycle in a temperature and humidity controlled facility. Standard rat chow and water were provided *ad libitum*. Animals were divided into 2 groups, with 8 rats in each group. The control group (vehicle) received a single intraperitoneal (i.p.) injection of saline solution (1ml/100g body weight). The cisplatin group was given a single intraperitoneal injection of cisplatin (10 mg/kg body weight). All animals were previously anaesthetized with an intraperitoneal injection of 60 mg sodium pentobarbitone/Kg body weight (Berry et al., 1991) and killed by cervical dislocation after 72 hours. Blood samples were collected using heparin as anticoagulant for the measurement of plasma blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinine.

Preparation of Mitochondrial Fraction. Rats were sacrificed and the kidneys were immediately removed and washed in cold saline solution. Medullae was removed and the remaining cortex was cut into pieces, then minced and homogenized with a Potter-Elvehjem (three times for 15 seconds, 1-minute intervals) in a medium containing 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.2% bovine serum albumin and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4. Kidney mitochondria were isolated by standard differential centrifugation (Pedersen et al., 1978). The homogenate was centrifuged at 755 g for 5 minutes and the resulting supernatant was centrifuged at 13,300 g for 10 minutes. The pellet was resuspended in 10 ml of medium containing 250 mM sucrose, 0.1 mM EGTA, 0.14% bovine serum albumin and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4, and centrifuged at 13,300 g for 10 minutes. All procedures of centrifugation were performed at 4°C. The mitochondrial pellet obtained was resuspended in 1 ml medium containing 160 mM KCl and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4. Mitochondrial suspension was kept on ice and used within 3 hours. Protein concentration was determined by the biuret method with bovine serum albumin as a standard.

Mitochondria Oxidative Metabolism. Oxygen consumption was assayed with a polarographic Clark-type oxygen electrode (Gilson Medical Electronics, Middleton, WI, USA) at 30°C in a final volume of 1.5 ml. Mitochondria were energized with 10 mM potassium succinate (+ 5 µM rotenone) in a respiration medium containing 160 mM KCl, 8.5 mM potassium phosphate, 0.5 mM EGTA, 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4. One mg of mitochondrial protein was used and the state-3 respiration was induced with 0.4 µmol ADP (Santos et al, 1997). The phosphorylative capacity (ADP/O ratio and RCR) was determined from the polarographic traces as previously described (Chance and Williams, 1956).

Mitochondrial Membrane Potencial. The electrical potential of the mitochondrial inner membrane was assessed by monitoring the mitochondrial uptake of rhodamine 123 in a fluorescence spectrophotometer (F-2500, Hitachi) operating at an emission wavelength of 535 nm and an excitation wavelength of 505 nm. One mg of mitochondrial protein was used and

the incubation medium had the following composition: 160 mM KCl, 8.5 mM potassium phosphate, 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4, added of 5 μ M rotenone and 5 μ M rhodamine 123. The respiratory substrate was 10 mM succinate. The reaction was initiated with 0.4 μ mol ADP and the assay was performed at 30°C (Emaus et al., 1986).

Ca⁺² Influx Measurement. The kinetics of Ca⁺² uptake by mitochondria was studied by a spectrophotometric method with Arsenazo III, a free calcium indicator, at wavelengths of 685 nm and 675 nm. The following incubation medium (2 ml final volume) was used: 160 mM KCl, 10 mM Hepes-KOH, 5 μ M rotenone, 20 μ M CaCl and 25 μ M arsenazo III, pH 7.4. One mg of mitochondrial protein was used. The assay was performed at 30°C and calcium uptake was induced by 10 mM potassium succinate. (Scarpa, 1979).

ATP synthesis. A portion of 100 mg of kidney was homogenized and extracted with 1 M HClO₄ and centrifuged at 14,000 g for 5 minutes. The resulting supernatant was then neutralized with 2M KOH /100 mM Tris-HCl (pH 7.8) and centrifuged at 14,000 g for 10 minutes. ATP content was measured in the supernatant by a Sigma ATP Bioluminescent Assay Kit based on the luciferin-luciferase method, and it was performed in an EG&G BERTHOLD chemiluminescence analyzer, model AutoLumat LB 953 (Cardoso et al., 1999; Masubichi et al., 2005).

Lipid Peroxidation. Malonaldehyde (MDA) and 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE) were determined using the assay kit “Lipid Peroxidation Assay” (Cat.n° 437634, Calbiochem). Absorbance of the stable chromophore yielded was measured in a Hitachi spectrophotometer (model U-3000) at 586 nm. One mg of mitochondrial protein was used.

Assay of mitochondrial cardiolipin content. Cardiolipin content of mitochondria was measured using the cardiolipin specific dye 10-N-nonyl-acridine orange (NAO). One mg of mitochondrial protein was incubated at 30°C for 45 minutes in the presence of NAO 5 μ M, in the medium containing 160 mM KCl and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4. The excess dye was

washed out by centrifugation and the mitochondrial pellet appropriately diluted in the same buffer. Fluorescence was determined in a Hitachi spectrofluorimeter (model F-2500) operating at 485 nm (ex) and 535 nm (em). The fluorescence was converted to relative fluorescence units using quinine (1 mg/ml in 0.1N H₂SO₄, λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 457 nm) as the reference (Petit et al., 1992; Gallet et al., 1995).

Sulfhydryl Protein (P-SH). The content of P-SH was evaluated as previously described by Grattagliano et al. (1996). Proteins of the mitochondrial suspension (4 mg) were precipitated with sulphosalicylic acid 4% and centrifuged at 4,500 g for 5 minutes. The pellet was washed twice with 2% sulphosalicylic acid to remove free thiols and resuspended in 200 μ l of 6M Guanidine pH 6.0. The final samples were read spectrophotometrically at 412 nm and 530 nm. Next, 50 μ l of 10mM 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) were added and after 30 min of incubation in the dark, samples were read again at 412 and 530 nm. P-SH concentrations were calculated using a standard curve prepared with reduced GSH.

Carbonyl Proteins. The measurement of carbonyl proteins was performed according to the method of Sedlak and Lindsay (1968). Mitochondrial suspension (2mg) was treated with 1 ml of 0.2% dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2N HCl or with 1 ml of 2N HCl (control blank). Samples were incubated for 1 h at room temperature and stirred at 5-min intervals. Next, 200 μ l of 50% TCA were added and the precipitated proteins were washed 3 times with 1:1 ethanol/ethylacetate and 3 times with 10% TCA. The final precipitate was dissolved in 2ml of 6 M guanidine. The different spectrum of the DNPH-derivatives versus HCl controls was followed spectrophotometrically at 345-370 nm. The concentration of carbonyl groups was calculated from the spectrum absorbance, using 21.5 mM⁻¹ cm⁻¹ as the extinction coefficient for aliphatic hydrazones.

Aconitase activity assay. The activity of aconitase was assayed by determining the rate of formation of the intermediate product, cis-aconitate, from the substrate-citrate in the interconversion of L-citrate and isocitrate. The enzymatic reaction was initiated by adding 30

1
2
3 μl of the mitochondrial suspension in a total of 1 ml assay buffer containing 20 mM
4 triethanolamine-HCl (pH 7.5) and 1.0 mM L-citrate. The changes of absorbance at 240 nm
5
6 were recorded for 5 min by a MultiSpec 1501 Shimadzu spectrophotometer and used for the
7
8 calculation of the enzyme activity. Aconitase activity was expressed as the formation of nmol
9
10 cis-aconitate/mg protein/min. (Zheng et al, 1998).
11
12

13
14
15 **Pyridine nucleotide (NADPH) oxidation.** The oxidation of pyridine nucleotides was
16
17 measured spectrofluorimetrically at 450nm following excitation at 340 nm as previously
18
19 described by Lund et al. (1993). One mg of mitochondrial protein per ml of medium (250mM
20
21 sucrose and 10mM Tris-HCl, pH 7.4) was used.
22
23

24
25 **Glutathione assay.** Oxidized and reduced glutathione were measured by the enzyme recycling
26
27 method of Tietze (1969) with some modifications. Mitochondrial suspension (1mg protein)
28
29 was added of 500 μL of 0.4M HClO_4 and centrifuged at 10,000 g for 10 minutes at 4°C. To
30
31 determine GSH, a 50 μl aliquot of the supernatant was combined in a cuvette with 500 μl of
32
33 buffer (1mM EDTA, 3 mM NADPH, 100mM potassium phosphate, pH 7.4). Next, 50 μl of
34
35 10mM DTNB (5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid) were added. After incubating for 1 minute,
36
37 100 μl of glutathione reductase (5 U/ml) was added and absorbance at 412 nm was monitored
38
39 for 5 minutes. GSSG was measured in the samples previously neutralized with 100 mg of
40
41 sodium carbonate and treated with 4 μl of 2-vinylpyridine. After 1 hour of incubation in the
42
43 dark, samples were centrifuged at 3,000 g for 5 minutes and the supernatant was assayed as
44
45 described above for GSH determination. A calibration curve submitted to the same procedure
46
47 was used as reference to calculate GSH and GSSG concentrations.
48
49
50
51
52

53
54 **Caspase 3 activity.** Kidney homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 minutes and the
55
56 resulting supernatant was diluted to 2 mg/ ml in the homogenizing medium previously
57
58 described. A 50 μL aliquot of supernatant was assayed using the commercial kit “Caspase-3
59
60 Assay kit, Fluorimetric®” (Sigma).

Renal Function. Plasma BUN and creatinine levels were measured using commercially available diagnostic kits (Labtest®).

Statistical Analyses. All data were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical analyses were conducted by Student's t - test and were performed using the GraphPad Prism, version 3.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was chosen as the level of significance.

RESULTS

Cisplatin-induced renal failure

Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with the increase in plasma levels of creatinine and blood urea nitrogen (BUN), and it is reported to be maximum at 3-5 days after cisplatin injection to the experimental animals (Singh, 1989; Sueishi et al., 2002).

In the present study plasma BUN and creatinine levels were significantly increased ($P < 0.05$) in the cisplatin group as compared to the saline control group (from 80.2 and 0.54 to 232.5 and 1.95 mg/100 ml, respectively), confirming the occurrence of cisplatin-induced renal failure, hence validating the experimental model (Fig.1).

Effect of cisplatin on renal mitochondrial function

ATP synthesis was assessed by the measurement of kidney ATP content (Fig. 2), which was significantly decreased in the cisplatin-treated group (75% of control).

Cisplatin caused a substantial decrease in mitochondrial calcium uptake, evaluated through arsenazo III absorbance decay rate, which was significantly faster in the control group. After a 30-minute run, arsenazo III absorbance was approximately 10-fold higher in the cisplatin treated group (0.059) as compared to the control group (0.005). Traces of the kinetic analysis are represented in Fig. 3.

The mitochondrial membrane potential assay is presented in Figure 4. With the addition of an oxidizable substrate (potassium succinate), both, control and cisplatin mitochondria, developed a similar transmembrane electrical potential, assessed by rhodamine 123 fluorescence decay rate. The addition of ADP, which induced the metabolic transition to state 3, caused, in both groups, a decrease in the mitochondrial membrane potential, which corresponded to the energy used for ATP synthesis. When the phosphorylation cycle was completed, membrane potential quickly resumed to the previous level in the control group (trace A). The addition of the uncoupler FCCP immediately collapsed the transmembrane electrical potential. By contrast, mitochondria from the cisplatin-treated group took longer to phosphorylate exogenous ADP. Furthermore, the mitochondrial electrochemical potential did not resume to the pre-ADP level, but decreased progressively (trace B).

Cisplatin related-oxidative stress and cisplatin effects on renal mitochondrial redox state

The concentrations of lipid peroxidation secondary products, MDA (malondialdehyde) and 4-HNE (4-hydroxy-2(E)-nonenal), were 9.87 nmoles/mg protein in the control group and 15.72 nmoles/mg protein in the cisplatin group, indicating the induction of lipid peroxidation by cisplatin (Fig. 5). Accordingly, the content of the mitochondrial lipid cardiolipin (Fig. 6) was decreased in the cisplatin group (73% of control), probably due to oxidation processes. There was also an accumulation of oxidized proteins (Fig. 7), assessed by carbonyl and sulfhydryl proteins determination, in kidney mitochondria of cisplatin-treated rats. Compared to the control group, the cisplatin group showed a significant increase in carbonylated protein content (from 0.53 to 1.24 nmoles/mg protein) and a significant decrease in the sulfhydryl protein concentration (from 68.04 to 45.00 nmoles/mg protein). Furthermore, the activity of the mitochondrial protein aconitase was decreased in the cisplatin group (80.91% of control). Data are presented in Fig. 8.

Levels of GSH and GSH/GSSG ratio in the cisplatin-treated group were 2.38 ± 0.35 nmoles/mg protein and 37.77 ± 5.48 , respectively, which were significantly lower than those found in the control group (3.69 ± 0.35 nmoles/mg protein and 90.24 ± 8.63 , respectively), whereas GSSG content was significantly higher in the cisplatin-treated group (0.060 ± 0.003 nmoles/mg protein) compared to the control group (0.041 ± 0.004 nmoles/mg protein). Content of the pyridine nucleotide NADPH was significantly decreased in the cisplatin-treated group ($74.37\% \pm 8.57$) as compared to the saline group ($100\% \pm 7.78$). The effect of cisplatin on mitochondrial antioxidant defense system is presented in Fig. 9.

Cisplatin-related cell death by apoptosis

The occurrence of cell death by apoptosis in the kidney of cisplatin-treated rats, assessed by caspase-3 activity, was increased (184%) as compared to the control group. Data are presented in Fig. 10.

DISCUSSION

The precise cellular mechanism of cisplatin-induced acute renal failure is still unknown. The cytotoxic effects of cisplatin are postulated to occur via several mechanisms, including the inhibition of protein synthesis, mitochondrial injury and DNA damage (Park et al., 2002; Brady et al., 1990; Huang et al., 1995). Several studies have now documented the importance of ROS in cisplatin-induced nephrotoxicity (Baliga et al., 1998; Ueda et al., 2000). Oxidative damage of mitochondria might be the initial event causing renal injury by cisplatin (Chang et al., 2002; Li-Ping et al., 2000). In the present study we assessed *in vivo* the mitochondria involvement in cisplatin-induced nephrotoxicity.

We demonstrated the impairment of the mitochondrial antioxidant defense system (decreased GSH and NADPH levels, GSH/GSSG ratio, increased GSSG level) in the cisplatin group. This depletion of the antioxidant system could be explained as secondary to the oxidative stress caused by cisplatin, or it could explain the oxidative stress itself, in the case of a direct

effect of cisplatin on enzymatic and non-enzymatic antioxidant system. In fact, it has been reported that cisplatin causes a decrease in the activities of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase, transferase (Sadzuka et al., 1992; Antunes et al., 2000; Hannemann et al., 1991) and glutathione reductase (Kadikoylu et al., 2004) in kidney tissues. The depletion of GSH and the accumulation of GSSG could, therefore, be explained by the decreased activity of glutathione reductase resulting from a direct attack of cisplatin. Additionally, there is evidence from both *in vivo* and cell-culture studies that cisplatin is metabolized to a nephrotoxin through a GSH-conjugate intermediate. It has been shown that inhibiting the conjugation of cisplatin to GSH reduces cisplatin nephrotoxicity (Hanigan and Devarajan, 2003). The formation of the Platinum-GSH conjugate could also account for mitochondrial GSH depletion and eventually for the alteration of the redox state in kidney mitochondria.

The depletion of mitochondrial GSH is an early and critical event during cisplatin-induced lipoperoxidation and subsequent toxicity (Zhang and Lindup, 1994). We found evidence of cisplatin-induced oxidation of renal mitochondrial lipids. The increased formation of the alkanals MDA and 4-HNE demonstrated that mitochondrial lipids suffered oxidative damage. The oxidation of the specific mitochondrial lipid, cardiolipin (CL), was shown through the decrease of CL levels in the cisplatin-treated group. Cardiolipin is especially vulnerable to ROS because of its unsaturated carbon chains and proximity to ROS-producing sites in the inner mitochondrial membrane (IMM) (FARISS et al., 2005). It is an anionic phospholipid present in all eukaryotic cells, and it is located almost exclusively in IMM, to which it confers fluidity and stability (Shidoji et al., 1999; Hauff and Hatch, 2006). An increase in the rigidity of IMM can suppress the function of proteins and enzyme complexes in the membrane, including those of the respiratory chain (Tuma, 2001). The essential components of the respiratory chain (complexes III and IV) are linked together by CL, forming a super complex in the inner mitochondrial membrane, through which protons and electrons move to generate

ATP (Zhang et al., 2002). The ADP/ATP carrier activity has also been shown to be dependent on the association with CL (Hoffmann et al., 1994).

Recent findings identified CL and its oxidation products as important participants in signaling molecules in the apoptotic cell death program. CL anchors cytochrome *c* to the outer surface of IMM. Release of cytochrome *c* from mitochondria appears to be a central event in the induction of the apoptosis cascade that eventually leads to programmed cell death (Petrosillo et al., 2003). A very recent study (Kagan et al., 2006) has suggested that the membranes translocations of CL occur very early during apoptosis, well before changes in mitochondrial membrane potential or other apoptosis markers. Therefore, besides the key role played by CL in the functioning of the respiratory chain and in oxidative phosphorylation, CL oxidation may be an essential mechanism of apoptosis, via the release of pro-apoptotic factors from mitochondria into the cytosol. Our study demonstrated, *in vivo*, a decrease in mitochondrial CL content probably due to oxidative damage induced by cisplatin, which clearly provides support to the following findings: decreased ATP levels and increased executioner caspase-3 activity in the kidney of the cisplatin-treated group. The previous data are consistent with a lot of recent evidence that cisplatin at lower doses can induce apoptosis in renal tubular cells both in animal and in cell-culture models (Park et al., 2002; Cummings and Schnellmann, 2002; Baek et al., 2003; Wang and Lippard, 2005; Wang et al., 2006; Kaushal et al., 2001; Hanigan and Devarajan, 2003).

Renal mitochondrial proteins were also damaged by the toxic oxidative stress induced by cisplatin. One marker that was found to have been increased was carbonyl protein. Carbonyl groups are produced by direct modification of the amino acid side chains or by peptide cleavage, and they alter proteins functioning (Tuma et al., 2001). Aconitase activity, which is essential for mitochondrial function, was found to be lower in the cisplatin group. This mitochondrial enzyme contains iron sulfur centers, especially sensitive to oxidative inactivation. Since aconitase plays a key role in the citric acid cycle (TCA), its damage

directly affects ATP production and, therefore, renal cell viability. Furthermore, the oxidation of the FE-S cluster results in Fe^{+2} and H_2O_2 release, favoring the Fenton reaction, with production of hydroxyl radicals and amplification of the oxidative damage to mitochondrial proteins, DNA and lipids (Fariss et al., 2005). The cisplatin group showed a significant decrease of the sulfhydryl protein (P-SH) concentrations. Cysteine thiol residues of proteins are extremely vulnerable to oxidation, which highly affects the function of metabolic enzymes and the signaling processes triggered by external factors, such as xenobiotics. The decreased content of membrane P-SH might be due to the increased formation of disulfide bridges or to the reduced availability of cysteine and GSH, both involved in the maintenance of the protein redox status. Modification of mitochondrial membrane proteins may impair pump systems and contribute to alter mitochondrial membrane stability (Grattagliano et al., 1996; Meyer and Hell, 2005). Loss of protein sulfhydryl (-SH) groups, as well as depletion of GSH was shown to increase the concentration of cytosolic Ca^{+2} (Zhang and Lindup, 1996). In our study, the cisplatin-treated group presented a decrease in mitochondrial Ca^{+2} uptake and a decline in mitochondrial membrane electrochemical potential. These two events are critically related to each other and both are associated with mitochondrial membrane integrity loss. Diminished mitochondrial Ca^{+2} uptake can lead to increased levels of cytosolic Ca^{+2} and therefore, to disruption of intracellular Ca^{+2} homeostasis, which is an important mechanism related to energetic metabolism alterations, as well as mitochondrial permeability transition (MPT), cytochrome c release and apoptosis (Bowser et al., 2002; Loeffler and Kroemer, 2000). In our experiments, cisplatin did not induce MPT (data not shown), even in the presence of ruthenium red, an inhibitor of the Ca^{+2} uniporter, which could be due to the decreased mitochondrial calcium uptake and the membrane potential collapse. Though, a possible previous occurrence of MPT *in vivo* cannot be excluded.

Our findings strongly suggest a central role of mitochondrial dysfunction in the mechanism underlying cisplatin-induced nephrotoxicity. Impairment of the mitochondrial function was

demonstrated by significant alterations in oxygen consumption, mitochondrial membrane potential, ATP synthesis, calcium transport and homeostasis. All these parameters are closely related to the occurrence of oxidative stress, as evidenced by lipids and cardiolipin oxidation, proteins oxidative damage (formation of carbonyls, decrease of sulfhydryl protein), redox state alteration (NADPH and GSH oxidation) and aconitase activity inhibition. Added to the increase in caspase-3 activity, these data indicate the intensification of apoptosis in renal tubular epithelial cells induced by cisplatin *in vivo*.

In summary, despite its toxicity and the availability of other platinum-based anticancer drugs, cisplatin remains the major chemotherapeutic agent for the treatment of solid tumors, due to its recognized effectiveness. Consequently developing strategies to minimize the toxicity of cisplatin is of clinical interest. Considerable evidence provided in this study supports the importance of mitochondria as a critical target for cisplatin-induced nephrotoxicity. Of great importance is the fact that our data were all obtained from *in vivo* studies, since results obtained from purely *in vitro* work cannot always be transposed to the *in vivo* situation. Therefore, this study provides new insight concerning to cisplatin-induced nephrotoxicity, since some data here presented have never been demonstrated *in vivo* before. Recently, cytoprotective and therapeutic agents targeted to mitochondria have emerged as new therapeutic approaches. Delineating the stages involved in the molecular mechanism underlying the nephrotoxicity induced by cisplatin offers interesting opportunities for designing new cytoprotective agents and less toxic platinum-based drugs.

REFERENCES

Greggi Antunes LM, Darin JD, Bianchi MD (2000) Protective effects of vitamin C against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. *Pharmacol Res* 41: 405-11

- 1
2
3 Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Jung JS, Kim YK (2003) Differential roles of hydrogen
4 peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular
5 epithelial cells. *J La Clin Med* 142: 178-86
6
7
8
9
10 Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV (1998) In vitro and in vivo evidence
11 suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 53: 394-401
12
13
14
15 Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ (1991) High-yield preparation of isolated hepatocytes
16 from rat liver. In: Burdon, R. H., Knippenberg, P.H. (eds) *Laboratory techniques in*
17 *biochemistry and molecular biology. Isolated hepatocytes preparation, properties and*
18 *applications.* Elsevier, Amsterdam, pp 15-58
19
20
21
22
23
24
25 Bowser DN, Petrou S, Panchal RG, Smart ML, Williams DA (2002) Release of mitochondrial
26 Ca^{+2} via the permeability transition activates endoplasmic reticulum Ca^{+2} uptake. *FASEB*
27 *J* 16: 1105-07
28
29
30
31
32 Brady HR, Kone BC, Stromski M E, Zeidel M L, Giebisch, G., Gullans, S.R. (1990)
33 Mitochondrial injury: An early event in cisplatin toxicity to renal proximal tubules. *Am J*
34 *Physiol (Renal Fluid Electrolyte Physiol)* 258: F1181–F1187
35
36
37
38
39 Cardoso SM, Pereira C, Oliveira R (1999) Mitochondrial function is differentially affected
40 upon oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26: 3-13
41
42
43
44 Chance B, Willians GR (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv*
45 *Enzymol* 17: 65-134
46
47
48
49 Chang B, Nishikawa M, Sato E, Utsumi K, Inoue M (2002) L-Carnitine inhibits cisplatin-
50 induced injury of the kidney and small intestine. *Arch Biochem Biophys* 405: 55-64
51
52
53 Conklin, KA (2004) Cancer chemotherapy and antioxidants. *J Nutr* 134: 3201S-04S
54
55
56 Cummings BS, Schnellmann RG (2002) Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-
57 dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 8-17
58
59
60 Cvitkovic, E. (1998) Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective
measures. *Cancer Treat Rev* 24: 265-81.

- Emaus, RK, Grunwald R, Lemasters J J (1986) Rhodamine-123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria - spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 850: 436-48
- Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S (2005) Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol Interv* 5: 94-111
- Gallet PF, Maftah A, Petit JM, Denis-Gay M., Julien R (1995) Direct cardiolipin assay In yeast using the red fluorescence emission of 10-N-nonyl acridine orange. *Eur J Biochem* 15: 113-119
- Grattagliano I, Vendemiale G, Sabbá C, Buonamico P, Altomare E (1996) Oxidation of circulating proteins in alcoholics: role of acetaldehyde and xantine oxidase. *J Hepatol* 25: 28-36
- Hanigan, MH, Devarajan, P (2003) Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther* 1: 47-61
- Hannemann J, Duwe J, Baumann K (1991) Iron and ascorbic acid-induced lipid peroxidation in renal microsomes isolated from rats treated with platinum compounds. *Cancer Chemother Pharmacol* 28: 427 - 33.
- Hauff KD, Hatch GM (2006). Cardiolipin metabolism and Barth Syndrome. *Prog Lipid Res* 45: 91-101
- Hoffmann B, Stockl A, Schlame M, Beyer K, Klingenberg MJ (1994) The reconstituted ADP/ATP carrier activity has an absolute requirement for cardiolipin as shown in cysteine mutants. *Biol Chem* 269: 1940-4
- Huang H, Zhu L, Reid BR, Drobny GP, Hopkins PB (1995) Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. *Science* 270: 1842-1845
- Kadikoylu G, Bolaman Z, Demir S, Balkaya M, Akalin N, Enli Y (2004) The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. *Hum Exp Toxicol* 23: 29-34

- Kagan, VE, Tyurina YY, Bayir H, Chu CT, Kapralov AA, Vlasova II, Belikova NA, Tyurin, VA, Amoscato A, Epperly M, Greenberger J, Dekosky S, Shvedova AA, Jiang, J (2006) The "pro-apoptotic genes" get out of mitochondria: Oxidative lipidomics and redox activity of cytochrome c/cardiolipin complexes. Chem Biol Interact DOI:10.1016/j.cbi.2006.04.019
- Kaushal, GP, Kaushal V, Hong X, Shah S V (2001) Role and regulation of caspases in cisplatin induced injury to renal tubular epithelial cells. Kidney Int 60: 1726-36
- Li-Ping X, Skrzek C, Wand H, Reibe F (2000) Mitochondrial dysfunction at the early estage of cisplatin-induced acute renal failure in rats. J Zhejiang Univ Sci 1: 91-6
- Loeffler M, Kroemer G (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. Exp Cell Res 256: 19-26.
- Lund, BO, Miller DM, Woods JS (1993) Studies on Hg (II)- induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. Biochem Pharmacol 45: 2017-2024
- Masubuchi Y, Suda C, Horie T (2005) Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. J Hepatol 42: 110-6.
- Meyer AJ, Hell, RD (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. Photosynthesis Research 86: 435–457.
- Park SA, Park HJ, Lee BI, Ahn YH, Kim SU, Choi KS (2001) Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis by suppression of ERK-mediated p53 accumulation in B104 cells. Brain Res Mol Brain Res 93: 18-26
- Park MS, De Leon M, Devarajan P (2002) Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. J Am Soc Nephrol 13: 858-65
- Pedersen PL, Grenawalt JW, Reynafarje B, Hullihen J, Decker GL, Soper JW, Bustamente, E (1978) Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver-derived tissues. Methods Cell Biol 20: 411-481

- Petit, JM, Maftah A, Ratinaud M H, Julien R (1992) 10-N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *Eur J Biochem* 209: 267–73
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Paradies G (2003). Role of reactive oxygen species and cardiolipin in the release of cytochrome c from mitochondria. *FASEB J* 17: 2202-8
- Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y (1992). Mechanism of the increase in lipid peroxide induced by cisplatin in the kidneys of rats. *Toxicol. Lett* 62: 293-300
- Santos AC, Uyemura SA, Santos NA, Mingatto FE, Curti C (1997) Hg(II)-induced renal cytotoxicity: in vitro and in vivo implications for the bioenergetic and oxidative status of mitochondria. *Mol Cell Biochem* 177: 53-59
- Scarpa A (1979) Measurements of cation transport with metallochromic indicators. In: Fleisher, S., Packer, L. (eds.) *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp.301-352
- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25: 192-205
- Shidoji Y, Hayashi K, Komura S, Ohishi N, Yagi K (1999) Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 343-7
- Singh, G (1989) A possible mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 58: 71-80.
- Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP (2000) Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol* 86: 234-41
- Soud AK, Tacka KA, Galvan KA, Penefsky HS (2003) Immediate effects of anticancer drugs on mitochondrial oxygen consumption. *Biochem Pharmacol* 66: 977-87

- Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H, Oishi R (2002) Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 451: 203-8
- Tietze, F (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 27: 502-22.
- Tuma, R (2001) The two faces of oxygen. *Sci Aging Knowledge Environ* 2001, oa5.
- Ueda N, Kaushal GP, Shah SV (2000) Apoptotic mechanisms in acute renal failure. *Am J Med* 108: 403-15.
- Wang D, Lippard S J (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4: 307-20.
- Wang P, Song J H, Song D K, Ang J, Hao, C (2006) Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. *Cell Signal* 18: 1528-35
- Zhang JG, Lindup WE (1994) Cisplatin nephrotoxicity: decreases in mitochondrial protein sulphydryl concentration and calcium uptake by mitochondria from rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* 47: 1127-35
- Zhang JG, Lindup, WE (1996) Role of calcium in cisplatin-induced cell toxicity in rat renal cortical slices. *Toxicology In Vitro* 10: 205-9
- Zhang M, Mileykovskaya E, Dowhan W (2002) Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 277: 43553-6
- Zheng W, Sean R, Graziano JH (1998) Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity. *Brain Res* 799: 334-342

Figure Legends

Fig. 1 Effect of cisplatin on (a) plasma urea and (b) creatinine levels for characterization of acute renal failure and experimental model validation. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (P < 0.05)

Fig. 2 Effect of cisplatin on ATP synthesis. ATP content of the control group was considered 100%. Data expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (P < 0.05)

Fig. 3 Effect of cisplatin on mitochondrial calcium uptake. The traces shown are representative of different experiments (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (t=30 min, P < 0.05)

Fig. 4 Effect of cisplatin on inner mitochondrial membrane electrochemical potential. (a) control group; (b) cisplatin group. The traces shown are representative of different experiments (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

FCCP=carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; suc = potassium succinate

Fig. 5 Effect of cisplatin on lipid peroxidation. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (P < 0.05)

Fig. 6. Effect of cisplatin on mitochondrial lipid cardiolipin. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (P < 0.05)

Fig. 7 Effect of cisplatin on mitochondrial proteins, assessed by (a) carbonyl protein formation and (b) sulfhydryl protein levels. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (P < 0.05)

Fig. 8 Effect of cisplatin on mitochondrial aconitase activity. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (P < 0.05)

Fig. 9 Effect of cisplatin on mitochondrial antioxidant defense system, assessed by (a) GSH levels, (b) GSSG levels, (c) GSH/GSSG ratio and (d) NADPH levels. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (P < 0.05)

Fig. 10 Effect of cisplatin on the executioner caspase-3 activity. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (P < 0.05)

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Figure 8

Figure 9

Figure 10

ANEXO 2

Data: Wed, 1 Nov 2006 16:38:01 -0200

De: hspik001@umaryland.edu

Para: <neife@fcfrp.usp.br> <acsantos@fcfrp.usp.br>

Assunto: Fwd: Manuscript submitted - CCP-06-0392

Date: November 1st, 2006

Manuscript No. CCP-06-0392

Title: Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria.

Dear Prof. Santos

Thank you for the submission of your above mentioned manuscript.

Your paper has been received in the Cancer Chemotherapy and Pharmacology Editorial Office and will be given full consideration for publication.

Yours sincerely,

Helen Spiker
Editorial Office
Cancer Chemotherapy and Pharmacology

Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria.

Santos NAG¹, Catão CS¹, Martins NM¹, Curti C², Pires Bianchi ML¹, Santos AC¹

¹ Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas and ² Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Av do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil

Correspondence should be addressed to: Antonio Cardozo dos Santos. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP , Av do Café s/n, 14040-903 Ribeirão Preto, SP, Brazil (telephone: 551636024159, fax: 551636024725, e-mail: acsantos@fcfrp.usp.br)

ABSTRACT

Nephrotoxicity is the major dose-limiting factor of cisplatin chemotherapy. Reactive oxygen species generated in mitochondria are thought to be the main cause of cellular damage in such injury. The present study examined, *in vivo*, the protective potential of the hydroxyl radical scavenger dimethylthiourea (DMTU) against cisplatin-induced effects on renal mitochondrial bioenergetics, redox state and oxidative stress. Adult male Wistar rats (200 to 220g) were divided into 4 groups of 8 animals each. The control group was treated only with an intraperitoneal (i.p.) injection of saline solution (1ml/100g body weight). The second group was given only DMTU (500 mg/kg body weight, i.p, followed by 125 mg/Kg, i.p., twice a day until sacrifice). The third group was given a single injection of cisplatin (10 mg/kg body weight, i.p.). The fourth group was given DMTU (500 mg/kg body weight, i.p.), just before the cisplatin injection (10 mg/kg body weight, i.p.), followed by injections of DMTU (125 mg/kg body weight, i.p.) twice a day until sacrifice. Animals were sacrificed 72 hours after the treatment. Besides not presenting any direct effect on mitochondria, DMTU substantially inhibited cisplatin-induced mitochondrial injury and cellular death by apoptosis, suppressing the occurrence of acute renal failure. All the following cisplatin-induced effects were prevented by DMTU: (a) increased plasmatic levels of creatinine and blood urea nitrogen (BUN); (b) decreased ATP content, calcium uptake and electrochemical potential; (c) oxidation of lipids, including cardiolipin; and oxidation of proteins, including sulfhydryl, and aconitase enzyme, as well as accumulation of carbonyl proteins; (d) depletion of the antioxidant defense (NADPH and GSH) and (e) increased activity of the apoptosis executioner caspase-3. Our findings show the important role played by mitochondria and hydroxyl radicals in cisplatin-induced nephrotoxicity, as well as the effectiveness of DMTU in preventing the renal mitochondrial damage

caused by cisplatin. These results strongly suggest that protection of mitochondria by hydroxyl radical scavengers may be an interesting approach to prevent the kidney tissue damage caused by cisplatin-chemotherapy.

Key words: cisplatin; DMTU; mitochondria; nephrotoxicity; ROS; cytoprotection; antioxidant

INTRODUCTION

Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) is an effective chemotherapeutic agent used in the treatment of a wide range of tumors. Despite its effectiveness as an anti-tumor drug, nephrotoxic side effects have significantly restricted its clinical use [1]. In spite of the intensive prophylactic measures used, such as aggressive hydration and forced diuresis, irreversible renal damage occurs in about one-third of cisplatin-treated patients [2,3]. Several lines of evidence suggest that mitochondrial damage and reactive oxygen species (ROS) are involved in the nephrotoxicity of cisplatin [4,5]. Although mitochondria contain an antioxidant defense system, they also appear to be the main intracellular source of ROS, such as superoxide anions and hydroxyl radicals [6,7]. Recently, strategies are being developed for the targeted delivery of antioxidants to mitochondria with the purpose of reducing toxic oxidative stress injuries [8,9,2]. Therefore, the selective protection of mitochondria to counteract or at least minimize cisplatin-induced toxicity against healthy tissues, such as kidney, is of great importance in the chemotherapy of patients with cancer.

The exact roles of free radicals in cisplatin-induced nephrotoxicity as well as the mechanisms responsible for the beneficial effects of free radical scavengers have not been completely evaluated. There is a concern that antioxidants might interfere with the anticancer activity. Some studies demonstrate the reduction in the efficacy of chemotherapy or radiation when combined with antioxidants. However, the vast

majority of both *in vivo* and *in vitro* studies suggest that certain antioxidants, given under cautious and judicious conditions, can significantly reduce the toxicity of chemotherapeutic agents and, instead of interfering with their antitumor effect, can actually enhance it or have no effect on their action. [6,10-12,13]. Most of the compounds that ameliorate cisplatin-induced nephrotoxicity contain a nucleophilic sulphur atom, which might bond to the platinum ion, neutralizing its cytotoxic effects without impairing its effectiveness [4].

Dimethylthiourea (DMTU) is a hydroxyl radical scavenger whose beneficial effect against cytotoxicity has been described in different tissues and pathologies, nevertheless, the exact mechanisms by which this action is exerted, especially those involving mitochondria, have not been fully elucidated.

DMTU has been demonstrated to be highly effective in minimizing diabetic neurovascular complications, which are associated to increased oxidative stress [14]. According to Roychoudhury et al. [15] pretreatment with DMTU prevented hydroxyl radical formation and reduced the lipid peroxidation induced by H₂O₂ in mitochondria of pulmonary vascular smooth muscle tissue. DMTU has been shown to prevent cisplatin-induced acute renal failure in a mechanism associated with a decrease in apoptosis through mitochondrial pathways [16] and through death receptors pathways [13]. In a previous study, Baliga et al. [2] demonstrated, *in vitro* and *in vivo*, the protective effect of DMTU against cisplatin-induced renal failure, without examining the mechanisms by which it occurs.

In the present study we examined, *in vivo*, the molecular events underlying the antioxidant protection against the nephrotoxicity induced by cisplatin. For this purpose we evaluated the mechanisms involved in the protective effect of DMTU against mitochondrial dysfunction, oxidative stress, apoptotic cell death and redox state

unbalance induced by cisplatin in rat kidney mitochondria. The understanding of these mechanisms could greatly contribute to the improvement of the renal cytoprotection approach during the chemotherapy with cisplatin. Since mitochondrial damage constitutes an initial stage in the cisplatin-induced nephrotoxicity, targeting antioxidants to mitochondria is a promising new field that may enhance chemotherapy with this important anticancer agent.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. *Cis*-Diammineplatinum (II) dichloride (cisplatin), dimethylthiourea (DMTU), rhodamine 123, rotenone, ADP, ATP and NADPH were obtained from Sigma-Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Other reagents were analytical grade. Heparin (liquemine®) was obtained from Roche (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Sodium thiopental was obtained from Cristalia (Itapira, SP, Brazil). All solutions were prepared with ultra-pure water purified by a Milli-Q Gradient system (Millipore, Bedford, USA). Cisplatin solution was prepared in saline.

Animals. Research protocols were in strict accordance with the “Ethical principles and guidelines for experiments on animals” of the Swiss Academy of Medical Sciences and Swiss Academy of Sciences.

Animals Treatment. Male Wistar rats (200-220 g) were housed 4 per cage and were maintained in a 12-hour light/dark cycle in a temperature and humidity controlled facility. Standard rat chow and water were provided *ad libitum*. Animals were divided into 4 groups, with 8 rats in each group. The control group (vehicle) received a single intraperitoneal (i.p.) injection of saline solution (1ml/100g body weight). The second group (DMTU) was given an injection of DMTU (500 mg / kg body weight, i.p) followed by intraperitoneal injections of 125 mg/Kg twice a day until sacrifice. The

third group (DMTU+Cisplatin) received DMTU (500 mg / kg body weight, i.p.) just before cisplatin injection (10 mg/kg body weight, i.p.) followed by intraperitoneal injections of DMTU (125 mg/Kg body weight) twice a day until sacrifice. The fourth group (cisplatin, n=8) was given a single intraperitoneal injection of cisplatin (10 mg/kg body weight). All animals, previously anaesthetized with an intraperitoneal injection of 60 mg sodium pentobarbitone/Kg body weight [17] were killed by cervical dislocation after 72 hours. Blood samples were collected using heparin as anticoagulant for the measurement of blood urea nitrogen (BUN) and plasma creatinine.

Preparation of Mitochondrial Fraction. Rats were sacrificed and the kidneys were immediately removed and washed in cold saline solution. Medullae was removed and the remaining cortex was cut into pieces, then minced and homogenized with a Potter-Elvehjem (three times for 15 seconds, 1-minute intervals) in a medium containing 250 mM sucrose, 1 mM EGTA, 0.2% bovine serum albumin and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4. Kidney mitochondria were isolated by standard differential centrifugation [18]. The homogenate was centrifuged at 755 g for 5 minutes and the resulting supernatant was centrifuged at 13,300 g for 10 minutes. The pellet was resuspended in 10 ml of medium containing 250 mM sucrose, 0.1 mM EGTA, 0.14% bovine serum albumin and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4, and centrifuged at 13,300 g for 10 minutes. All procedures of centrifugation were performed at 4°C. The mitochondrial pellet obtained was resuspended in 1 ml medium containing 160 mM KCl and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4. Mitochondrial suspension was kept on ice and used within 3 hours. Protein concentration was determined by the biuret method with bovine serum albumin as a standard.

Mitochondria Oxidative Metabolism. Oxygen consumption was assayed with a polarographic Clark-type oxygen electrode (Gilson Medical Electronics, Middleton, WI,

USA) at 30°C in a final volume of 1.5 ml. Mitochondria were energized with 10 mM potassium succinate (+ 5 μM rotenone) in a respiration medium containing 160 mM KCl, 8.5 mM potassium phosphate, 0.5 mM EGTA, 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4. One mg of mitochondrial protein was used and the state-3 respiration was induced with 0.4 μmol ADP [19]. The phosphorylative capacity (ADP/O ratio and RCR) was determined from the polarographic traces as previously described [20].

Mitochondrial Membrane Potencial. The electrical potential of the mitochondrial inner membrane was assessed by monitoring the mitochondrial uptake of rhodamine 123 in a fluorescence spectrophotometer (F-2500, Hitachi) operating at an emission wavelength of 535 nm and an excitation wavelength of 505 nm. One mg of mitochondrial protein was used and the incubation medium had the following composition: 160 mM KCl, 8.5 mM potassium phosphate, 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4, added of 5 μM rotenone and 5 μM rhodamine 123. The respiratory substrate was 10 mM succinate. The reaction was initiated with 0.4 μmol ADP and the assay was performed at 30°C [21].

Ca⁺² Influx Measurement. The kinetics of Ca⁺² uptake by mitochondria was studied by a spectrophotometric method with Arsenazo III, a free calcium indicator, at wavelengths of 685 nm and 675 nm. The following incubation medium (2 ml final volume) was used: 160 mM KCl, 10 mM Hepes-KOH, 5 μM rotenone, 20 μM CaCl and 25 μM arsenazo III, pH 7.4. One mg of mitochondrial protein was used. The assay was performed at 30°C and calcium uptake was induced by 10 mM potassium succinate [22].

ATP synthesis. A portion of 100 mg of kidney was homogenized and extracted with 1 M HClO₄ and centrifuged at 14,000 g for 5 minutes. The resulting supernatant was then neutralized with 2M KOH /100 mM Tris-HCl (pH 7.8) and centrifuged at 14,000 g for

10 minutes. ATP content was measured in the supernatant by a Sigma ATP Bioluminescent Assay Kit based on the luciferin-luciferase method, and it was performed in an EG&G BERTHOLD chemiluminescence analyzer, model AutoLumat LB 953 [23, 24].

Lipid Peroxidation. Malonaldehyde (MDA) and 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE) were determined using the assay kit “Lipid Peroxidation Assay” (Cat.n° 437634, Calbiochem). Absorbance of the stable chromophore yielded was measured in a Hitachi spectrophotometer (model U-3000) at 586 nm. One mg of mitochondrial protein was used.

Assay of mitochondrial cardiolipin content. Cardiolipin content of mitochondria was measured using the cardiolipin specific dye 10-*N*-nonyl-acridine orange (NAO). One mg of mitochondrial protein was incubated at 30°C for 45 minutes in the presence of NAO 5 μ M, in the medium containing 160 mM KCl and 10 mM Hepes-KOH, pH 7.4. The excess dye was washed out by centrifugation and the mitochondrial pellet appropriately diluted in the same buffer. Fluorescence was determined in a Hitachi spectrofluorimeter (model F-2500) operating at 485 nm (ex) and 535 nm (em). The fluorescence was converted to relative fluorescence units using quinine (1 mg/ml in 0.1N H₂SO₄, λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 457 nm) as the reference [25,26].

Sulphydryl Protein (P-SH). The content of P-SH was evaluated as previously described by Grattagliano et al. [27]. Proteins of the mitochondrial suspension (4 mg) were precipitated with sulphosalicylic acid 4% and centrifuged at 4,500 g for 5 minutes. The pellet was washed twice with 2% sulphosalicylic acid to remove free thiols and resuspended in 200 μ l of 6M Guanidine pH 6.0. The final samples were read spectrophotometrically at 412 nm and 530 nm. Next, 50 μ l of 10mM 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) were added and after 30 min of incubation in the dark, samples were

read again at 412 and 530 nm. P-SH concentrations were calculated using a standard curve prepared with reduced GSH.

Carbonyl Proteins. The measurement of carbonyl proteins was performed according to the method of Sedlak and Lindsay [28]. Mitochondrial suspension (2mg) was treated with 1 ml of 0.2% dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2N HCl or with 1 ml of 2N HCl (control blank). Samples were incubated for 1 h at room temperature and stirred at 5-min intervals. Next, 200 μ l of 50% TCA were added and the precipitated proteins were washed 3 times with 1:1 ethanol/ethylacetate and 3 times with 10% TCA. The final precipitate was dissolved in 2ml of 6 M guanidine. The different spectrum of the DNPH-derivatives versus HCl controls was followed spectrophotometrically at 345-370 nm. The concentration of carbonyl groups was calculated from the spectrum absorbance, using $21.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ as the extinction coefficient for aliphatic hydrazones.

Aconitase activity assay. The activity of aconitase was assayed by determining the rate of formation of the intermediate product, cis-aconitate, from the substrate-citrate in the interconversion of L-citrate and isocitrate. The enzymatic reaction was initiated by adding 30 μ l of the mitochondrial suspension in a total of 1 ml assay buffer containing 20 mM triethanolamine-HCl (pH 7.5) and 1.0 mM L-citrate. The changes of absorbance at 240 nm were recorded for 5 min by a MultiSpec 1501 Shimadzu spectrophotometer and used for the calculation of the enzyme activity. Aconitase activity was expressed as the formation of nmol cis-aconitate/mg protein/min [29].

Pyridine nucleotide (NADPH) oxidation. The oxidation of pyridine nucleotides was measured spectrofluorimetrically at 450nm following excitation at 340 nm as previously described by Lund et al. [30]. One mg of mitochondrial protein per ml of medium (250mM sucrose and 10mM Tris-HCl, pH 7.4) was used.

Glutathione assay. Oxidized and reduced glutathione were measured by the enzyme recycling method of Tietze [31] with some modifications. Mitochondrial suspension (1mg protein) was added of 500 μ L of 0,4M HClO₄ and centrifuged at 10,000 g for 10 minutes at 4°C. To determine GSH, a 50 μ L aliquot of the supernatant was combined in a cuvette with 500 μ L of buffer (1mM EDTA, 3 mM NADPH, 100mM potassium phosphate, pH 7.4). Next, 50 μ L of 10mM DTNB (5,5-dithiobis 2-nitrobenzoic acid) were added. After incubating for 1 minute, 100 μ L of glutathione reductase (5 U/ml) was added and absorbance at 412 nm was monitored for 5 minutes. GSSG was measured in the samples previously neutralized with 100 mg of sodium carbonate and treated with 4 μ L of 2-vinylpyridine. After 1 hour of incubation in the dark, samples were centrifuged at 3,000 g for 5 minutes and the supernatant was assayed as described above for GSH determination. A calibration curve submitted to the same procedure was used as reference to calculate GSH and GSSG concentrations.

Caspase 3 activity. Kidney homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 minutes and the resulting supernatant was diluted to 2 mg/ ml in the homogenizing medium previously described. A 50 μ L aliquot of supernatant was assayed using the commercial kit “Caspase-3 Assay kit, Fluorimetric®” (Sigma).

Renal Function. Plasma BUN and creatinin levels were measured using commercially available diagnostic kits (Labtest®).

Statistical Analyses. All data were expressed as mean $\pm$ SD. Statistical analyses were conducted by Student’s t - test and were performed using the GraphPad Prism, version 3.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). $P < 0.05$ was chosen as the level of significance.

RESULTS

The following criteria were adopted to determine the significance levels: (a) the cisplatin-treated group was compared to the control group, which was treated only with saline solution, to validate the model of acute renal failure; (b) the DMTU+cisplatin-treated group was compared to the cisplatin-treated group in order to investigate the possible protective effect; (c) finally, the DMTU-treated group, to which cisplatin was not given, was compared to the control group in order to investigate the possibility of any direct effect of DMTU on mitochondria besides the protective effect against cisplatin-induced nephrotoxicity. Since no significant differences were observed between these two groups, the occurrence of any effect of DMTU on mitochondria, which could intervene in the validity of the experimental model, was excluded.

Cisplatin-induced acute renal failure

Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with the increase in plasma levels of creatinine and blood urea nitrogen (BUN), and it is reported to be maximal at 3-5 days after cisplatin injection to the experimental animals [32,33].

In the present study, plasma BUN and creatinine levels were significantly increased ($P < 0.05$) in the cisplatin group as compared to the saline control group (from 80.2 and 0.54 to 232.5 and 1.95 mg/100 ml, respectively), confirming the occurrence of cisplatin-induced renal failure, hence validating the experimental model.

Effect of DMTU on cisplatin model of acute renal failure

In the DMTU+cisplatin-treated group, the average BUN level was 93.58 (± 15.52) mg/100 ml and the average plasma creatinine level was 1.08 (± 0.8) mg/100 ml, showing a significant protective effect of DMTU against acute renal failure ($P < 0.05$, in both cases). BUN and plasma creatinine results are represented in fig. 1.

Effect of DMTU on renal mitochondrial function

ATP synthesis was assessed by the measurement of kidney ATP content (fig. 2), which was significantly decreased in the cisplatin-treated group (75% of control). DMTU was able to prevent the decrease in ATP content, whose level was maintained practically unchanged (96.71% of control).

Cisplatin caused a substantial decrease in mitochondrial calcium uptake, evaluated through arsenazo III absorbance decay rate, which was significantly faster in the control group. In the DMTU+cisplatin group, the trace decay was very different from that of the cisplatin group, showing a profile closer to that obtained in the control group. After a 30-minute run, arsenazo III absorbance was approximately 10-fold higher in the cisplatin-treated group (0.059) as compared to the control group (0.005). In the DMTU+cisplatin group, after a 30-minute run, arsenazo III absorbance was significantly different (0.012) from that of the cisplatin group, indicating a considerable protection. Traces of the kinetic analysis are represented in fig. 3.

The mitochondrial membrane potential assay is presented in fig. 4. With the addition of an oxidizable substrate (potassium succinate), a similar transmembrane electrical potential, assessed by rhodamine 123 fluorescence decay rate, was developed by all groups. The addition of ADP, which induced the metabolic transition to state 3, caused a decrease in the mitochondrial membrane potential, which corresponded to the energy used for ATP synthesis. When the phosphorylation cycle was completed, membrane potential quickly resumed to the previous level in the control group (trace a). By contrast, mitochondria from the cisplatin-treated group took longer to phosphorylate exogenous ADP. Furthermore, the mitochondrial electrochemical potential did not resume to the pre-ADP level, but decreased progressively (trace c). In the DMTU+cisplatin-treated group (trace d), even though ADP phosphorylation was slower than that of control, the initial mitochondrial electrochemical potential was developed

again. The addition of the known uncoupler FCCP immediately collapsed the transmembrane electrical potential. No significative differences were observed between the control group (trace a) and the DMTU group (trace b).

Effect of DMTU on oxidative stress and on renal mitochondrial redox state

The concentrations of lipid peroxidation secondary products, MDA (malondialdehyde) and 4-HNE (4-hydroxy- 2 (E) nonenal), were 9.87 nmoles/mg protein in the control group and 15.72 nmoles/mg protein in the cisplatin group, indicating the induction of lipid peroxidation by cisplatin. Accordingly, the content of the mitochondrial lipid cardiolipin was decreased in the cisplatin group (73% of control), probably due to oxidation processes. In the DMTU+cisplatin group protection against lipid peroxidation was evidenced by low levels of MDA and 4-HNE (8.73 ± 1.56 nmoles/mg protein, $P < 0.05$). Levels of cardiolipin in the DMTU+cisplatin group were significantly different from those of cisplatin group and very close to those of control ($96.59\% \pm 6.47$). Data related to lipid peroxidation and cardiolipin content are presented in figs. 5 and 6, respectively.

An accumulation of oxidized proteins (fig. 7), assessed by carbonyl and sulfhydryl proteins determination, was also observed in the mitochondria of cisplatin-treated rats. Compared to the control group, the cisplatin group showed a significant increase in carbonylated protein content (from 0.53 to 1.24 nmoles/mg protein) and a significant decrease in sulfhydryl protein concentration (from 68.04 to 45.00 nmoles/mg protein). Levels of sulfhydryl protein and carbonylated protein were respectively 76.37 ± 11.94 nmoles/mg protein and 0.63 ± 0.04 nmoles/mg protein in the DMTU+cisplatin group, indicating the occurrence of protection in this group. Furthermore, the activity of the mitochondrial protein aconitase, which was decreased in the cisplatin group (80.91% of

control), was kept unaltered in the DMTU+cisplatin group (108.20% of control). Data are presented in fig. 8.

Levels of GSH and GSH/GSSG ratio in the cisplatin-treated group were 2.38 ± 0.35 nmoles/mg protein and 37.77 ± 5.48 , respectively, which were significantly lower than those found in the control group (3.69 ± 0.35 nmoles/mg protein and 90.24 ± 8.63 , respectively), whereas GSSG content was significantly higher in the cisplatin-treated group (0.060 ± 0.003 nmoles/mg protein) compared to the control group (0.041 ± 0.004 nmoles/mg protein). No alterations in the GSH and GSSG levels were found in the DMTU+cisplatin group (3.65 ± 0.61 and 0.047 ± 0.007 nmoles/mg protein, respectively) as compared to the control group. Therefore, the mitochondrial redox state, given by the GSH/GSSG ratio, which was significantly altered in the cisplatin group (37.77 ± 5.48) as compared to control (90.24 ± 8.63), was significantly higher in the DMTU + cisplatin group (77.02 ± 9.37), clearly indicating the beneficial effect of DMTU. Content of the pyridine nucleotide NADPH was significantly decreased in the cisplatin-treated group (74.37% of control), but remained unchanged in the DMTU+cisplatin group (102.91% of control). The protective effect of DMTU on mitochondrial antioxidant defense system is presented in fig. 9.

Cisplatin-related cell death by apoptosis

The occurrence of cell death by apoptosis in the kidney of cisplatin-treated rats, assessed by caspase-3 activity, was increased (184%) as compared to the control group. Protection was clearly evidenced by the unchanged enzyme activity in the DMTU+cisplatin group (108.81% of control). Data are presented in fig. 10.

DISCUSSION

Although reactive oxygen species (ROS) are regarded as a central key in cisplatin-induced nephrotoxicity, the exact roles of free radicals and the mechanisms involved in the protective effect of antioxidants have not been entirely explained [13].

DMTU is a powerful scavenger of hydroxyl radicals, and it has been used to test the involvement of hydroxyl radicals in several animal models of human disease. Furthermore, its beneficial effects in the prevention of cytotoxicity have been described in different tissues. Cameron et al. [14] reported the high effectiveness of DMTU in the treatment of diabetic neuropathy and vascular disease, which have been linked to increased oxidative stress. Baliga et al. [2] presented evidence of the critical role of iron in mediating tissue damage via hydroxyl radical formation in cisplatin-induced nephrotoxicity. Roychoudhury et al. [15] reported that the pretreatment of bovine pulmonary artery smooth muscle tissue with DMTU prevented hydroxyl radical production and markedly reduced lipid peroxidation induced by H_2O_2 , without altering iron release. In our study we showed the effectiveness of the hydroxyl radical scavenger, DMTU, in the prevention not only of lipid peroxidation, assessed by MDA and 4-HNE levels, but also in the prevention of many alterations underlying the renal mitochondrial damage induced by cisplatin, such as decreased ATP synthesis, calcium uptake, electrochemical potential, cardiolipin content, sulfhydryl protein content, aconitase enzyme activity and GSH levels, as well as increased carbonylated protein and GSSG levels.

DMTU has been shown to ameliorate cisplatin-induced nephrotoxicity by playing a role in different processes underlying this event. Gemba et al. [34] demonstrated that DMTU inhibited the increased urinary excretion of the enzymes glutamyltranspeptidase (gamma-GTP) and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) caused by cisplatin

together with GSH depletors. Baek et al. [16] showed that DMTU did not prevent cisplatin-induced necrotic cell death, but inhibited cisplatin-induced apoptotic cell death via inhibition of cytochrome c release and caspase activation (mitochondrial pathway). Based on these data they suggested that hydroxyl radical are not involved in the process of necrotic cell death, but associated with cisplatin-induced apoptotic cell death. On the other hand, Tsuruya et al. [13] showed that DMTU ameliorated cisplatin-induced acute renal failure through inactivation of death receptor-mediated apoptosis, a non mitochondrial-dependent pathway, and suggested, like other authors [35] that both, mitochondrial and non mitochondrial-dependent pathways are involved in cisplatin-induced apoptosis. Our data showed the beneficial effect of DMTU in the prevention of cisplatin-induced apoptosis, as well as its counteracting effect on many steps involved in the renal mitochondrial damage induced by cisplatin, emphasizing the mitochondria crucial role, and particularly, the key participation of hydroxyl radical, whose scavenge by DMTU was enough to prevent the renal failure.

In the last few years, a new therapeutic direction, based on targeting antioxidants to mitochondria, has emerged. Strategies that exploit mitochondria-mediated cytoprotection in order to counteract the alterations in the key cellular regulatory processes including ATP production, Ca^{+2} uptake, redox state, free radical generation and apoptosis, constitute an interesting approach to design new therapies of cellular protection against chemotherapy-induced toxicity. On the basis of these aspects and considering the fact that mitochondrial injury is regarded as a central event in the early stages of the nephrotoxic effect of cisplatin, the selective protection of mitochondria against reactive oxygen species generated by cisplatin in intact tissues, such as kidney, is of critical importance in the chemotherapy of patients with cancer. By showing the important role played by the hydroxyl radicals generated in renal cells mitochondria and

the effectiveness of DMTU in preventing the mitochondrial damage induced by cisplatin, our results strongly support the idea that hydroxyl radical scavenger may be an attractive target for the prevention of cisplatin-induced nephrotoxicity.

In general, natural antioxidant therapy has achieved only limited success. There are reports of slightly effective and ineffective antioxidants against cisplatin nephrotoxicity, such as curcumin [36] and glutamine [37].

Some agents have been shown to ameliorate cisplatin toxicity, but there is still a need for better antioxidants to prevent the kidney tissue damage caused by cisplatin-chemotherapy.

Ideally, antioxidants should not have any pro-oxidative effects. It has been reported that thiols produce superoxide radicals; ascorbic acid induces free radical production when coupled with a transition metal [38] and the iron chelator deferoxamine aggravates the nephrotoxicity of cisplatin [39]. Furthermore, some *in vitro* studies show that vitamin A [40], vitamin C [41], genistein [42] and quercetin [43] increased the cytotoxic effects of cisplatin. The organic thiol amifostine has been used as a tissue cytoprotector in patients receiving cisplatin. Administration of amifostine has been reported to reduce cisplatin-related toxicities in some studies, but not all. Its side effects, especially transient hypotension, which probably caused the death of one patient, influence its clinical usefulness [44]. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine have been reported in a girl with epithelial cell carcinoma of the ovary despite the use of amifostine [45].

In our studies, we showed that the treatment with only DMTU did not cause mitochondrial oxidative stress, alterations in the redox state or mitochondrial dysfunction. In fact, the results of all the assays performed in the DMTU group remained unchanged as compared to those in the control group.

Some authors consider DMTU not suitable for use in humans, as it has been shown to be fetotoxic in rats and to increase alveolar albumin permeability at high doses [14, 46, 47] Nevertheless, considering the high efficiency of DMTU, it is reasonable to propose that the development of new hydroxyl scavengers for clinical application, using the chemical structure of DMTU as a prototype, could greatly improve the antioxidant approach in cisplatin-induced nephrotoxicity.

REFERENCES

- [1] Taguchi T, Nazneen A, Abid MR, Razzaque MS (2005) Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events. *Contrib Nephrol* 148:107-121.
- [2] Baliga, R.; Zhang, Z.; Baliga, M. Ueda, N.; Shah, SV (1998) In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Kidney Int* 53: 394-401
- [3] Ali BH, Al Moundhri MS (2006) Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: A review of some recent research. *Food Chem Toxicol* 44:1173-1183
- [4] Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP (2000) Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol* 86: 234-241
- [5] Chang B, Nishikawa M, Sato E, Utsumi K, Inoue M (2002) L-Carnitine inhibits cisplatin-induced injury of the kidney and small intestine. *Arch Biochem Biophys* 405: 55-64.
- [6] Matsushima H, Yonemura K, Ohishi K, Hishida A (1998) The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med.* 131: 518-526.

- [7] Turrens, JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species (2003) *J. Physiol.*; 552: 335-344
- [8] Fariss MW, Chan CB, Patel M, Van Houten B, Orrenius S (2005) Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol. Interv.* 5: 94-111
- [9] Sheu SS.; Nauduri D; Anders MW (2006) Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. *Biochim. Biophys. Acta* 1762: 256-265
- [10] Lamson DW and Brignall MS (1999) Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. *Altern Med Rev* 4:304-329
- [11] Lamson DW and Brignall MS (2000) Antioxidants and cancer therapy II: quick reference guide. *Altern Med Rev* 5: 152-163
- [12] Moss RW (2006) Should patients undergoing chemotherapy and radiotherapy be prescribed antioxidants? *Integr Cancer Ther* 5:63-82
- [13] Tsuruya K, Tokumoto M, Ninomiya T, Hirakawa M, Masutani K, Taniguchi M, Fukuda K, Kanai H, Hirakata H, Iida K (2003) Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. *Am. J. Renal Physiol* 285: F208-218.
- [14] Cameron NE, Tuck Z, McCabe L, Cotter MA (2001) Effect of the hydroxyl radical scavenger, dimethylthiourea, on peripheral nerve tissue perfusion, conduction velocity and nociception in experimental diabetes. *Diabetologia* 44: 1161-1191
- [15] Roychoudhury S, Ghosh SK, Chakraborti T, Chakraborti S (1996) H₂O₂ - induced lipoperoxidation in mitochondria of pulmonary vascular smooth muscle tissue and its modification by DFO, DMTU and DIDS. *Indian J. Exp. Biol* 34: 1220-1230
- [16] Baek SM, Kwon CH, Kim JH, Jung JS, Kim YK (2003) Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J. Lab. Clin. Med* 142: 178-186

- [17] Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ (1991) High-yield preparation of isolated hepatocytes from rat liver. In: Burdon, RH, Knippenberg, PH, eds. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Isolated hepatocytes preparation, properties and applications. Amsterdam: Elsevier 15-58
- [18] Pedersen PL, Grenawalt JW, Reynafarje B, Hullihen J, Decker GL, Soper JW, Bustamente E (1978) Preparation and characterization of mitochondria and submitochondrial particles of rat liver-derived tissues. *Methods Cell Biol* 20: 411-481
- [19] Santos AC, Uyemura SA, Santos NA, Mingatto FE, Curti C (1997) Hg (II) - induced renal cytotoxicity: in vitro and in vivo implications for the bioenergetic and oxidative status of mitochondria. *Mol Cell Biochem* 177: 53-59
- [20] Chance B, Willians GR (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol* 17: 65-134
- [21] Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ (1986) Rhodamine-123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria-spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 850: 436-448
- [22] Scarpa A (1979) Measurements of cation transport with metallochromic indicators. In: Fleisher S, Packer, L. (eds.) *Methods in Enzimology*. New York: Academic Press, 301-352
- [23] Cardoso SM, Pereira C, Oliveira R (1999) Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 26: 3-13
- [24] Masubuchi Y, Suda C, Horie T (2005) Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J Hepatol* 42: 110-116.
- [25] Petit, JM, Maftah A, Ratinaud MH, Julien R (1992) 10-N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *Eur J Biochem* 209: 267-273.

- [26] Gallet PF, Maftah A, Petit JM, Denis-Gay M, Julien R (1995) Direct cardiolipin assay In yeast using the red fluorescence emission of 10-N-nonyl acridine orange. *Eur J Biochem* 15: 113-119.
- [27] Grattagliano I, Vendemiale G, Sabbá C, Buonamico P, Altomare E (1996) Oxidation of circulating proteins in alcoholics: role of acetaldehyde and xantine oxidase. *J Hepatol* 25: 28-36.
- [28] Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25: 192-205.
- [29] Zheng W, Sean R, Graziano JH (1998) Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity *Brain Res* 799: 334-342.
- [30] Lund BO, Miller DM, Woods JS (1993) Studies on Hg (II)- induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol* 45: 2017-2024
- [31] Tietze, F (1969) Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and others tissues. *Anal Biochem* 27: 502-522
- [32] Singh, G (1989) A possible mechanism of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 58: 71-80
- [33] Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya, K, Hirakata H, Oishi R (2002) Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 451: 203-208
- [34] Gemba M, Yamaguchi T, Kambara K, Suzuki A, Kawai Y (1992) Increases in urinary enzyme excretion in rats depleted of glutathione inhibited by scavenger of oxygen free radicals. *J Pharmacobiodyn* 15: 513-518.

- [35] Hanigan MH, Devarajan P (2003) Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther* 1: 47-61
- [36] Antunes LM, Darin JD, Bianchi, M.de L (2001) Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacol. Res* 43: 145–150
- [37] Mora L de O., Antunes LM, Francescato HD, Bianchi, M de L (2003) The effects of oral glutamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol. Res* 47: 517–522
- [38] Tirosh O, Katzhendler Y, Barenholz Y, Ginsburg I, Kohen R (1996) Antioxidant properties of amidothionophosphates: novel antioxidant molecules. *Free Radic Biol Med* 20: 421-432
- [39] Al-Harbi MM, Osman AM, al-Gharably NM, al-Bekairi AM, al-Shabanah, OA, Sabah DM, Raza M (1995) Effect of desferrioxamine on cisplatin-induced nephrotoxicity in normal rats. *Chemotherapy* 41: 448–454
- [40] Adwankar M, Banerji A, Ghosh S (1991) Differential response of retinoic acid pretreated human synovial sarcoma cell line to anticancer drugs. *Tumori* 77: 391-394
- [41] Kurbacher CM, Wagner U, Kolster B, Andreotti PE, Krebs D, Bruckner HW (1996) Ascorbic acid (vitamin C) improves the antineoplastic activity of doxorubicin, cisplatin, and paclitaxel in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Lett* 103: 183-189
- [42] Marverti G, Andrews PA (1996) Stimulation of cisdiamminedichloroplatinum(II) accumulation by modulation of passive permeability with genistein: an altered response in accumulationdefective resistant cells. *Clin Cancer Res* 2: 991-999.

- [43] Hofmann J, Fiebig HH, Winterhalter BR, Berger DP, Grunicke H (1990) Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum(II) by quercetin. *Int J Cancer* 45: 536-539
- [44] Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S (1997) Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev* 23: 209-240
- [45] Sastry J, Kellie SJ (2005) Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. *Pediatr Hematol Oncol* 22: 441-445
- [46] Saillenfait AM, Sabate JP, Langonne I, de Ceaurriz J (1991) Difference in the developmental toxicity of ethylenethiourea and three N,N'-substituted thiourea derivatives in rats. *Fundam Appl Toxicol* 17: 399-408
- [47] Beehler CJ, Ely ME, Rutledge KS, Simchuk ML, Reiss OK, Shanley PF, Repine JE (1994) Toxic effects of dimethylthiourea in rats. *J Lab Clin Med* 123: 73-80

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 - Effect of cisplatin and DMTU on renal function of rats. Plasma levels of urea (a) and creatinine (b). Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group ($P < 0.05$)

Fig. 2 - Effect of cisplatin and DMTU on ATP synthesis. ATP content of the control group was considered 100%. Data expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group ($P < 0.05$)

Fig. 3 - Effect of cisplatin and DMTU on mitochondrial calcium uptake. The traces shown are representative of different experiments (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group (t= 30 min, $P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group (t= 30 min, $P < 0.05$)

Fig. 4 - Effect of cisplatin and DMTU on inner mitochondrial membrane electrochemical potential. (a) control group; (b); DMTU group; (c) cisplatin group; (d) DMTU+cisplatin group. The traces shown are representative of different experiments (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

FCPP=carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone; suc= potassium succinate

Fig. 5 - Effect of cisplatin and DMTU on lipid peroxidation, assessed by MDA and 4-HNE levels. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group ($P < 0.05$)

Fig. 6 - Effect of cisplatin and DMTU on mitochondrial lipid cardiolipin. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group ($P < 0.05$)

Fig. 7 - Effect of cisplatin and DMTU on mitochondrial proteins, assessed by (a) carbonyl protein formation and (b) sulfhydryl protein levels. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group ($P < 0.05$)

Fig. 8 - Effect of cisplatin and DMTU on mitochondrial aconitase activity. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group ($P < 0.05$)

Fig. 9 - Effect of cisplatin and DMTU on mitochondrial antioxidant defense system, assessed by (a) GSH levels, (b) GSSG levels, (c) GSH/GSSG ratio and (d) NADPH levels. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group ($P < 0.05$)

Fig. 10 - Effect of cisplatin and DMTU on the executioner caspase-3 activity. Data were expressed as mean $\pm$ SEM (n=8). Analytical and experimental conditions were described in Materials and Methods.

* Significantly different from control group ($P < 0.05$)

Significantly different from cisplatin group ($P < 0.05$)

Fig 1 (Santos et al.)

a

b

Fig 2 (Santos et al.)

Fig 3 (Santos et al.)

Fig 4 (Santos et al.)

Fig 5 (Santos et al.)

Fig 6 (Santos et al)

Fig 7 (Santos et al)

a

b

Fig 8 (Santos et al.)

Fig 9 (Santos et al.)

Fig 10 (Santos et al.)