UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na
hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar: efeito
protetor da dimetiltiouréia**

Nádia Maria Martins

Ribeirão Preto

2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na
hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar: efeito
protetor da dimetiltiouréia**

Nádia Maria Martins

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

Orientador: Antônio Cardozo dos Santos

Ribeirão Preto

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Martins, Maria Nádia

Avaliação do estresse oxidativo e do estado redox mitocondrial na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar: efeito protetor da dimetiltiouréia, Ribeirão Preto, 2007.

118 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Santos, Antônio Cardozo dos.

1. Cisplatina. 2. Hepatotoxicidade. 3. Dimetiltiouréia.
4. Mitocôndria. 5. Estresse oxidativo

Nádia Maria Martins

Avaliação do estresse oxidativo e estado redox mitocondrial na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos Wistar: efeito protetor da dimetiltiouréia

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof. Dr. Antônio Cardozo dos Santos

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em ____/ ____/ 2007

*"Não entregues tua alma à tristeza,
Não atormentes a ti mesmo em teus pensamentos,
A alegria do coração é a vida do homem,
E um inesgotável tesouro de santidade.
A alegria do homem torna mais longa a sua vida.
Tem compaixão de tua alma, torna-te agradável a Deus, e sê firme, concentra o teu
coração na santidade, e afasta a tristeza para longe de ti, pois a tristeza matou a
muitos e não há nela utilidade alguma. A inveja e a ira abreviam os dias, e a
inquietação acarreta a velhice antes do tempo.
Um coração bondoso e nobre banquetea-se continuamente, pois seus banquetes são
preparados com solicitude".
Eccl 30, 22-27*

Dedicatória

A Deus,

A Tua luz me conduziu e conduz para o caminho certo. Nos momentos difíceis em que achei que não teria forças para prosseguir... Tu sopraste ao meu ouvido a palavra esperança e tocaste o meu coração com Teu Amor incondicional.

E foi pensando no que Tu fizeste por nós, no exemplo de vida que Teu filho Jesus nos deixou, que acreditei piamente, que era a Tua milagrosa mão que me encorajava e me ajudava a continuar.

Espero Pai, que eu possa transmitir com Sabedoria aos meus irmãos Tudo o que me ensinaste e, que eu tenha humildade o suficiente para admitir que ainda pouco sei e, perseverança para aprender cada vez mais.

À minha família,

Por terem dado as bases emocionais, morais e intelectuais para a formação da pessoa que sou hoje. À minha mãe, agradeço por ser uma figura “presente” e por me ensinar que Deus está acima de tudo. Ao meu pai, agradeço os desafios e provações impostos; sem saber, tornou-me a pessoa forte que sou, preparada para enfrentar os embates da vida sem nunca esmorecer. Às minhas irmãs, por acreditarem em mim e por se inspirarem com a minha batalha pelo crescimento.

Ao meu noivo Denis,

Desde o dia em que os nossos olhares se cruzaram e as nossas almas se reconheceram a minha vida tornou-se mais colorida. Obrigada pelo seu amor, pela paciência, compreensão, incentivo, dedicação, companheirismo... Por me fazer tão feliz.

Ao meu orientador professor Dr. Antônio Cardozo dos Santos, por me orientar com sapiência. Seus ensinamentos e exemplo de vida fortaleceram o meu crescimento.

À amiga Neife,

A sua amizade, seus sábios conselhos, apoio e colaboração sempre foram de grande valia para mim.

À todas as pessoas que direta/ indiretamente colaboram para a pesquisa de novas estratégias, novos modelos de fármacos ou modificações em suas estruturas na tentativa de reduzir os efeitos adversos e melhorar a qualidade de vida de pacientes que depositam a sua confiança na ciência.

Agradecimentos

À amiga e afilhada de crisma Flávia,

Pela valiosa amizade, pela força nos momentos difíceis e pelas nossas boas risadas...

À minha prima Elicléia, pela preciosa amizade.

À família do Denis, por terem me recebido com tanto amor e carinho e por me tratarem não apenas como nora e cunhada, mas como filha e irmã.

Aos amigos Alessandra, Cícera Simone, Flávio, Leonarda, Liu, Luciana, Rubens, que mesmo à distância, torceram por mim e, os quais guardo com carinho em meu coração. Valeu pela foto que utilizei em anexos, Liu.

Aos ex-colegas e amigos Samara, Fábio, Tiago e Acácio, nunca esquecerei de quão bem vocês me recepcionaram quando cheguei aqui e o quanto aprendi com vocês.

Ao grande amigo e eterno professor Arnaldo Monteiro dos Santos pelo incentivo e exemplo de vida.

Ao casal de amigos Daniela e Márcio, é muito bom poder sempre contar com vocês.

Aos amigos Josieli e Giovanni, pelo carinho, atenção e pelas belas fotos que tiramos naquele passeio e hoje estou podendo utilizar na minha tese.

Ao professor Clóvis, pelo carinho e por ter me dado um presente tão especial: meu gato Gabriel, tão dócil e companheiro.

A todos os funcionários da FCFRP, em especial à amiga Sônia, à Dona Cidinha, ao Sr. Antônio, ao Mauro, que tornam o ambiente propício para desenvolvermos nossos projetos de pesquisa.

Às funcionárias da seção de pós-graduação Ana, Rosana e Eleni, pela atenção e dedicação.

A todos os professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por serem tão prestativos e dedicados. Em especial aos professores Fernando e Yara, pelas sugestões na minha qualificação.

Aos alunos e catequistas da Igreja Santo Antônio, aos amigos da Casa Adolfo Josué, a todos que tiveram seu dia de anjo em minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPQ), pelo apoio financeiro durante a execução deste trabalho.

Sumário

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	v
Lista de Figuras e Tabela.....	viii
Resumo	x
Summary	xiii
I – INTRODUÇÃO	1
1. Agentes antineoplásicos	2
2. Cisplatina	3
3. Cisplatina: farmacocinética e farmacodinâmica	4
4. Limitações no uso da cisplatina: Resistência Celular e Toxicidade	5
5. Mitocôndria como alvo da ação tóxica de xenobióticos	7
6. Mitocôndrias como principal fonte geradora de EROs	8
7. Estresse Oxidativo e Estado redox mitocondrial	9
8. Hepatotoxicidade induzida por xenobióticos	11
9. Mecanismos de hepatotoxicidade	12
a) Alteração do balanço energético celular.....	12
b) Estresse Oxidativo.....	13
10. Hepatotoxicidade induzida pela Cisplatina.....	17
11. Indução de apoptose por antineoplásicos	18
12. Antioxidantes	21
13. O papel da cisplatina na quimioterapia do câncer	24
II – OBJETIVOS	27
III – MATERIAIS E MÉTODOS	29
1. Reagentes	30
2. Modelo experimental	30
3. Tratamento dos animais	30
4. Isolamento da fração mitocondrial	31
5. Determinação da Proteína Mitocondrial	32

6. Determinação de ALT	32
7. Determinação de AST.....	32
8. Determinação de ATP	33
9. Determinação da fluidez de membrana	33
10. Determinação da cardiolipina	34
11. Lipoperoxidação da Membrana Mitocondrial	34
12. Oxidação de proteínas sulfidrílicas (P-SH)	35
13. Determinação de glutathione (níveis de GSH e GSSG)	35
14. Determinação do estado redox de NAD(P).....	36
15. Determinação da atividade caspase 3	36
16. Análise Estatística	36
IV – RESULTADOS	37
V – DISCUSSÃO.....	50
1. Efeito da cisplatina sobre o fígado: estresse oxidativo e estado redox mitocondrial	51
2. Efeito da dimetiltiouréia na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina: estresse oxidativo e estado redox mitocondrial	64
VI – CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS.....	71

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – Adenosina difosfato

ALT- Alanina aminotransferase

Apaf-1 - fator protease ativador de apoptose -1

AST- Aspartato aminotransferase

ATP – Adenosina trifosfato

BHA - hidroxí anisol butilado

CISP - cisplatina

Ctr1- transportador de cobre

DMTU - dimetiltiouréia

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNPH – 2,4 dinitrofenilhidrazina

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

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

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA - American Food and Drug Administration

GPx - glutatona peroxidase

GRd - glutatona redutase

GSH - glutatona reduzida

GSSG – glutatona oxidada

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

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

4-HNE - 4-hidroxí-2(E)-nonenal

i.p.- intraperitoneal

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 (10- *N*- nonil- acridina laranja)

$\text{O}_2^{\bullet -}$ – anion radical superóxido

$\text{OH}^{\bullet}$ – radical hidroxila

RNA – ácido ribonucléico

- SH – grupamento sulfidrílico

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - superóxido dismutase

TPM - Transição da Permeabilidade Mitocondrial

Lista de Figuras e Tabela

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1. Isômeros cisplatina (esquerda) e transplatina (direita).....	3
Figura 2. Hidrólise da cisplatina e formação do metabólito diaquo-diamino-platino.....	5
Figura 3. Estrutura química do DMTU.....	24
Figura 4. Níveis de aspartato aminotransferase (AST) no soro.....	40
Figura 5. Níveis de alanina aminotransferase (ALT) no soro	40
Figura 6. Níveis de ATP em fígado de ratos.....	41
Figura 7. Fluidez da membrana mitocondrial	42
Figura 8. Níveis de malondialdeído + 4 hidroxinonenal.....	43
Figura 9. Níveis de cardiolipina	44
Figura 10. Níveis de proteínas sulfídrilicas.....	44
Figura 11. Níveis de GSH (A); GSSG (B) e GSH/GSSG.....	46
Figura 12. Níveis de NADPH.....	47
Figura 13. Atividade da caspase 3	48

TABELA

Tabela 1 Resultados obtidos dos parâmetros relacionados às funções hepática e mitocondrial, ao estado redox mitocondrial, ao estresse oxidativo mitocondrial e à apoptose em fígado de ratos submetidos aos diferentes tratamentos: salina (controle), cisplatina, DMTU + cisplatina e DMTU.....	39
---	----

Resumo

RESUMO

A cisplatina ainda é um dos agentes quimioterápicos mais efetivos. No entanto, em elevadas doses pode ocorrer hepatotoxicidade.

Alguns antioxidantes têm sido mostrado amenizar a hepatotoxicidade induzida pela cisplatina mas o mecanismo molecular envolvido não está bem esclarecido.

No presente estudo nós investigamos moleculares subjacente ao efeito protetor da dimetiltiourea (DMTU), um conhecido seqüestrador de radical hidroxil, contra a lesão oxidativamitocondrial hepática induzida pela cisplatina em ratos. Ratos Wistar machos adultos (200 a 220g) foram divididos entre 4 grupos de 8 animais cada. O grupo controle foi tratado apenas com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de solução salina (1 ml/ 100g de peso). Ao grupo DMTU foi administrado apenas DMTU (500 mg/kg de peso, i.p., seguido de 125 mg/kg, i.p., duas vezes ao dia até o sacrifício). Ao grupo cisplatina foi administrado uma injeção única de cisplatina (10 mg/kg de peso, i.p.). Ao grupo DMTU + cisplatina foi administrado DMTU (500mg/kg de peso, i.p.), pouco antes da injeção da cisplatina (10 mg/kg de peso, i.p.), seguido por injeções de DMTU (125 mg/kg de peso, i.p.) duas vezes ao dia até o sacrifício (72 horas após o tratamento). A hepatotoxicidade foi evidenciada no grupo cisplatina pelo aumento dos níveis séricos de alanina (ALT) e aspartato (AST) aminotransferases. O mecanismo de hepatotoxicidade induzido pela cisplatina mostrou-se envolvido na rigidez de membrana; na redução da razão glutatona reduzida em relação a glutatona oxidada (GSH/GSSG); na redução dos níveis de ATP, GSH e NADPH; na lipoperoxidação; na lesão oxidativa da cardiolipina e de proteínas com grupos sulfidrílicos. Mais ainda, a morte celular por apoptose foi também demonstrada e os achados fortemente sugerem a participação do

mecanismo sinalizador mitocondrial neste processo; o DMTU não apresentou nenhum efeito direto sobre a mitocôndria e inibiu substancialmente a lesão mitocondrial induzida pela cisplatina, prevenindo a hepatotoxicidade. Todos os seguintes efeitos induzidos pela cisplatina foram prevenidos pelo DMTU: (a) elevação dos níveis séricos de AST e ALT; (b) redução dos níveis de ATP hepático; (c) peroxidação lipídica; (d) oxidação da cardiolipina; (e) oxidação de proteínas sulfidrílicas; (f) rigidez da membrana mitocondrial; (g) oxidação de GSH; (h) oxidação de NADPH e (i) morte celular por apoptose. Os resultados mostraram o papel principal da mitocôndria e dos radicais hidroxilas na proteção do fígado saudável contra a lesão hepática induzida pela cisplatina, delineando um número de etapas que podem ser consideradas no desenvolvimento de futuros agentes citoprotetores.

Palavras- chave: cisplatina, citoproteção, hepatotoxicidade, mitocôndria e EROs

Summary

SUMMARY

Cisplatin is still one of the most effective chemotherapeutic agents. However, at higher doses hepatotoxicity may occur. Some antioxidants have been shown to ameliorate cisplatin-induced hepatotoxicity but the involved molecular mechanism has not been clarified. In the present study we investigated the molecular mechanism underlying the protective effect of dimethylthiourea (DMTU), a known hydroxyl radical scavenger, against liver mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in rats. 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 DMTU 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 cisplatin group was given a single injection of cisplatin (10 mg/kg body weight, i.p.). The DMTU+cisplatin 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 (72 hours after the treatment). Hepatotoxicity was evidenced in the cisplatin group by the increased serum levels of alanine (ALT) and aspartate (AST) aminotransferases. The mechanism of cisplatin-induced hepatotoxicity was found to involve membrane rigidification; decreased GSH/GSSG ratio, ATP, GSH and NADPH levels; lipid peroxidation; oxidative damage of cardiolipin and protein sulfhydryl groups. Moreover, cell death by apoptosis was also demonstrated and the findings strongly suggest the participation of the mitochondrial signaling pathway in this process; DMTU did not present any direct effect on mitochondria and substantially inhibited cisplatin-induced mitochondrial injury, therefore preventing the hepatotoxicity. All the following cisplatin-induced

effects were prevented by DMTU: (a) elevation of AST and ALT serum levels; (b) decreased hepatic ATP levels; (c) lipid peroxidation; (d) cardiolipin oxidation; (e) sulfhydryl protein oxidation; (f) mitochondrial membrane rigidification; (g) GSH oxidation; (h) NADPH oxidation and (h) apoptotic cell death. Results show the central role of mitochondria and hydroxyl radicals in the protection of healthy liver against cisplatin-induced injury, highlighting a number of steps that might be considered in the development of novel cytoprotective agents.

Key words: cisplatin, cytoprotection, hepatotoxicity, mitochondria, ROS

“Milhões estão acordados o bastante para trabalhos físicos, um em um milhão está acordado o bastante para um esforço intelectual efetivo e um único ser em cem milhões o está para viver uma vida poética e divina. Estar acordado é estar vivo... Temos de aprender a redespertar e temos de nos manter acordados não por meios artificiais, mas por uma expectativa infinita do amanhecer.”

Thoreau

I. Introdução

1. Agentes antineoplásicos

A terapia antineoplásica objetiva eliminar completamente as células neoplásicas através de intervenção cirúrgica, radioterapêutica ou farmacológica. Caso não seja viável, a terapia torna-se paliativa, propondo reduzir o número de células neoplásicas, para melhorar os sintomas e, se possível, prolongar a sobrevivência do paciente mantendo uma qualidade de vida adequada (GONZÁLEZ et al., 2000).

A quimioterapia é uma das principais formas de intervenção médica no tratamento do câncer (SHACTER et al., 2000). Os agentes quimioterápicos podem ser divididos em várias categorias: agentes alquilantes (ex: ciclofosfamida e ifosfamida); antibióticos com ação sobre ácidos nucleicos (ex: doxorubicina e bleomicina), compostos platinados (ex: cisplatina), inibidores mitóticos (ex: vincristina), antimetabólitos (ex: 5-fluorouracil), modificadores da resposta biológica (ex: interferon) e compostos hormonais (ex: tamoxifeno) (LAMSON; BRIGNALL, 1999).

Estudos realizados com vários tipos de células sugerem que a quimioterapia induz apoptose das células tumorais, ocorrendo, em parte, pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila ($HO^{\bullet}$) (RKER et al., 2002).

Os agentes alquilantes, platínicos e os antibióticos antitumorais induzem lesão celular por oxidação por meio da aumentada produção de radicais livres (LAMSON; BRIGNALL, 1999).

2. Cisplatina

A cisplatina [cis-diaminodicloroplatina (II)] é um fármaco que apresenta atividade antineoplásica bastante abrangente e que revolucionou o tratamento de tumores do trato geniturinário no início dos anos 70 (SHERMAN; LIPPARD, 1987; CHO et al., 2005). Sua atividade anticâncer foi descoberta por acaso, mais de 100 anos após a sua síntese (1845) e várias décadas após a elucidação da sua estrutura (1893) (ALDERDEN, Hal; ALDERDEN, Hambley, 2006). Em um experimento realizado em 1965, Rosenberg observou que a aplicação de correntes elétricas liberadas através de eletrodos de platina promovia o crescimento filamentosos em bactérias *Escherichia coli*, em consequência da inibição da síntese do DNA e da divisão celular, mas não do crescimento. Posteriormente verificou-se que este efeito devia-se ao processo de eletrólise, com formação de complexos de platina, dentre eles a cisplatina ou *cis*-diaminodicloroplatina II, ativa, e a transplatina, inativa (**Fig.1**) (ROSENBERG et al., 1973).

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

Em 1978 o FDA aprovou o uso clínico da cisplatina, o primeiro fármaco platínico utilizado na terapia antineoplásica. Desde então a cisplatina tornou-se o principal agente quimioterápico para o tratamento de vários tumores sólidos, incluindo câncer de cabeça e pescoço, testículo, ovário, útero, bexiga e esôfago, além do câncer pulmonar (OHMICH I et al, 2005). Tumores de tecidos do sistema enterohepático como fígado, vesícula biliar e intestino também são tratados com

cisplatina. É ainda utilizada nos casos de tumores sólidos refratários a outros tratamentos (JARNAGIN et al, 2003; O'CONNELL et al, 2003; SI et al, 2003).

O efeito terapêutico da cisplatina é significativamente aumentado com o aumento da dose, porém a terapia com altas doses é limitada pela toxicidade (CVITKOVIC, 1998; HANIGAN; DEVARAJAN, 2003).

3. Cisplatina: farmacocinética e farmacodinâmica

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%. É encontrada em altas concentrações no rim, 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).

A cisplatina é um fármaco de configuração plana, possuindo um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia (**Fig.1**).

Quando administrada por injeção endovenosa, a cisplatina é ativada após a passagem pelas membranas celulares (ROSENBERG, 1985). A concentração de íons cloreto no plasma e nas células modula a reatividade da cisplatina *in vivo*. A concentração de íons cloreto é de aproximadamente 145 mM no meio extracelular e 3 mM no meio intracelular, local em ocorre a substituição do cloreto pela água, com formação de uma molécula carregada positivamente, cineticamente mais reativa e que constitui a espécie ativa do fármaco. Assim, o efeito antineoplásico da cisplatina

depende da sua hidrólise, com substituição de um ou dois átomos de cloro na posição *cis* por água ou grupos hidroxil, formando metabólitos altamente reativos, mono-cloro-mono-aquo-diamino-platino e diaquo-diamino-platino respectivamente (**Fig. 2**) (LIPPARD, 1987; HALABE; WONG; SUTTON, 1991; SCHNELLMANN, 2001).

Os complexos de platina são capazes de reagir com o DNA e alquilar bases púricas e pirimidínicas formando ligações cruzadas intra e interfilamentares, impedindo a replicação do DNA e consequentemente o ciclo de divisão celular (ZWELLING; KOHN, 1979; SHERMAN; LIPPARD, 1987). A especificidade da cisplatina em relação à fase do ciclo celular parece diferir entre os tipos celulares, embora os efeitos da ligação cruzada com o DNA sejam mais pronunciados durante a fase S (NISHIKAWA et al., 2001).

Figura 2. Hidrólise da cisplatina e formação do metabólito diaquo-diamino-platino (LIPPARD, 1987).

4. Limitações no uso da cisplatina: Resistência Celular e Toxicidade

Grande parte dos pacientes com câncer de células germinativas responde à quimioterapia com cisplatina e aproximadamente 80% são curados. Por outro lado, pacientes com câncer pulmonar ou de ovário frequentemente desenvolvem resistência aos fármacos com platina, sendo que o câncer de cólon é refratário ao tratamento com a cisplatina (DE GRAAF et al., 1997). Segundo Koberle et al. (1997),

a hipersensibilidade de células tumorais de testículo à cisplatina pode estar relacionada a uma deficiência no reparo do DNA.

Mecanismos moleculares e bioquímicos de resistência à cisplatina têm sido propostos e podem ser divididos em 4 grupos:

1- Mecanismos que reduzem o acúmulo do composto de platina (OHMICH I et al., 2005);

2- Mecanismos que envolvem a inativação intracelular da cisplatina pela associação com moléculas contendo grupos sulfidrílicos como metalotioneínas e glutathione (GSH), sendo que o GSH intracelular parece ser o parâmetro limite na detoxificação da cisplatina em células tumorais hepáticas humanas (ZHANG et al., 2001; OHMICH I et al., 2005);

3- Mecanismos que aumentam o reparo do DNA (OHMICH I et al., 2005);

4- Mecanismos que bloqueiam a indução de apoptose, em decorrência de uma resposta adaptativa das células tumorais devido à persistência do estresse oxidativo (YOKOMIZO et al., 1995.; LAZO et al., 1998; OHMICH I et al., 2005).

Na tentativa de vencer a resistência primária das neoplasias e aumentar a eficiência da abordagem terapêutica, têm-se utilizado doses cada vez maiores de quimioterápicos, isolados ou combinados (SOUZA et al., 2000).

A cisplatina, como outros quimioterápicos, apresenta baixo índice terapêutico e elevado potencial tóxico (LEE et al., 2001), agindo de maneira não seletiva sobre as células neoplásicas, atingindo também células e tecidos normais, com conseqüente disfunção de outros órgãos (LI et al., 2006).

Estudos demonstraram que a citotoxicidade da cisplatina é causada por uma combinação de eventos, incluindo lesão de DNA, peroxidação da membrana celular,

disfunção mitocondrial e inibição da síntese de proteínas. Todos estes processos resultam na indução da apoptose (LUDWIG; OBERLEITHNER, 2004).

Vários efeitos adversos como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos são observados com a administração da cisplatina (CVITKOVIC, 1998). A hepatotoxicidade está associada a elevadas doses deste fármaco (CERSOSIMO, 1993).

5. Mitocôndria como alvo da ação tóxica de xenobióticos

Durante o transporte de elétrons transferidos por substratos oxidáveis à cadeia respiratória, a mitocôndria é capaz de gerar um gradiente eletroquímico de prótons na membrana interna que conduz à síntese de ATP (MITCHELL, 1961). Além de fornecer mais de 95% da energia utilizada pela célula por meio da fosforilação oxidativa, a mitocôndria desempenha diferentes funções na regulação de vários processos celulares, participando da modulação do estado redox celular, da regulação osmótica, do controle de pH, da sinalização celular, e, sobretudo, da manutenção da homeostasia do cálcio. Devido a essa diversidade de funções, a mitocôndria é uma organela alvo de várias situações lesivas e agentes tóxicos, estando envolvida nos mecanismos de dano e morte celular (ORRENIUS et al., 1989; GUNTER et al, 1994; WALLACE et al, 1997). Evidências experimentais indicam que a mitocôndria representa um alvo preferencial e crítico para a ação de drogas e toxinas (NIEMINEM et al., 1990; BELLOMO et al.,1982; IMBERTI et al.,1993).

Os efeitos tóxicos sobre as mitocôndrias podem ocorrer por mecanismos diretos e indiretos, incluindo a quebra da homeostasia intracelular de íons, inibição enzimática, danos às membranas celulares e anóxia (RAHN et al.,1991).

As mitocôndrias são essenciais para a manutenção da vida celular, e exercem um papel central na regulação da morte celular. Quando há alteração na permeabilidade da membrana mitocondrial (PMM) as células morrem principalmente por apoptose. Os fatores chave que regulam a PMM incluem a concentração intramitocondrial do cálcio, o estado redox celular (incluindo níveis de espécies reativas de oxigênio) e a mobilização dos membros da família Bcl-2. Enfoques atuais na quimioterapia, tendo a mitocôndria como alvo, utilizam estratégias que modulam tanto a ação dos membros da família Bcl-2 na membrana mitocondrial externa, como agentes específicos que focalizam a membrana mitocondrial interna e o poro de transição da permeabilidade da membrana mitocondrial (ARMSTRONG, 2006).

6. Mitocôndrias como principal fonte geradora de EROs

Espécies reativas de oxigênio (ânion radical superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil) são produzidas continuamente durante o metabolismo aeróbico. Estes oxidantes podem provocar danos a macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos. As mitocôndrias constituem a principal fonte geradora de EROs uma vez que: (i) o sistema de transporte elétrico mitocondrial consome aproximadamente 85% de todo oxigênio utilizado pela célula e, (ii) em contraposição aos outros sistemas oxidantes celulares (citocromo P450, várias oxidases citosólicas, β -oxidação de ácidos graxos nos peroxissomas, etc), as mitocôndrias são requeridas para a produção de ATP e estão presentes em elevado número em praticamente todas as células. Um déficit de energia ocasionado pelo declínio na função mitocondrial pode comprometer a atividade celular normal (SHIGENAGA; HAGEN; AMES, 1994).

Todos os agentes antineoplásicos geram EROs, uma vez que induzem apoptose em células tumorais. Isto ocorre porque uma das vias da apoptose induzida por fármacos envolve a liberação do citocromo c da mitocôndria. Quando isto ocorre, os elétrons são desviados da cadeia respiratória para o oxigênio, através da NADH desidrogenase e coenzima Q reduzida, resultando na formação de radicais superóxido (CONKLIN, 2004).

A formação de EROs não é o único evento responsável pela citotoxicidade de muitos fármacos contra as células tumorais. A alteração do estado redox pela depleção de substâncias redutoras, a inibição dos seqüestradores de EROs, ou a adição direta de espécies produtoras de EROs, também contribuem para citotoxicidade dos fármacos. Assim sendo, a manipulação do estado redox celular pode proporcionar uma melhor eficácia quimioterapêutica (JING et al., 2006).

Há evidências de que a cisplatina induz a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (FADILLIOGLU, 2003; FADILLIOGLU et al., 2004; YAGMURCA et al., 2004) e reduz os níveis dos antioxidantes plasmáticos depletando o mecanismo de defesa antioxidante contra a lesão oxidativa (NAZIROGLU; KARAOGLU; AKSOY, 2004).

7. Estresse Oxidativo e Estado redox mitocondrial

O desequilíbrio entre a formação excessiva de EROs e a defesa antioxidante resulta em vários processos deletérios para a célula. Este desequilíbrio é denominado estresse oxidativo. Pequenas flutuações na concentração destes oxidantes exercem um papel na sinalização intracelular, enquanto aumentos descontrolados dessas espécies de oxigênio conduzem a reações em cadeia com proteínas, lipídeos, polissacarídeos e DNA (DROGE, 2002).

Os agentes antineoplásicos produzem estresse oxidativo em pacientes submetidos à quimioterapia (FABER et al., 1995; WEIJL et al., 1998; CLEMENS et al., 1990; LADNER et al., 1989), tendo sido relatados: elevação dos produtos de lipoperoxidação; redução dos níveis de antioxidantes plasmáticos como vitamina E, C e β -caroteno e redução acentuada dos níveis de glutathione tecidual (CONKLIN, 2004).

Pesquisas realizadas na última década indicam que o estado de oxidação/redução celular (estado redox) afetam a citotoxicidade de um determinado número de agentes quimioterápicos (DAÍ et al., 1999; KOTAMRAJU et al., 2004; FRIESEN; KIESS; DEBATIN, 2004).

O balanço redox celular é regulado por uma quantidade relativa de substâncias oxidantes e redutoras. Ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) constituem os principais componentes oxidantes endógenos (KAMATA; HIRATA, 1999; THANNICKAL; FANBURG, 2000). 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 por sua vez é reduzido a H_2O pela glutathione peroxidase, consumindo glutathione reduzida (GSH), a qual é mantida neste estado pela glutathione redutase, com a utilização de NADPH. Desta forma, a mitocôndria possui um sistema antioxidante eficiente composto por GSH, SOD, NADPH, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GRd), além de vitaminas C e E (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000).

8. Hepatotoxicidade induzida por xenobióticos

Lesões hepáticas induzidas por drogas constituem uma potencial complicação de qualquer tratamento medicamentoso, uma vez que o fígado é o órgão central de disposição metabólica de praticamente todas as drogas e xenobióticos (ZIMMERMAN; MADDREY, 1993; FARRELL, 1994). Muitos xenobióticos são biotransformados e eliminados pelo fígado, principalmente na forma de conjugados, sem maiores conseqüências. No entanto, alguns são concentrados a níveis tóxicos, enquanto outros são bioativados a compostos intermediários reativos que podem lesar o fígado de diversas maneiras, incluindo a indução do câncer (KULKARNI; BYCZKOWSKI, 1994).

Essas lesões resultam do efeito direto da droga e/ou produto de biotransformação provocando disfunção intracelular pela ruptura da integridade dos diversos sistemas de membrana dos hepatócitos ou indiretamente através dos danos celulares provocados por processos imunológicos. Fatores que contribuem para o acúmulo de toxinas nos hepatócitos incluem alterações genéticas em sistemas enzimáticos que permitem a formação de metabólitos reativos, competição por outras drogas e depleção de substratos necessários para a eliminação do metabólito (LEE, 1995).

Sendo o hepatócito a principal unidade metabólica do fígado, muitas reações adversas podem resultar na sua morte. A reação mais comum conduzindo a morte celular é a formação de ligações covalentes entre o metabólito reativo e macromoléculas biológicas. Reações de oxidação também podem produzir compostos eletrofílicos ou espécies reativas de oxigênio (tais como o ânion superóxido e outros radicais livres) que reagem com componentes celulares (RECKNAGEL et al., 1991).

A principal via capaz de eliminar os metabólitos reativos consiste nas reações de conjugação, principalmente com a glutatona. Esse tripeptídeo contém um grupamento sulfidrílico capaz de se ligar a compostos eletrofílicos diretamente ou através de reações catalisadas pela glutatona transferase produzindo conjugados com o ácido mercaptúrico. A glutatona também pode servir de substrato na eliminação de peróxidos resultantes da dismutação do radical superóxido, reação catalisada pelas diferentes formas da glutatona peroxidase (GOLDSTEIN; SCHELLMANN, 1994).

9. Mecanismos de hepatotoxicidade

a) Alteração do balanço energético celular

Algumas hepatotoxinas podem alterar o balanço energético das células por meio de: (a) aumento intenso do consumo de ATP, (b) redução da produção de ATP ou (c) pela ação conjunta de (a) e (b) (SWARTZ, 1995). A depleção dos estoques intracelulares de ATP é, de fato, um evento que precede os estágios irreversíveis da lesão celular decorrente dos efeitos tóxicos dos xenobióticos (ORRENIUS et al., 1989).

As mitocôndrias hepáticas são alvos importantes na toxicidade de muitos xenobióticos e a alteração de suas funções tem um efeito imediato no balanço energético da célula (ROSSER; GORES, 1995). Diversos mecanismos podem estar envolvidos nesse processo: (a) inibição direta do metabolismo mitocondrial por inibição do transporte de elétrons e/ou da fosforilação oxidativa; (b) danos estruturais na mitocôndria devido a oxidação dos lipídeos de membrana ou devido a intercalação de compostos na membrana lipídica, conduzindo à alteração do

potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente à dissipação do potencial energético necessário para a síntese de ATP e (c) danos ao DNA mitocondrial (NIEMINEN et al., 1995). Uma situação importante de aumento da demanda energética pelo hepatócito é a síntese de novo de glutathiona reduzida (GSH). Como consequência têm-se um decréscimo no pool de GSH devido: (a) à oxidação da glutathiona reduzida à forma dissulfeto (GSSG) e (b) às reações de conjugação da GSH com metabólitos reativos (REED, 1994).

b) Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um achado freqüente na hepatotoxicidade induzida por xenobióticos (POLI et al., 1987). Trata-se de um processo mediado pela formação de radicais livres diversos que resultam da degradação oxidativa dos lipídeos (lipoperoxidação) e de proteínas presentes nos diversos sistemas de membrana da célula. Outras macromoléculas (glicídios e ácidos nucleicos) também podem ser afetadas. Esse processo pode ser iniciado por radicais derivados dos xenobióticos gerados em reações catalizadas pelas isoenzimas do citocromo P-450 ou ainda pela produção de radicais livres oriundos do oxigênio ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $OH^{\cdot}$). Na presença do oxigênio, esse processo é estendido aos lipídeos insaturados e uma cadeia de reações é estabelecida de modo que os danos às membranas são propagados. A primeira consequência desse processo é a profunda alteração das propriedades físicas e químicas das membranas, causando perda das suas funções especializadas (ROSS, 1988).

O início da peroxidação ocorre pelo ataque de qualquer espécie capaz de subtrair um hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas com formação de um radical peroxil, o qual pode atacar um ácido graxo adjacente e

assim propagar a reação (peroxidação lipídica). Uma série de reações é estabelecida e peróxidos de lipídios se acumulam na membrana. Os lipídios peroxidados desestabilizam a membrana e fazem com que ocorra um vazamento de íons. Os radicais peroxil podem agir não somente sobre os lipídios, mas também sobre proteínas de membranas, danificando enzimas, receptores e sistemas de transdução de sinais, além de oxidar o colesterol (HALLIWELL, 1984).

A cadeia transportadora de elétrons parece ser a principal fonte intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na presença de várias drogas ou toxinas, como por exemplo: inibidores da cadeia transportadora de elétrons, desacopladores da fosforilação oxidativa, compostos quinonoídeos e metais, a geração de radicais livres de oxigênio pela mitocôndria pode ser aumentada substancialmente (GERLACH et al., 1995).

O radical aniônico superóxido ($O_2^{\bullet-}$) parece ser o principal produto da redução incompleta do oxigênio sob condições fisiológicas e patológicas. Sob a ação da superóxido dismutase o radical superóxido é transformado em água oxigenada, cuja redução pode originar o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$). Enquanto parte do superóxido e da água oxigenada pode se difundir da mitocôndria e lesar componentes celulares distantes do seu sítio de formação, o radical hidroxil, devido à sua alta reatividade e conseqüente meia vida muito curta, não possui a capacidade de difusão. Dessa forma, os efeitos das EROs podem ser maiores na membrana mitocondrial interna, cujo principal componente da bicamada fosfolipídica é a cardiolipina, um derivado do difosfatidil glicerol, que possui uma alta relação de ácidos graxos insaturados/saturados.

A cardiolipina apresenta uma importante função no controle da permeabilidade da membrana, bem como no estabelecimento do gradiente eletroquímico de prótons.

É ainda um regulador da respiração de estado 3, podendo modular a estrutura secundária de proteínas da membrana interna da mitocôndria, tais como os transportadores de substratos, NADH desidrogenase, citocromo bc1, citocromo c oxidase e ATP sintetase (MASSOTTI et al., 1974). Além disso, a membrana mitocondrial interna possui enzimas contendo ferro e cobre, as quais podem catalisar a reação de oxidação do superóxido e da água oxigenada e formar radicais hidroxilas (ZHANG et al., 1990).

As células possuem diversas estratégias para neutralizar os radicais livres de oxigênio gerados durante as oxidações biológicas prevenindo assim a propagação dos danos. Trata-se de um sistema complexo que compreende: (a) inativação dos radicais livres de oxigênio por enzimas específicas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase); (b) neutralização dos radicais eventualmente formados pela ação de substâncias com propriedades sequestradoras de radicais livres (vitamina E, GSH); (c) reparo dos lipídeos oxidados (glutaredoxina). A geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria é um processo contínuo e fisiologicamente normal em condições aeróbicas, visto que cerca de 1-2% do oxigênio reduzido pela mitocôndria é convertido em superóxido (VERCESI, 1993).

A mais importante defesa contra as lesões oxidativas induzidas pelas espécies reativas de oxigênio é a manutenção da homeostase da glutathione (GSH). A glutathione reduzida serve como substrato para a ação da glutathione peroxidase, na remoção do radical superóxido, e da glutathione transferase, na formação do ácido mercaptúrico, além de atuar como seqüestrador de radicais livres. Atua também como reguladora intracelular de grupos sulfidríla de enzimas glicolíticas e de ATPase- Ca^{+2} (BENZI; MORETTI, 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).

As reações dependentes da glutathiona reduzida são de fundamental importância para a proteção da célula contra o estresse oxidativo, por manter a célula em um ambiente reduzido sob condições fisiológicas normais. A quebra da homeostase dos compostos de sulfidrilas em células tratadas com pró-oxidantes provoca enfraquecimento do sistema de translocação do cálcio, estimulação dos canais de cálcio e inibição do seqüestro de cálcio pelo retículo endoplasmático e mitocôndria. Isto resulta na incapacidade da célula em manter a concentração do cálcio intracelular em níveis fisiológicos. Esse aumento intracelular da concentração do cálcio pode causar a ativação de várias enzimas cálcio-dependentes (fosfolipases, proteases e endonucleases) relacionadas aos processos de degradação de macromoléculas, o que pode contribuir para a morte da célula (ORRENIUS; NICOTERA, 1994; VERCESI, 1993; TRUMP; BEREZESKY, 1995).

No entanto, quando há uma produção excessiva dessas espécies de oxigênio e as defesas antioxidantes mitocondriais são insuficientes para neutralizá-los, estabelece-se uma situação conhecida como estresse oxidativo. As proteínas mais sensíveis são aquelas que possuem grupamento sulfidrilas em sua estrutura. A modificação na estrutura dessas proteínas pelo estresse oxidativo geralmente é acompanhada da alteração de várias funções celulares, resultando em inibição do metabolismo do fosfoinosítideo, quebra da homeostase intracelular do cálcio e comprometimento do citoesqueleto normal da célula. Esse último efeito pode ser o responsável pela invaginação da membrana plasmática observada em células expostas a concentrações citotóxicas de pró-oxidantes (OLIVER et al., 1990).

10. Hepatotoxicidade induzida pela Cisplatina

Embora a nefrotoxicidade da cisplatina seja reconhecidamente o principal fator limitante de dose, pouco se sabe sobre os danos hepáticos induzidos pela cisplatina. A hepatotoxicidade não é considerada como um fator limitante na terapia com a cisplatina, mas pode ocorrer quando o antineoplásico é administrado em altas doses (ZICCA et al., 2002; CERSOSIMO, 1987). Em um estudo para avaliação do efeito protetor da procainamida, Fenoglio et al. (2005) relatam a indução de dano renal e hepático em ratos pela administração repetida de baixas doses de cisplatina (1mg/kg, duas vezes por semana, durante 10 semanas, perfazendo uma dose cumulativa de 20 mg/kg). Adicionalmente, um estudo realizado *in vitro* e *in vivo*, indica que a expressão elevada da isoenzima 2E1 do citocromo P450 (CYP2E1) intensifica a hepatotoxicidade induzida pela cisplatina, e que o mecanismo responsável por este efeito provavelmente envolve a produção aumentada de EROs e estresse oxidativo (LU; CEDERBAUM, 2006).

Se por um lado a nefrotoxicidade decorrente do tratamento com cisplatina tem sido bem caracterizada, por outro, a hepatotoxicidade é o efeito tóxico menos estudado, sendo que os mecanismos moleculares envolvidos neste efeito ainda não foram caracterizados (PRATIBHA et al., 2006). Pelo exposto, fica clara a necessidade do estudo e da caracterização dos mecanismos moleculares responsáveis pela hepatotoxicidade induzida pela cisplatina, que embora menos freqüente e limitante do que a nefrotoxicidade pode constituir um efeito tóxico importante em certas situações particulares.

11. Indução de apoptose por antineoplásicos

Quando o metabolismo energético ou o estado redox mitocondrial é severamente afetado, os mecanismos responsáveis pela necrose ou apoptose são ativados, resultando em morte celular. Em geral, quando o agente tóxico está presente no meio biológico, em concentrações capazes de provocar lesões celulares intensas ou grandes perturbações, 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 onde se observam extremos danos celulares (RAFFRAY; COHEN, 1997).

A atividade antitumoral envolve a apoptose das células tumorais em resposta ao estresse oxidativo e aos radicais de oxigênio, resultando na lesão do DNA (BROWN; BICKNELL, 2001).

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 das caspases, seguida pela invaginação da membrana plasmática com conseqüente exteriorização da fosfoserina intracelular, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos que são assimilados e degradados por células vizinhas (HENGARTNER, 2000; NAGATA, 2000).

A condensação nuclear associada à apoptose é comumente acompanhada pela ativação de nucleases, que primeiramente degradam o DNA cromossomal em subunidades características de 50-300 kb e então em unidades menores de aproximadamente 180 pares de bases (WYLLIE, 1980). Devido ao fato da

integridade da membrana plasmática ser mantida durante a apoptose, não ocorre a liberação 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 acidental que causa inchamento celular e de organelas, rompimento da membrana plasmática, liberação de enzimas dos lisossomas e vazamento do conteúdo da célula para o meio extracelular (TRUMP; BEREZESKY, 1995).

Muitos estudos reportam que os níveis intracelulares de ATP são importantes determinantes da forma com que ocorre a 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 de ATP.

As primeiras evidências que apontavam a participação das mitocôndrias no processo apoptótico foram apresentadas por Neymeyer et al. (1994). Em estudos realizados com extratos de ovos de *Xenopus*, estes autores observaram a necessidade da presença de mitocôndrias nos fragmentos das membranas utilizadas nos experimentos para a ocorrência da apoptose.

Em outro estudo, Liu et al. (1996) constataram que havia liberação do citocromo c da mitocôndria durante a preparação de extratos de células HeLa, o que estimulava a atividade da pró-caspase 3 na presença de ATP. Muitos outros 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 a Apaf-1 e com a pro-caspase-9 formando o complexo apoptosoma com consequente 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).

O citocromo c está ligado à superfície externa de fosfolipídios da membrana mitocondrial, principalmente a moléculas de cardiolipina. Tem sido relatado que oxidação da cardiolipina induzida por EROs colabora para a liberação do citocromo c, atuando desta forma no processo apoptótico (PETROSILLO; RUGGIERO; PARADIES, 2003).

Diversos estudos já demonstraram que algumas espécies reativas de oxigênio são capazes de induzir diretamente a apoptose: H_2O_2 (ZETTL et al., 1997), $O_2^{\bullet}$ (JABS; DIETRICH; DANG, 1996), $OH^{\bullet}$ (JACOBSON; RAFF, 1995) e peróxidos de lipídios (SANDSTROM, 1994). Da mesma forma, em situações em que haja redução na capacidade celular de eliminar espécies reativas de oxigênio como, por exemplo, tratando-se fibroblastos com butionina sulfoxamina, que causa inibição da síntese de glutathione 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). Por outro lado, antioxidantes como hidroxí anisol butilado (BHA) e quelantes de metais foram capazes de retardar, de forma bastante acentuada, a apoptose em células leucêmicas irradiadas com UV (VERHAEGEN, 1995).

Similarmente, o BHA protege as células da apoptose induzida pelo TNF (fator de necrose tumoral) (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1993) e da apoptose dependente do p53 (JOHNSON et al., 1996).

A execução do programa de apoptose na mitocôndria está associada ao acúmulo de produtos de peroxidação lipídica requeridos para a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol. Isto sugere que antioxidantes lipídicos capazes de inibir a

peroxidação lipídica podem agir como agentes anti-apoptóticos (TYURINA et al., 2006).

12. Antioxidantes

O termo antioxidante é utilizado, de um modo geral, para agentes capazes de interferir no processo responsável pelo estresse oxidativo (KAHL, 1991).

Segundo Halliwell (1997), antioxidante é definido como: “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparadas às de um substrato oxidável, retarda significativamente ou impede a oxidação deste substrato”. A célula possui abundância de substratos oxidáveis, como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA. Assim, os antioxidantes agem prevenindo a formação ou detoxificando os radicais livres e seqüestrando as espécies reativas de oxigênio (EROs) ou seus precursores (SHEU; NAUDURI; ANDERS, 2006).

De acordo com a Farmacopéia Britânica (1979) os antioxidantes podem ser classificados da seguinte maneira: (i) agentes antioxidantes verdadeiros: bloqueiam reações em cadeia por reagirem com radicais livres, sendo ineficazes contra os agentes oxidantes; (ii) agentes redutores: são mais facilmente oxidados do que o substrato em questão, sendo efetivos contra agentes oxidantes; e (iii) antioxidantes sinérgicos: manifestam baixo efeito antioxidante, mas aumentam consideravelmente o efeito dos antioxidantes verdadeiros (VICHNEVETSKAIA; ROY, 1999).

Muitos agentes citoprotetores (seqüestradores de radicais livres e antioxidantes) têm sido desenvolvidos para proteger as células normais da ação tóxica da quimioterapia (SOUZA et al., 2000; KINTZEL, 2001, CONKLIN, 2004).

Determinados antioxidantes parecem prevenir a formação de EROs que ocorre com a administração de agentes antineoplásicos. A administração destes

compostos durante a quimioterapia pode reduzir o aparecimento de efeitos adversos e melhorar a resposta terapêutica. Vários estudos pré-clínicos e alguns estudos clínicos confirmam a importância da terapia antioxidante como adjuvante da quimioterapia (BLOCK, 2004; LAMSON; BRIGNALL, 1999).

O agente protetor ideal seria aquele capaz de permitir a intensificação da dose dos quimioterápicos, protegendo um maior número de órgãos e tecidos em relação a um maior número de agentes quimioterápicos, além de preservar a ação anti-tumoral e possuir baixa toxicidade intrínseca (SOUZA et al., 2000).

A quimioterapia com cisplatina provoca uma queda nos níveis plasmáticos de antioxidantes (vitaminas C e E, ácido úrico e ceruloplasmina), acarretando falhas na defesa antioxidante do organismo contra os danos provocados pelo antineoplásico (WEIJL et al., 1998).

O aumento das doses da quimioterapia/radioterapia, com o objetivo de melhorar e prolongar a duração da resposta terapêutica é frequentemente limitado pela toxicidade. No Brasil são empregados três fármacos com função citoprotetora: Dexrazoxane (proteção de células cardíacas), Mesna (proteção das vias urinárias) e Amifostina (amplo espectro de proteção), sendo esta última indicada para reduzir a toxicidade cumulativa associada ao uso de cisplatinas e agentes alquilantes (SOUZA et al., 2000).

A amifostina é um pró-fármaco que por ação da fosfatase alcalina de membrana, sofre defosforilação e origina um grupo sulfidril capaz de neutralizar produtos reativos dos organoplatinados e de reagentes alquilantes. O metabólito originado previne a formação de adutos de DNA com o quimioterápico e tem a capacidade de reverter os adutos formados (KOUKOURAKIS, 2002). No entanto, o uso de amifostina está comumente associado a náuseas, vômito, hipotensão e

hipocalcemia transitórias (VOGELZANG; TORKELSON; KENNEDY, 1985). Tem sido relatado que a administração de amifostina reduz a toxicidade induzida pela cisplatina em alguns estudos, porém não em todos. Seus efeitos adversos, especialmente hipotensão transitória, responsável pela morte de pelo menos uma paciente, limita sua utilização clínica (WEIJL; CLETON; OSANTO, 1997).

Muitos estudos sugerem que a suplementação com um antioxidante poderia minimizar a hepatotoxicidade induzida pela cisplatina (IRAZ et al., 2006).

A dimetiltiouréia ou DMTU (estrutura química representada na **Fig. 3**) 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 utilizada 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 a DMTU também possui atividade seqüestradora de HOCl (ácido hipocloroso), produzido pela mieloperoxidase neutrofílica (WASIL et al., 1987). A DMTU praticamente não possui atividade sobre o $\text{O}_2^{\bullet-}$ e seqüestra H_2O_2 muito lentamente, enquanto o seqüestro de radicais hidroxila se dá muito eficazmente. Assim sendo, a utilização da 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 3. Estrutura química da Dimetiltiourea- DMTU ($C_3H_8N_2S$)

13. O papel da cisplatina na quimioterapia do câncer

Na tentativa de superar as limitações de uso da cisplatina e aumentar o espectro de tumores tratáveis, muitos análogos de platina têm sido sintetizados e testados como possíveis agentes antineoplásicos. Porém, dentre todos esses compostos, apenas dois obtiveram aprovação do FDA, a carboplatina e a oxaliplatina, os quais são 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. 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).

A administração de elevadas doses de cisplatina tem sido empregada na quimioterapia, o que aumenta o risco de desenvolvimento de hepatotoxicidade, efeito menos freqüente e pouco explorado, mas importante em condições específicas como na utilização de elevadas doses do fármaco e em caso de polimorfismo do CYP2E1 (KOC et al., 2005; LU; CEDERBAUM, 2006). Assim,

entender os mecanismos pelos quais a cisplatina age e exerce seus efeitos adversos sobre o fígado, bem como o mecanismo de ação de possíveis agentes citoprotetores é condição importante para o desenvolvimento de novos complexos de platina e de agentes capazes de minimizar a hepatotoxicidade induzida por este fármaco.

Como a mitocôndria é o principal alvo de muitos fármacos anticâncer, incluindo os compostos de platina (SQUID et al., 2003), tornam-se necessários estudos que avaliem o impacto do estresse oxidativo na eficácia da quimioterapia do câncer, 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 hepáticos e os métodos efetivos para a prevenção deste efeito não foram suficientemente estudados.

A elucidação do papel do estresse oxidativo e do estado redox mitocondrial no desenvolvimento da hepatotoxicidade e da apoptose induzida pela cisplatina, pode contribuir para o aumento da eficácia do tratamento, particularmente nos casos de resistência celular, quando se faz necessária a utilização de elevadas doses do quimioterápico predispondo o paciente a este efeito tóxico. O entendimento dos mecanismos moleculares responsáveis pela hepatotoxicidade também pode conduzir a estratégias que possibilitem o uso de antioxidantes para conter os danos causados pelas EROs, inibindo os mecanismos apoptóticos ativados pela cisplatina nas células hepáticas.

Com base nestas considerações, no presente estudo investigou-se o envolvimento dos danos oxidativos mitocondriais hepáticos (avaliação da função, do

estado redox e do estresse oxidativo mitocondrial) e da apoptose, na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos. A dimetiltiouréia (DMTU) foi utilizada como droga modelo na avaliação do efeito da terapia antioxidante na prevenção dos danos oxidativos mitocondriais hepáticos e da morte celular por apoptose decorrentes da administração da cisplatina em ratos.

"No que diz respeito a todos os atos de iniciativa e criação, há uma verdade elementar- assim que a pessoa se engaja definitivamente, a Providência também entra em ação"

Johann Wolfgang Von Goethe

II. Objetivos

- ◆ Estudar os mecanismos moleculares envolvidos no dano mitocondrial hepático induzido pela cisplatina em rato.
- ◆ Investigar o possível efeito protetor da DMTU como modelo de composto antioxidante, com relação à citotoxicidade induzida pela cisplatina em mitocôndria de fígado de rato, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nesta proteção.

"Problemas são como facas que nos alavancam
ou nos ferem, dependendo de como as
manejamos, pelo cabo ou pela lâmina."
Herman Melville

III. Materiais e Métodos

1. Reagentes

Cisplatina (cis-diaminoplatina (II) dicloreto), dimetiltiouréia (DMTU), NADPH foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, USA). Tiopental sódico (Thiopentax ®) foi obtido da Cristália - Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (Itapira, SP, Brasil). Todos os demais reagentes usados foram grau analítico P.A. 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. Modelo experimental

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 realizados estudos *in vivo*, utilizando-se ratos Wistar machos, adultos, pesando 200-220 g, obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os animais foram mantidos em salas com temperatura controlada (22- 24 °C) e com ciclos de 12 horas de claro e escuro, e durante todo o experimento receberam ração padrão e água *ad libitum*.

3. Tratamento dos animais

Os animais foram separados em 4 grupos de 8 animais cada:

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

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

3- **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.);

4- **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 no 3º dia, 72 horas após o início do tratamento. As amostras de soro e a fração mitocondrial hepática foram obtidas no 3º dia.

4. Isolamento da fração mitocondrial

Após o período de 72 horas, os animais, tratados de acordo com o procedimento acima descrito, foram anestesiados com tiopental sódico (60 mg/kg de peso), por injeção intraperitonal (BERRY; EDWARDS; BARRITT; 1991) e sacrificados por decapitação. Foi coletado sangue e separado o soro para análise das transaminases. O fígado foi alcançado por incisão na cavidade abdominal, imediatamente removido e cortado em pequenos fragmentos em 50 ml de meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM, e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4. Os fragmentos foram lavados no mesmo meio e homogeneizados três vezes em Potter-Elvehjen por 15 segundos, com intervalos de 1 minuto. As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial (PEDERSEN et al., 1978). O homogenato foi centrifugado a 755 x g por 5 minutos, o sobrenadante foi separado e centrifugado a 13.300 x g por 10 minutos. O precipitado (fração mitocondrial) foi então retomado com 10 ml do meio de lavagem contendo sacarose 250 mM, EGTA 0,3 mM, e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, e novamente centrifugado a 13.300 x g por 10 minutos.

O sedimento mitocondrial final foi retomado em 1 ml de meio contendo sacarose 250 mM, e HEPES-KOH 10 mM, pH 7.4. Todos os ensaios relacionados à função mitocondrial foram realizados dentro de um período máximo de 4 horas após o isolamento. Todos os ensaios com a fração mitocondrial foram realizados em triplicata.

5. Determinação da Proteína Mitocondrial

A proteína mitocondrial foi determinada por reação colorimétrica a 540 nm pelo método do biureto, de acordo com CAIN e SKILLETER (1987). A concentração de proteína foi determinada a partir de uma curva padrão preparada com concentrações conhecidas de soro albumina bovina.

6. Determinação de ALT

Para determinação de ALT (alanina-aminotransferase) foram colhidos 3ml de sangue de cada animal tratado. Para esta análise, os animais ficaram 8 horas em jejum antes de serem sacrificados.

O sangue foi centrifugado para a obtenção do soro e a análise foi realizada com utilização do kit diagnóstico de ALT (@LABTEST) seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. A reação foi realizada a 37°C e as leituras foram determinadas em 340 nm em espectrofotômetro Hitachi modelo U-3000.

7. Determinação de AST

Para determinação de AST (aspartato aminotransferase) foram colhidos 3ml de sangue de cada animal tratado. Para esta análise, os animais ficaram 8 horas em jejum antes de serem sacrificados.

O sangue foi centrifugado para a obtenção do soro e a análise foi realizada com utilização do kit diagnóstico de ALT (@LABTEST) seguindo-se o procedimento descrito pelo fabricante. As absorbâncias foram determinadas em 505 nm em espectrofotômetro Hitachi modelo U-3000.

8. Determinação de ATP

A determinação de ATP foi realizada pelo tratamento das mitocôndrias (1 mg) com 1 mL de Ácido Perclórico gelado, seguido de agitação em mixer e posterior centrifugação a $2.300 \times g$ por 5 minutos. Em seguida, 100 μ l do sobrenadante foram tratados com 70 μ l de KOH 2 M e 830 μ l de tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,8) e centrifugados a $15.000 \times g$ por 10 minutos. A quantidade de ATP foi determinada por luminescência com o emprego do kit comercial ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATE (ATP) BIOLUMINESCENT ASSAY KIT (SIGMA)[®]. As leituras foram realizadas em luminômetro GBerthold modelo AutoLumat LB 953 EG.

9. Determinação da fluidez de membrana

A fluidez da membrana mitocondrial foi determinada pela anisotropia da fluorescência (r). 1mg de proteína mitocondrial foi ressuspendido em 2mL de tampão tris-HCl 10mM, pH 7,4 e adicionado de 40 μ l de difenilhexatrieno (DPH) em solução de tetrazolium (20 μ g/mL) e incubado a 25° C por 30 min. A fluorescência foi determinada a 360 nm (excitação) e 430 nm (emissão). As medidas foram realizadas em espectrofotômetro Hitachi equipado com um sistema polarizador. Os dados da anisotropia da fluorescência foram calculados usando a fórmula $r = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$ e $I_{\parallel}$ e $I_{\perp}$ referem-se, respectivamente a intensidade da emissão da luz fluorescente medida paralela e perpendicularmente ao plano de polarização do feixe de

excitação. Um aumento na anisotropia da fluorescência (r) reflete em uma redução na mobilidade da sonda e a um aumento na ordem estrutural da membrana ou a uma redução da fluidez de membrana (PRAET ET AL, 1986; SILVA ET AL, 2002).

10. Determinação 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 NAO 5 μ M, 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).

11. Lipoperoxidação da Membrana Mitocondrial

A avaliação da peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana mitocondrial, foi realizada através da determinação de 2 aldeídos: malondialdeído (MDA) e 4- hidroxinonenal (4-HNE). Utilizou-se 1 mg de proteína mitocondrial. As amostras foram submetidas ao ensaio colorimétrico para peroxidação lipídica, utilizando-se o kit comercial “Lipid Peroxidation Assay” (Cat.nº 437634, Calbiochem). Por este procedimento, MDA e 4-HNE reagem com um reagente cromogênico (N-metil 2 fenil indol), produzindo um cromóforo estável com máxima absorbância em 586 nm, a qual foi determinada em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3000.

12. Oxidação de proteínas sulfidrílicas (P-SH)

O conteúdo de proteínas sulfidrílicas foi determinado de acordo com o método previamente descrito por Grattagliano et al. (1996). As proteínas da suspensão mitocondrial (4 mg) foram precipitadas com ácido sulfosalicílico 4% e centrifugadas a $4.500 \times g$ por 5 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com ácido sulfosalicílico a 2 % para remover os grupamentos sulfidrílicos livres e, em seguida foi ressuspenso com Guanidina 6 M, pH 6. As leituras foram determinadas a 412 nm e 530 nm, antes e após a adição de 50 μ l de DTNB 10mM (ácido 5,5'-ditiobis [2-nitrobenzóico]), solubilizado em metanol. O DTNB foi adicionado após 30 min. que foi realizada a 1ª leitura. A leitura após adição de DTNB foi realizada no escuro. As concentrações de P-SH foram calculadas com base em uma curva padrão preparada com glutathione reduzida (GSH) .

13. Determinação de Glutathione (níveis de GSH e GSSG)

Os níveis de glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram medidos pelo método enzimático cíclico proposto por Tietze (1969) com algumas modificações. A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína) foi tratada com 500 μ l de HClO_4 0,4 M (ácido perclórico) e centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 minutos, a 4°C. Na determinação da GSH, uma alíquota de 50 μ l do sobrenadante foi adicionada em uma cubeta a 500 μ l de um meio composto de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4 ; EDTA 1 mM e NADPH 3 mM e, em seguida foi adicionado 50 μ l de DTNB 10mM (5,5-ditiobis [2- ácido nitrobenzóico]). Após incubação por 1 min., 100 μ l de glutathione redutase (5 U/ml) foi adicionada e a leitura da absorvância em 412 nm foi monitorada por 5 min. GSSG foi medida nas amostras previamente neutralizadas com 100mg de carbonato de sódio e tratadas com 4 μ l de 2- vinilpiridina. Após 1 hora de incubação ao abrigo da luz as

amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi submetido ao procedimento acima para a determinação de GSH. A curva de calibração, submetida ao mesmo procedimento da amostra, foi usada como referência para calcular as concentrações de GSH e GSSG.

14. Determinação do estado redox de NAD(P)

A oxidação e/ou redução 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.

15. Determinação da atividade da caspase 3

O homogenato do fígado foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min., a 4° C e o sobrenadante resultante foi diluído a 2mg/ml em meio contendo sacarose 250 mM, EGTA 1 mM 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).

16. 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 versão 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA”. Adotou-se $p < 0,05$ como nível de significância.

"A coisa mais bela consiste em ser útil ao próximo."
Sófocles

IV. Resultados

Para a determinação dos níveis de significância os resultados foram analisados de acordo com os seguintes critérios:

1º) O grupo tratado com cisplatina foi comparado ao grupo controle, ou seja, aquele tratado com veículo (salina), para comprovação da hepatotoxicidade induzida pela cisplatina, validação do modelo experimental e estudo dos mecanismos moleculares responsáveis por este efeito tóxico;

2º) O grupo tratado com DMTU + cisplatina foi comparado ao grupo tratado somente com cisplatina (agente hepatotóxico), com o intuito de investigar-se uma possível proteção e os mecanismos moleculares envolvidos nesta proteção;

3º) O grupo tratado apenas com o suposto agente protetor, DMTU, foi comparado ao grupo tratado com solução salina, para verificar-se a possibilidade de ocorrência de outros efeitos do DMTU sobre as mitocôndrias, além do suposto efeito protetor contra a hepatotoxicidade. Os resultados de todos os ensaios realizados no grupo tratado apenas com DMTU i.p. não apresentaram diferença significativa para, $p < 0,05$, quando comparados aos resultados do grupo tratado com salina (controle), demonstrando que o DMTU não exerceu nenhum efeito direto sobre as mitocôndrias que pudesse interferir com a validade do modelo experimental e com as conclusões baseadas nos efeitos observados.

As médias e os valores de desvio padrão da média 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 1**.

Tabela 1 Resultados obtidos dos parâmetros relacionados às funções hepática e mitocondrial, ao estado redox mitocondrial, ao estresse oxidativo mitocondrial e à apoptose em fígado de ratos submetidos aos diferentes tratamentos: salina (controle), cisplatina, DMTU + cisplatina e DMTU.

Parâmetro	Unidade	Controle	Cisplatina	DMTU + cisplatina	DMTU	Figura
AST	U/ml	86,34 ± 1,90	183,26 * (± 5,83)	92,06 # (±4,21)	78,07 (± 3,58)	4
ALT	U/ml	54,81 ± 3,40	106,50 * (± 5,41)	74,03 # (±3,74)	60,97 (± 2,75)	5
Síntese de ATP	% em relação ao controle	100 ± 8,51	66,63 * (± 8,31)	91,73 # (±8,00)	94,93 (± 8,79)	6
Fluidez de membrana		0,20 ± 0,006	0,25* (± 0,006)	0,21 # (± 0,005)	0,20 (±0,006)	7
MDA+ 4-HNE	nmoles/mg de proteína	5,43 ± 0,88	9,83 * (± 1,58)	6,29 # (± 0,71)	5,05 (± 0,57)	8
Cardiolipina	% em relação ao controle	100,00 ± 7,69	75,77 * (± 4,73)	95,61 # (± 5,01)	106,49 (± 8,91)	9
Proteína Sulfidrílica	nmoles/mg de proteína	50,01 ± 5,28	33,93 * (± 2,75)	44,18 # (± 3,48)	51,75 (± 6,74)	10
GSH	nmoles/mg de proteína	7,23 ± 1,16	4,09 * (± 0,67)	6,59 # (± 0,78)	7,19 (± 1,36)	11A
GSSG	nmoles/mg de proteína	0,41 ± 0,07	0,73 * (± 0,11)	0,41 # (± 0,07)	0,40 (± 0,08)	11B
GSH/GSSG	nmoles/mg de proteína	20,39 ± 4,61	5,53 * (± 1,12)	17,41 # (± 2,69)	25,42 (± 5,44)	11C
NAD(P)H	Fluorescência relativa/mg de proteína	200,82 ± 5,39	155,06 * (± 6,83)	206,99 # (± 7,83)	193,31 (± 10,98)	12
Atividade caspase 3	% em relação ao controle	100,00 ± 8,90	146,90 * (± 9,40)	115,90 # (± 6,50)	110,00 (± 12,90)	13

* = significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo controle) # = significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo 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; MDA = malondialdeído; 4-HNE = 4-hidroxi-2 (E)-nonenal; NAD(P)H= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato forma reduzida

Efeito da cisplatina e do DMTU na função hepática

Figura 4 - Níveis de aspartato aminotransferase (AST) no soro de ratos de 4 grupos distintos (n=8, cada): (1º) controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle; # Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

Figura 5 - Níveis de alanina aminotransferase (ALT) no soro de ratos em 4 grupos distintos (n=8, cada): (1º) controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle ; # Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

A cisplatina causou um significativo aumento das transaminases hepáticas AST (**Fig. 4**) e ALT (**Fig. 5**). Os níveis de AST (**Fig. 4**) no grupo cisplatina ($183,26 \pm 5,83$ U/ml) foram significativamente superiores (112,18%) aos do grupo controle ($86,34 \pm 1,90$ U/ml), considerando-se $p < 0,05$. Por outro lado, os níveis de AST do grupo DMTU+cisplatina ($92,06 \pm 4,21$ U/ml) foram significativamente reduzidos (49,75%) quando comparados aos níveis do grupo tratado apenas com cisplatina.

Na **Fig.5** pode-se observar um significativo aumento (93,40%) dos níveis de ALT no grupo cisplatina ($106,50 \pm 5,41$ U/ml) em relação aos níveis do grupo controle ($54,81 \pm 3,39$), considerando-se $p < 0,05$. No entanto, os níveis de ALT no grupo tratado com DMTU+cisplatina ($74,03 \pm 3,74$ U/ml) foram significativamente reduzidos (30,49%) quando comparados ao grupo cisplatina.

Efeito da cisplatina e do DMTU na síntese de ATP

Figura 6 - Níveis de ATP em fígado de ratos de 4 grupos distintos (n=8, cada): (1º) controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle; # significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

A síntese de ATP foi avaliada pela medida do conteúdo de ATP no homogenato hepático. Os níveis de ATP ilustrados graficamente na **Fig. 6**, foram significativamente menores (33,37%, $p < 0,05$) no grupo cisplatina ($66,63 \pm 8,31\%$ do controle) quando comparados aos do grupo controle ($100,00 \pm 8,51$). O DMTU foi capaz de prevenir a redução do conteúdo de ATP, como evidenciado pelos elevados níveis de ATP no grupo DMTU+cisplatina ($91,73 \pm 8,00\%$ do controle) (37,67%) em relação ao grupo cisplatina.

Efeito da cisplatina e do DMTU na fluidez da membrana mitocondrial hepática

Figura 7 – Fluidez da membrana mitocondrial em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos de 4 grupos distintos (n=8, cada): (1º) controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle; # significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

A integridade da membrana mitocondrial foi avaliada pela fluidez de membrana (representada graficamente na **Fig. 7**) através da anisotropia da fluorescência, cujo valor depende da mobilidade da sonda fluorescente (DPH) na dupla camada lipídica da membrana mitocondrial. Quando ocorre danos estruturais e redução da fluidez da membrana mitocondrial os valores da anisotropia da fluorescência aumentam, indicando a ocorrência do processo de rigidez. A rigidez de membrana foi observada no grupo cisplatina ($0,25 \pm 0,006$) quando comparado ao grupo controle ($0,20 \pm 0,006$). No entanto, foi observada a prevenção da rigidez no grupo DMTU + cisplatina ($0,21 \pm 0,005$).

Efeito da cisplatina e do DMTU nos lipídios e proteínas mitocondriais de fígado

Figura 8 - Níveis de malondialdeído + 4 hidroxinonenal em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (n=8, cada) de 4 grupos distintos: (1º) controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle ; # Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

Figura 9 - Níveis de cardiolipina em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos de 4 grupos distintos (n=8, cada): (1º) controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle ; # Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

Figura 10 - Níveis de proteínas sulfidrílicas em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (n=8, cada) de 4 grupos distintos: (1º) controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle ; # Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

As concentrações dos produtos secundários da lipoperoxidação, MDA (malondialdeído) e 4- HNE (4- hidrox-2 (E) nonenal) (**Fig. 8**) foram $5,43 \pm 0,88$ nmoles/mg de proteína no grupo controle e $9,83 \pm 1,58$ nmoles/mg de proteína no grupo cisplatina, indicando indução de lipoperoxidação pela cisplatina. Por conseguinte, o conteúdo do lipídio mitocondrial cardiolipina (**Fig. 9**) foi reduzido no grupo cisplatina ($75,77 \pm 4,73\%$ em relação ao controle) provavelmente devido ao processo de oxidação. A proteção contra a lipoperoxidação foi evidenciada no grupo DMTU + cisplatina pelos menores níveis de MDA e 4-HNE ($6,29 \pm 0,71$ nmoles/mg de proteína) (**Fig. 8**) quando comparado ao grupo cisplatina. Os níveis de cardiolipina (**Fig. 9**) no grupo DMTU + cisplatina foram significativamente diferentes do grupo cisplatina e muito próximo dos níveis do grupo controle ($95,61 \pm 5,01\%$).

A oxidação das proteínas mitocondriais de fígado de rato, avaliada pela determinação das proteínas sulfidrílicas (**Fig. 10**) também foi observada no grupo de animais tratados com cisplatina. Em comparação ao grupo controle, o grupo cisplatina apresentou uma redução significativa na concentração de proteínas sulfidrílicas (de $50,01 \pm 5,28$ para $33,93 \pm 2,75$ nmoles/mg de proteína). O DMTU protegeu contra a oxidação dos grupamentos sulfidrílicos das proteínas como evidenciado pelos níveis diferentes, significativamente, no grupo DMTU + cisplatina ($44,18 \pm 3,48$ nmoles/mg).

Efeito da cisplatina e do DMTU no estado redox mitocondrial

Figura 11- Níveis de GSH (A) ; de GSSG (B) e relação GSH/GSSG (C) em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (n=8) de 4 grupos distintos: (1º) grupo controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle ; # Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina

Figura 12 - Níveis de NAD(P)H em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (n=8) de 4 grupos distintos: (1º) grupo controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle ; # Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

Os níveis de GSH (**Fig. 11A**) e da razão GSH/ GSSG (**Fig. 11C**) no grupo tratado com cisplatina foram $4,09 \pm 0,67$ e $5,53 \pm 1,12$ nmoles/mg de proteína, respectivamente, os quais foram, significativamente menores do que os níveis encontrados no grupo controle ($7,23 \pm 1,16$ e $20,39 \pm 4,61$ nmoles/mg de proteína, respectivamente). Portanto o conteúdo de GSSG (**Fig. 11B**) foi significativamente maior no grupo tratado com cisplatina ($0,73 \pm 0,11$ nmoles/mg de proteína) quando comparado ao grupo controle ($0,41 \pm 0,07$ nmoles/mg de proteína). Entretanto, no grupo de animais tratados com DMTU + cisplatina, os níveis de GSH (**Fig 11A**) mostraram-se, significativamente, maiores e os de GSSG (**Fig. 11B**), significativamente, menores ($6,59 \pm 0,78$ e $0,41 \pm 0,07$ nmoles/mg de proteína, respectivamente, considerando $p < 0,05$) quando comparado ao grupo cisplatina.

Dessa forma, o estado redox mitocondrial representado pela razão GSH/GSSG (**Fig. 11C**) foi, significativamente, maior no grupo tratado com DMTU + CISP ($17,41 \pm 2,69$) em comparação ao grupo cisplatina, indicando claramente, o efeito benéfico do DMTU. Adicionalmente, o conteúdo de NAD(P)H (representado graficamente na **Fig. 12**), avaliado como fluorescência relativa/mg de proteína, que foi significativamente reduzido no grupo tratado com cisplatina ($155,10 \pm 6,83$) quando comparado ao grupo controle ($200,80 \pm 5,39$) mostrou-se elevado no grupo DMTU + cisplatina, aproximando-se do grupo controle ($207,00 \pm 7,83$), constatando mais uma vez, o efeito protetor do DMTU na prevenção da hepatotoxicidade induzida por cisplatina.

Efeito da cisplatina e do DMTU na morte celular induzida por apoptose

Figura 13- Atividade da caspase 3 em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos (n=8, cada) de 4 grupos distintos: (1º) controle (CONTROL), tratado com salina; (2º) tratado com dimetiltiouréia (DMTU); (3º) tratado com cisplatina (CISP) e (4º) tratado com dimetiltiouréia e cisplatina (DMTU+CISP). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. Os resultados foram expressos com média $\pm$ desvio padrão. *Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo controle; # Significativo para $p < 0,05$, em relação ao grupo cisplatina.

A morte celular hepática pelo processo de apoptose foi determinada pela avaliação do efeito da atividade da executora caspase-3 representado na **Fig. 13**. Os resultados revelam um aumento significativo no grupo de animais tratados com cisplatina ($146,90 \pm 9,40$ % em relação ao controle) quando comparado ao grupo controle ($100,00 \pm 8,90$ %), enquanto o grupo de animais tratados com DMTU + CISP apresentou atividade da caspase 3 significativamente menor ($115,90 \pm 6,50$ % do controle) comparado ao grupo cisplatina.

A black and white photograph of a park. In the foreground, a calm pond reflects the sky and the surrounding trees. A dense line of tall, slender trees stands along the edge of the pond. To the left, a building with a thatched roof and a staircase is visible. A few people can be seen walking on a path in the background.

"A opinião de um homem pode mudar honrosamente, desde que a sua consciência não mude".

Victor Hugo

V. Discussão

1. Efeito da cisplatina sobre o fígado: estresse oxidativo e estado redox mitocondrial

A hepatotoxicidade induzida pela cisplatina é um assunto ainda pouco explorado, sendo que os mecanismos envolvidos neste efeito ainda não foram elucidados. Embora menos freqüente que os demais efeitos tóxicos induzidos por este fármaco, a hepatotoxicidade é um evento importante associado ao uso clínico da cisplatina e cuja relevância aumenta em algumas situações específicas relacionadas à dose, a determinadas condições fisiopatológicas e ao uso de certos fármacos.

O fígado acumula grandes quantidades de cisplatina (STEWART et al., 1982), sendo comum a ocorrência de hepatotoxicidade associada à administração deste fármaco em elevadas doses (CAVALLI et al, 1978; CERSOSIMO et al, 1993; POLLERA et al, 1987). A hepatotoxicidade já foi constatada experimentalmente em ratos (NAZIROGLU et al, 2004) e em camundongos tratados com cisplatina (JIE et al, 1998). Vale ressaltar que devido ao desenvolvimento de resistência primária das neoplasias, muitas vezes torna-se necessária a utilização de doses maiores de quimioterápicos, isolados ou mesmo combinados, visando uma maior eficiência da abordagem terapêutica, o que pode expor o paciente a riscos cada vez maiores de efeitos tóxicos, incluindo a hepatotoxicidade (FENOGLIO et al., 2005).

Por outro lado, Fenoglio et al. (2005), em estudo *“in vivo”* para avaliação dos efeitos protetores da procainamida, demonstraram a indução de hepatotoxicidade em ratos após administração repetida de baixas doses de cisplatina (1 mg/kg, duas vezes por semana, durante 10 semanas), situação não rara na abordagem clínica quimioterápica envolvendo a cisplatina.

Zicca et al. (2002) mostraram que a administração de elevada dose (7,5 mg/kg) de cisplatina em ratos induz lesão hepática, caracterizada pela elevação significativa da atividade da transaminase glutâmica oxalacética e da gama-glutamyltranspeptidase. Koc et al. (2005) relataram efeito similar com a administração de 10mg/kg de cisplatina.

Além da dose administrada, a expressão aumentada da isoenzima 2E1 do sistema citocromo P450 (CYP2E1) também é apontada como um fator que poderia contribuir para a exacerbação da hepatotoxicidade induzida pela cisplatina. Em estudo realizado *in vitro* e *in vivo*, Lu e Cederbaum (2005) demonstraram que a expressão elevada do CYP2E1 potencializa o efeito hepatotóxico da cisplatina, por mecanismo envolvendo a produção aumentada de EROs e estresse oxidativo. O CYP2E1 é induzido por uma variedade de condições patológicas e fisiológicas, tais como diabetes e obesidade; por drogas e substâncias químicas como etanol, clorofórmio, isoniazida, tricloroetileno, acetona e piridina. Baixíssimas doses de nicotina também são capazes de induzir o CYP2E1 (CARO; CEDERBAUM, 2003). Em decorrência disso, a indução do CYP2E1 por estas condições e tratamentos constitui um importante fator a ser considerado quando a cisplatina é usada na quimioterapia do câncer, devido à possível potencialização da sua hepatotoxicidade.

Em nossos ensaios "*in vivo*" utilizamos uma dose elevada de cisplatina (10 mg/kg), a qual corresponde à dose de cisplatina freqüentemente utilizada na prática clínica. A dose correspondente em humanos (60 Kg) é de 30 mg/m² (AJITH et al., 2006). A dose utilizada foi o suficiente para induzir hepatotoxicidade em ratos, constatada pela significativa elevação das aminotransferases hepáticas (AST e ALT) no soro dos animais tratados.

A elevada atividade das enzimas aminotransferases, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), bem como da lactato desidrogenase (LDH) e fosfatase alcalina, em muitos pacientes submetidos à terapia com cisplatina constitui evidência clínica de lesão hepática induzida por este quimioterápico (CAVALLI et al, 1978). As aminotransferases, AST e ALT são indicadores sensíveis de lesão celular hepática e constituem ferramentas úteis no reconhecimento de doenças hepatocelulares agudas, como é o caso da hepatite. A AST é encontrada no fígado, miocárdio, músculo esquelético, rins, cérebro, pâncreas, pulmões, leucócitos e eritrócitos, em ordem decrescente de concentração. A ALT é encontrada principalmente no fígado. As aminotransferases estão normalmente presentes no soro em baixas concentrações e são liberadas do fígado em maiores quantidades quando há lesão da membrana celular do hepatócito, resultando em permeabilidade aumentada (PIÑEIRO- CARRERO; PIÑEIRO, 2004; PROVAN; KRENTZ, 2002).

Qualquer tipo de lesão hepática pode causar elevações significativas nas concentrações de aminotransferases AST e ALT (PRATT, 2002). A lesão hepática aguda pode ser de origem citotóxica ou colestásica. A lesão citotóxica assemelha-se à hepatite aguda e é caracterizada por lesão dos hepatócitos com proeminente elevação das aminotransferases (PIÑEIRO- CARRERO; PIÑEIRO, 2004).

No nosso estudo, a função mitocondrial apresentou-se comprometida no grupo cisplatina, o que foi constatado pela redução dos níveis de ATP, dados condizentes aos encontrados na literatura científica com relação a células de outros tecidos, principalmente células renais. Kruideing et al. (1997), utilizando mitocôndrias de células tubulares renais de porco, mostraram evidências da diminuição nos níveis

de ATP intracelular na disfunção mitocondrial induzida pela cisplatina, causada pela inibição dos complexos (de I a IV) da cadeia respiratória.

Em um outro estudo *“in vitro”*, Lieberthal et al. (1998) relataram que células tubulares proximais renais expostas a baixas doses de cisplatina apresentaram uma pequena mudança nos níveis de ATP, bem como características de apoptose, entretanto, doses maiores de cisplatina resultaram em depleção severa de ATP e necrose. Alguns autores sugerem que pode ocorrer uma integração dos mecanismos de apoptose e necrose na morte celular induzida pela cisplatina (DENECKER et al, 2001; GOBE; ENDRE, 2003; CHARLES et al., 2006).

Sabe-se que, de um modo geral, mais de 90% do ATP utilizado no metabolismo celular é sintetizado via fosforilação oxidativa mitocondrial (HATEFI, 1985; HENGARTNER, 2000) e que as mitocôndrias têm uma importante participação nos mecanismos de morte celular por apoptose, via liberação do citocromo c no citosol (HENGARTNER, 2000; LI et al., 1997. SCAFFIDI et al., 1998).

As mitocôndrias são alvos críticos para a ação tóxica de xenobióticos, incluindo os agentes quimioterápicos. A eficiência da produção de ATP pode ser reduzida por muitas drogas ou fármacos, incluindo os antitumorais (WALLACE; STARKOV, 2000). A inibição direta da cadeia respiratória por toxinas, incluindo fármacos, rapidamente diminui os níveis de ATP celular, promovendo morte celular (SZEWCZYK; WOJTCZAK, 2002). A reduzida síntese de ATP tem ainda sérias implicações para o metabolismo hepático, uma vez que os hepatócitos requerem elevada produção de ATP para ureagênese, gliconeogênese, e metabolismo de ácidos graxos além de vários outros processos metabólicos (JAESCHKE et al., 2002).

A cisplatina afeta seletivamente a mitocôndria provavelmente devido ao seu acúmulo na matriz mitocondrial, carregada negativamente, sendo que há relatos deste acúmulo provenientes de estudos *“in vitro”* com mitocôndrias de células renais (GEMBA; FUKUISHI, 1991) e em estudos *“in vivo”* com mitocôndrias de células renais e hepáticas (ROSEN et al, 1992). Processos celulares, incluindo síntese de proteína, lipogênese e transporte de membrana, tornam-se alterados quando o ATP é marcadamente diminuído, e a depleção de ATP causa alterações no citoesqueleto de actina, resultando na perda do domínio de membrana e desacoplamento celular. A preservação dos níveis de ATP pode ser crucial para manutenção da integridade e sobrevivência celular (ANTUNES, et al., 2006).

Além da disfunção mitocondrial, a cisplatina também induziu lesão na estrutura mitocondrial, evidenciada pela reduzida fluidez da membrana mitocondrial. Estas alterações na estrutura e função mitocondrial foram propostas como eventos que precedem o processo apoptótico e ocorrem antes das estruturas nuclear e da cromatina serem afetadas, sugerindo que a mitocôndria pode desempenhar um papel chave na apoptose (IGUCHI et al., 2004; KHARBANGAR et al., 2000).

De acordo com os nossos estudos, a cisplatina também induziu o ataque oxidativo aos lipídios e proteínas mitocondriais, como evidenciado pelo aumento da peroxidação lipídica, redução da cardiolipina e dos níveis de proteínas sulfidrílicas.

A cardiolipina é um fosfolípido aniônico insaturado, encontrado quase que exclusivamente na membrana mitocondrial interna e que tem importante papel na estrutura e função mitocondriais (HOCH, 1992; SCHLAME et al, 2000). A cardiolipina interage com vários complexos protéicos da membrana mitocondrial interna, sendo um componente essencial para o transporte de proteínas e ainda para a manutenção da integridade da membrana mitocondrial (SCHLAME et al., 2000),

conferindo estabilidade e fluidez à membrana mitocondrial (FARISS et al., 2005). Assim, este lipídio exerce ainda um papel importante na atividade da FoF₁-ATPase (HOCH, 1992), no transporte de elétrons na cadeia respiratória e na translocação de ADP/ATP, além de participar no processo de apoptose (SCHLAME et al., 2000; ZHANG et al, 2002).

A oxidação desse lipídio mitocondrial, demonstrado no grupo cisplatina, pode contribuir para a rigidez da membrana mitocondrial, também observada em nossos estudos. A cardiolipina apresenta a função de suporte para a cadeia transportadora de elétrons, desde que ela firma os complexos III e IV formando um supercomplexo (HAUFF; HATCH, 2006). Portanto, nossos resultados estão de acordo com esta proposição, uma vez que a oxidação da cardiolipina poderia ter causado “quebra” da cadeia respiratória com subsequente prejuízo da fosforilação oxidativa hepática, o que poderia explicar os níveis reduzidos de ATP no grupo de animais tratados com cisplatina.

Em um experimento com hamsters mutantes (com síntese de cardiolipina reduzida), KAWASAKI et al. (1999) observaram alterações morfológicas e funcionais em mitocôndrias, incluindo redução na produção de ATP, também constatada em nossos estudos. Petrosillo et. al. (2003) demonstraram que a produção de EROs pela mitocôndria afeta a atividade dos complexos I, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial através do dano oxidativo da cardiolipina.

Devido ao seu elevado conteúdo de ácidos graxos polinsaturados ou devido à sua localização na membrana mitocondrial interna, próxima ao sítio de produção de EROs, a cardiolipina parece ser, particularmente, suscetível ao ataque de EROs (PETROSILLO et. al., 2003).

Adicionalmente, tem sido sugerido que a oxidação da cardiolipina está também envolvida na liberação do citocromo c para o citosol, um importante evento no mecanismo mitocondrial da morte celular induzida por apoptose (FARISS et al., 2005; HAUFF; HATCH, 2006). Como o citocromo c encontra-se ligado à superfície externa da membrana mitocondrial interna pela associação com a cardiolipina, a oxidação da cardiolipina pode resultar na liberação deste fator pró-apoptótico, conduzindo à morte celular por apoptose (SHIDOJI et al, 1999).

Por conseguinte, nós demonstramos que a atividade da caspase-3 foi elevada no grupo tratado com cisplatina, o que indica claramente, a participação da morte celular programada no mecanismo de hepatotoxicidade induzida pela cisplatina. Nossos resultados estão de acordo com dados obtidos por Liu et al., 1998, os quais demonstraram que a apoptose é o principal mecanismo para a eliminação das células lesadas no dano hepático induzido pela cisplatina.

Nosso relato é o primeiro a demonstrar uma possível associação entre a oxidação da cardiolipina e morte hepatocelular aumentada por apoptose na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina. Estes resultados sugerem que a cisplatina induz apoptose celular hepática ao menos em parte, por mecanismo via mitocôndria, uma vez que a oxidação da cardiolipina pode levar à liberação do citocromo c e à ativação da cascata de caspase. A apoptose tem sido postulada ocorrer tanto por mecanismo mitocondrial quanto por mecanismo não mitocondrial no caso da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; TSURUYA et al., 2003).

Além da oxidação da cardiolipina, no presente estudo observou-se também a ocorrência de peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento significativo de malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), aldeídos originários da

decomposição dos peróxidos dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana mitocondrial.

Os lipídios celulares são alguns dos vários alvos dos radicais livres formados durante o estresse oxidativo (CONKLIN, 2004). Os lipídios desempenham um importante papel nos vários componentes celulares, o que justifica a necessidade da compreensão dos mecanismos e conseqüências da peroxidação lipídica nos sistemas biológicos (KELLY et al., 1998).

Os fosfolipídios de membrana estão entre as moléculas orgânicas mais instáveis, devido ao seu elevado conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (VLADIMIROV et al., 1981). A peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados resulta na formação de radicais peroxil e alcóxil. Estes produtos primários da peroxidação lipídica, que são altamente reativos e tem curta duração, sofrem reações formando produtos secundários da peroxidação lipídica que incluem uma variedade de aldeídos, como MDA, 4-HNE e acroleína. Os aldeídos são mais estáveis do que os produtos primários e podem se difundir através da célula, lesando os componentes da membrana e interferindo nas funções celulares. Devido às suas características eletrofílicas, os aldeídos se ligam aos grupos nucleofílicos dos aminoácidos como cisteína, lisina, histidina, serina e tirosina, os quais são componentes críticos dos sítios ativos de enzimas ou são necessários para a manutenção da estrutura terciária das proteínas. A ligação destes aldeídos a proteínas resulta na inibição enzimática e na alteração da estrutura dos receptores celulares, constituindo um evento chave da citotoxicidade dos agentes antineoplásicos (CONKLIN, 2004).

Alterações das funções hepática e renal em decorrência da ação tóxica de xenobióticos podem estar associadas à lipoperoxidação tecidual (WEIJL et al., 1997; NAZIROGLU et al., 2004). Acredita-se que oxidação de lipídios de membrana e

outros componentes sejam os principais fatores responsáveis pela toxicidade da cisplatina (OZYURT et al., 2004).

A peroxidação lipídica interfere nas funções biológicas, por provocar alterações em organelas celulares, incluindo os peroxissomas (DE DUVE, 1969), lisossomas (DE DUVE; WATTIAUX 1966), retículo endoplasmático (WILLS, 1971), e mitocôndrias (NOHL; HEGNER 1978). Hemoproteínas e complexos não heme de ferro, cobre e manganês são constituintes das membranas celulares que podem formar radicais livres provocando oxidação de ácidos graxos, mudanças na fluidez e na permeabilidade da membrana, resultando em alterações funcionais celulares (MIQUEI, 1989).

Como a mitocôndria é uma organela cuja função depende inteiramente da integridade do sistema de membranas, alterações de constituintes deste sistema podem comprometer a função mitocondrial. O acúmulo de produtos de peroxidação lipídica contribui para a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol e conseqüentemente para a execução do programa de apoptose (TYURINA et al., 2006).

Os peróxidos lipídicos podem também provocar a oxidação de grupos sulfidrílicos de proteínas, comprometendo a atividade enzimática (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985), o que condiz com nossos resultados, visto que o grupo de animais que recebeu cisplatina apresentou uma redução significativa das proteínas sulfidrílicas quando comparado ao grupo controle.

Proteínas com grupamentos sulfidrílicos são muito sensíveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio e parte dos grupos sulfidrílicos 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 transição da permeabilidade mitocondrial (TPM), responsável por disfunção mitocondrial irreversível.

Zhang e Lindup (1994) através de estudos *in vitro* com mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos, incubadas com cisplatina 2 mM durante 120 minutos também demonstraram que este fármaco provoca depleção de proteínas com grupamentos sulfidrilícos. Senturker et al. (2002), usando linfoma de células B humanas como alvo da ação pró-apoptótica da cisplatina avaliaram a oxidação das proteínas sulfidrílicas por técnicas de imunoensaio (*Western blot*) e evidenciaram a ocorrência de depleção 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.

A cisplatina causou a depleção de componentes chaves do sistema de defesa antioxidante mitocondrial (GSH e NADPH) com morte celular hepática por apoptose, como evidenciado pelo aumento da atividade da caspase-3. GSH e NADPH são conhecidos por proteger as mitocôndrias contra estresse oxidativo, inibindo lesão mediada por radical livre pela eliminação de peróxidos de hidrogênio e mantendo um reduzido ambiente celular sob condições fisiológicas (SOMANI et al., 2000; TURRENS et al. 2003).

A resposta ao estresse oxidativo pode ser descrita como o fenômeno pelo qual a célula responde a alterações no seu estado redox. Como consequência do desenvolvimento aeróbico, as células são continuamente expostas a espécies reativas de oxigênio (EROs), potentes oxidantes capazes de lesar extensivamente a

célula através de danos oxidativos a macromoléculas (DNA, conteúdo lipídico e protéico da membrana). Como resultado, organismos diversos, desde bactérias a humanos têm desenvolvido mecanismos de manutenção da homeostase redox celular (RODRIGUES-POUSADA, et al., 2005).

Em condições fisiológicas normais, o mecanismo antioxidante mitocondrial seqüestra as espécies reativas de oxigênio, protegendo a célula dos efeitos lesivos do estresse oxidativo. No entanto, quando há produção excessiva destas espécies, como, por exemplo, com a administração de certos fármacos como a cisplatina, este mecanismo antioxidante torna-se incapaz de prevenir os danos oxidativos celulares (CONKLIN, 2004). O conjunto de defesas mitocondriais contra o estresse oxidativo inclui moléculas antioxidantes de baixo peso molecular e enzimas como: GSH, NADPH, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRd), além das vitaminas C e E (LIU; KEHRER, 1996).

Normalmente, 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 glutathione peroxidase, consumindo glutathione reduzida (GSH), a qual é mantida neste estado pela glutathione reductase, que utiliza NADPH (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000 ;SHAN; AW; JONES, 1990).

A glutathione é um tripeptídeo que contém um grupamento sulfidrílico capaz de ligar-se a compostos eletrofílicos diretamente ou através de reações catalisadas pela glutathione transferase produzindo conjugados com o ácido mercaptúrico. A glutathione também pode servir de substrato na eliminação de peróxidos resultantes da dismutação do radical superóxido, reação catalisada pelas diferentes formas da glutathione peroxidase (GOLDSTEIN; SCHELLMANN, 1994).

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 cisteínicos, especialmente na presença de metais de transição (JENNER, 1994). 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 de GSSG. A NADPH é considerada uma fonte primária de equivalentes redutores para o sistema glutathione. Em muitos tecidos animais, a NADPH necessária para que ocorra a redução da GSSG é fornecida pela via das pentoses-fosfato, pela oxidação do malato em piruvato, por atividade da enzima extramitocondrial malato desidrogenase, ou pela conversão do isocitrato em α -cetoglutarato, através da ação da isocitrato desidrogenase citoplasmática (SCHAFFER; BUETTNER, 2001).

Visto que, a NADPH é um constituinte fundamental do sistema de defesa antioxidante mitocondrial, o estresse oxidativo prolongado pode levar à produção e ao consumo permanente de NADPH, resultando em conseqüências incompatíveis com a sobrevivência da célula (MOTA et al, 2004).

De acordo com o pressuposto, GSH está também envolvida na eliminação da cisplatina (LI et al., 1997). A depleção de GSH citosólica não é suficiente para determinar a lesão letal das células hepáticas, a qual apenas ocorre se os níveis de GSH das mitocôndrias hepáticas estiverem envolvidos. Portanto, embora os níveis de GSH mitocondrial compreendam apenas 15% da quantidade de GSH total, a homeostase da glutathione mitocondrial tem um papel fundamental na citoproteção contra lesão celular induzida por xenobiótico (GRATTAGLIANO et al., 2002; SHAN et al., 1993). Portanto, a oxidação de GSH e NADPH pela cisplatina altera o estado redox mitocondrial, contribuindo para o estabelecimento de um estado redox pró-

oxidativo, o qual favorece a produção de radical hidroxil e conseqüentemente lesão oxidativa de macromoléculas como lipídios e proteínas mitocondriais. A depleção de GSH parece também ser o fator mais importante associado com a peroxidação lipídica (YOUNES; SIEGERS, 1981).

No presente estudo avaliou-se a morte celular por apoptose através da 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).

Outro fator importante a se considerar é que os hepatócitos são, geralmente, resistentes à ativação dos receptores de morte TNFR1 pelo ligante α -TNF. No entanto, um aumento na sensibilidade da célula para lesão induzida por α -TNF é necessário para ativar o mecanismo de receptor de morte, o qual requer depleção de GSH mitocondrial (GRATTAGLIANO et al., 2002). Baseado nisto, poderia ser proposto que a apoptose hepatocelular induzida pela cisplatina deve ser dependente, direta e/ou indiretamente da lesão mitocondrial.

Nós investigamos os efeitos tóxicos da cisplatina em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos para caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na hepatotoxicidade, focando o papel da mitocôndria, um possível alvo precoce neste processo. Similarmente, em um prévio estudo, nós demonstramos o papel central da

lesão mitocondrial renal na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina e sugerimos que isto ocorra provavelmente devido o aumento da formação de EROs, com conseqüente redução do potencial da membrana mitocondrial, quebra da homeostase de cálcio, redução da síntese de ATP, lesão das proteínas e membranas lipídicas, depleção do sistema de defesa antioxidante mitocondrial e morte celular por apoptose (SANTOS et al., 2007).

Uozomi et al. (1993) determinaram concentrações do agente platina no fígado e no rim em 12 casos de autópsia e relataram níveis mais elevados de agente platina no fígado em comparação ao rim. Demonstraram ainda uma correlação da concentração do agente platina no fígado com a dose total de cisplatina. Adicionalmente, em um estudo também realizado com tecidos humanos obtidos de uma autópsia, Stuart et al. (1985) sugeriram que a cisplatina deveria ser lidada, diferentemente, a nível molecular hepático e renal, uma vez que, a concentração de agente platina hepático era correspondente a dose de cisplatina, enquanto a nível renal esta concentração se diferenciava.

Maniccia- Bozzo (1990) demonstrou que a cisplatina causou efeitos diferentes em DNA mitocondrial hepático e renal. Contrariamente, nossos resultados sugerem uma semelhança entre os mecanismos de toxicidade molecular induzidos pela cisplatina em mitocôndrias de rins (SANTOS et al., 2007) e de fígado.

2. Efeito da dimetiltiouréia na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina: estresse oxidativo e estado redox mitocondrial

Atualmente, uma nova estratégia terapêutica, envolvendo a proteção da mitocôndria, tem emergido, levando a uma pesquisa contínua por melhores e mais efetivos antioxidantes (SHEU et al., 2006). No caso específico dos quimioterápicos,

a baixa seletividade da ação citotóxica é bastante conhecida e é fundamental que haja efetiva citoproteção dos tecidos saudáveis (KLEIN; MUGGLIA, 1999).

A atividade antioxidante de alguns compostos como erdosteína (KOC et al., 2005), ácido fenetil éster caféico (IRAZ et al., 2006), simvastatina (ISERI et al., 2006) e silimarina (MANSOUR et al., 2006) foi sugerida como protetora contra lesão hepática induzida pela cisplatina, mas o mecanismo molecular preciso e, particularmente, o envolvimento da mitocôndria neste processo não tem sido bem caracterizado.

O presente estudo verificou o papel da mitocôndria no mecanismo protetor contra a lesão hepática induzida pela cisplatina, utilizando como modelo de agente citoprotetor, a conhecida seqüestradora de radical hidroxila DMTU.

Em nossos ensaios a DMTU foi capaz de prevenir a lesão hepática induzida pela cisplatina, como demonstrado pelos reduzidos níveis de AST e ALT no grupo DMTU + cisplatina quando comparado ao grupo cisplatina. Estes dados indicam o envolvimento dos radicais hidroxilas no mecanismo de hepatotoxicidade induzida pela cisplatina, uma vez que estas são as principais espécies reativas seqüestradas pela DMTU.

Nossos resultados estão em convergência com os dados obtidos por BRUCK et al. (1999), em experimento *in vivo* no qual demonstram que seqüestradores de radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$) como dimetiltiouréia (DMTU) e dimetilsulfóxido (DMSO) previnem a elevação dos níveis séricos das transaminases hepáticas, protegendo contra a falência hepática fulminante induzida por tioacetamida em ratos.

O tratamento com DMTU também preveniu o grupo com a combinação DMTU + cisplatina da disfunção mitocondrial hepática, como evidenciado pelos maiores níveis de ATP, e em relação à estrutura da membrana mitocondrial, pela prevenção

da rigidez da membrana em comparação ao grupo cisplatina. Tanto a disfunção quanto a lesão da estrutura mitocondrial são eventos iniciais que ocorrem na lesão induzida pela cisplatina, portanto eventos prévios no processo apoptótico, ocorrendo antes das estruturas da cromatina e nuclear serem afetadas (IGUCHI et al., 2004; KHARBANGAR et al., 2000).

Por conseguinte, a DMTU protegeu o fígado da apoptose, como foi evidenciado pela menor atividade do efector caspase-3 no grupo DMTU + cisplatina em comparação ao grupo cisplatina. Os maiores níveis de cardiolipina no grupo em combinação servem de suporte para este achado, visto que a oxidação da cardiolipina está envolvida na apoptose mediada pela mitocôndria.

A proteção da cardiolipina do ataque oxidativo de radicais hidroxilas é possivelmente um dos mecanismos que colabora para o discreto aumento dos níveis de ATP encontrados no fígado do grupo de animais que receberam DMTU + cisplatina. A preservação da fluidez da membrana mitocondrial no grupo DMTU + cisplatina pode também ser parcialmente explicada pela citoproteção do fosfolípido mitocondrial cardiolipina contra o ataque oxidativo por radicais hidroxilas, desde que os lipídios da membrana são alguns dos alvos primários do estresse oxidativo.

Além de prevenir a oxidação da cardiolipina, a DMTU também se mostrou eficiente na proteção contra a lipoperoxidação das mitocôndrias hepáticas induzida pela cisplatina em ratos, indicado pelos reduzidos níveis de MDA e 4-HNE no grupo DMTU + cisplatina quando comparado com o grupo cisplatina. Similarmente, MATSUSHIMA et al. (1998) demonstraram que a DMTU preveniu o acúmulo de malondialdeído e a lesão renal aguda induzida pela cisplatina. A peroxidação lipídica é uma reação autocatalítica que ocorre em cadeia, e é estimulada pelos radicais hidroxilas ($\text{OH}^\bullet$), espécies altamente reativas (GUTTERIDGE, 1986).

A DMTU foi ainda capaz de prevenir a oxidação da NADPH e GSH pela cisplatina, impedindo a depleção do sistema de defesa antioxidante mitocondrial, mantendo o ambiente celular reduzido, protegendo desta forma, a célula do estresse oxidativo.

MILNER et al. (1993) relataram as propriedades citoprotetoras da DMTU em um estudo com tecido hepático e renal. Neste estudo eles demonstraram que a DMTU estimulou o metabolismo de GSH hepático e renal, e atribuíram este efeito ao doador sulfidrílico, característico da DMTU, que possivelmente contribuiu para o aumento intracelular de cisteína, um importante aminoácido precursor de GSH.

Vimos anteriormente que a depleção de GSH mitocondrial contribui para a peroxidação lipídica (YOUNES; SIEGERS, 1981) e para a oxidação das proteínas sulfidrílicas (GRATTAGLIANO et al., 2002). E estes três eventos foram prevenidos pelo DMTU no presente estudo.

A ação benéfica da DMTU com relação à citotoxicidade tem sido descrita em outros tecidos. Roychoudhury et al. (1996) relataram que o pré-tratamento com DMTU em mitocôndrias de músculo liso da artéria pulmonar de bovinos preveniu a produção de radicais hidroxilas 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 da DMTU com relação às complicações neurovasculares associadas ao *diabetes mellitus*.

Baliga et al. (1998) demonstraram em estudos *in vitro* e *in vivo* que a cisplatina induz um aumento da formação de radicais hidroxilas e que a DMTU fornece significativa proteção contra falência renal aguda induzida por este quimioterápico, sem investigar, entretanto, os mecanismos envolvidos. Segundo esses autores, o ferro desempenha um papel importante no dano tecidual renal

induzido pela cisplatina, sendo que esse efeito é mediado pela formação de radicais hidroxilas.

Baek et al. (2003) salientaram que a 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 hidroxilas. Um outro estudo (TSURUYA et al., 2003) destaca o efeito da 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 (HANIGA; DEVARAJAN, 2003), que as duas vias (mitocondrial e não mitocondrial) estão envolvidas na morte celular por apoptose resultante da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina.

“Há pessoas que choram por saber que as rosas
têm espinhos; há outras que gargalham de
alegria por saber que os espinhos têm rosas”.

Confúcio

VI. Conclusões

Nossos resultados mostram que as mitocôndrias são importantes alvos na hepatotoxicidade induzida pela cisplatina, visto que a cisplatina causou lesão hepática promovida pela alteração na função e estrutura mitocondrial, depleção do sistema de defesa antioxidante com conseqüente alteração do estado redox, oxidação das proteínas e lipídios mitocondriais, incluindo a cardiolipina, e induziu morte celular por apoptose.

Foi observado ainda em nossos estudos que a DMTU é um composto eficaz na prevenção do efeito hepatotóxico da cisplatina. A DMTU foi capaz de reduzir o estresse oxidativo, a alteração do estado redox mitocondrial e o subsequente estabelecimento de um estado pró-oxidativo, os danos oxidativos a macromoléculas celulares e conseqüentemente a morte dos hepatócitos por apoptose. Nossos achados sugerem que a mitocôndria e os radicais hidroxilas desempenham um papel chave na etiologia da hepatotoxicidade induzida pela cisplatina.

Em suma, estes achados confirmam a importância da proteção das mitocôndrias das células hepáticas saudáveis contra a lesão induzida pela cisplatina e sugerem várias etapas que podem ser alvos nas futuras estratégias citoprotetoras.

A utilização de agentes citoprotetores poderá minimizar a hepatotoxicidade induzida pela cisplatina em pacientes submetidos a elevadas doses deste fármaco ou que tenham a hepatotoxicidade potencializada pelo uso de outros fármacos ou por condições fisiopatológicas. Este trabalho pode ainda servir de subsídio para a pesquisa de novos quimioterápicos baseados em compostos platínicos.

Referências

AJITH, T. A; NIVITHA, V.; USHA, S. Zingiber officinale Roscoe alone and in combination with alpha-tocopherol protect the kidney against cisplatin-induced acute renal failure. **Food Chem Toxicol.** Exeter ,2006 [Epub ahead of print]

ALDERDEN, HAL; ALDERDEN, HAMBLEY. The Discovery and Development of Cisplatin , **J Chem Educ.**, Tucson, v. 83, p. 728-724, 2006

ANTUNES, N.; MARTINUSO, C. A.; TAKIYA, C. M.; SILVA, A. J. R.; ORNELLAS, J. F. R.; ELIAS, P. R.; LEITE, J. R. M.; CARDOSO, L. R. Fructose-1,6 diphosphate as a protective agent for experimental ischemic acute renal failure. **Kidney International**, New York ,v. 69, p.68–72, 2006.

ARMSTRONG, J. S. Mitochondria: a target for cancer therapy. **Br J Pharmacol.**, London, v.147, p.239–248, 2006.

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.

BELLOMO, G.; JEWELL, S. A.; THOR, H.; ORRENIUS, S. Regulation of intracellular calcium compartmentation: Studies with isolated hepatocytes and t-butyl hidroperoxide. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 79, p. 6842-6846, 1982.

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

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.

BLOCK, K. I. Antioxidants and Cancer Therapy: Furthering the Debate. **Integrative Cancer Therapies**, Thousand Oaks, v.3, n.4, p. 342-348, 2004.

BOULIKAS, T.; VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). **Oncol Rep.**, Athens, v.;10, n.6, p.:1663-1682, 2003.

BROWN, N. S.; BICKNELL, R. Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Oxidative stress: its effects on the growth, metastatic potential and response to therapy of breast cancer. **Breast Cancer Research**, London, v. 3, n. 5, p.323-327, 2001.

BRUCK R.; AEED, H.; SHIRIN, H.; MATAS, Z.; ZAIDEL, L.; AVNI, Y.; HALPERN, Z. The hydroxyl radical scavengers dimethylsulfoxide and dimethylthiourea protect rats against thioacetamide-induced fulminant hepatic failure. **J Hepatol.**, Oxford, v.31, n.1, p.27-38, 1999.

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.

CARO, A. A.; CEDERBAUM, A. I. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v.44, p. 27–42, 2003.

CAVALLI, F.; TSCHOPP, L.; SONNTAG, R. W; ZIMMERMANN, A. A case of liver toxicity following cis-dichlorodiammineplatinum(II) treatment **Cancer Treat Rep.**, Bethesda, v. 12,p.2125-2126, 1978.

CEJAS, P.; CASADO, E.; BELDA-INIESTA, C.; DE CASTRO, J.; ESPINOSA, E.; REDONDO, A.; SERENO, M.; GARCIA-CABEZAS, M.A.; VARA, J. A.; DOMINGUEZ-CACERES, A.; PERONA, R.; GONZALEZ-BARON, M. Implications of oxidative stress and cell membrane lipid peroxidation in human cancer. Review **Cancer Causes Control.**, Dordrecht, v. 15, n. 7, p.707-719, 2004.

CERSOSIMO, R. J. Hepatotoxicity associated with cisplatin chemotherapy.**Ann. Pharmacother.** , Cincinnati,v. 27, p.438–441, 1993.

CHARLES, L.; DURSUN, E.B.; ZHIBIN, H.E.; SOMERSET, H.; OH, D.; FAUBEL, S.; EDELSTEIN, C.L Caspases and calpain are independent mediators of cisplatin-induced endothelial cell necrosis. **Am J Physiol Renal Physiol.**, Bethesda, v.291, p.578-587, 2006.

CHO, H. J.; KIM, J. K.; KIM, K. D.; YOON, H. K.; CHO, M. Y.; PARK, Y. P.; JEON, J. H.; LEE, E. S.; BYUN, S. S, LIM, H. M.; SONG, E. Y.; LIM, J. S.; YOON, D. Y.; LEE, H. G.; CHOE, Y. K. Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. **Cancer Lett.**, Limerick, v. 237, p. 56–66, 2006.

CLEMENS, M.R.; LADNER, C.; EHNINGER, G.; EINSELE, H.; RENN, W.; BUHLER, E.; WALLER, H.D.; GEY, K.F. Plasma vitamin E and β - carotene concentrations during radiochemotherapy preceding bone marrow transplantation. **Am J Clin Nutr.**, Bethesda,v.51:216-219, 1990.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. **Integrative cancer therapies**, Thousand Oaks., v.3, n.4, p. 294-300,2004.

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

DAI, J.; WEINBERG, R. S.; WAXMAN, S.; JING, Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. **Blood**, Washington,v. 93, p.268–277;1999.

DE DUVE, C. H. The peroxysome: a new cytoplasmic organelle. **Proc. R. Soc. London. Ser. B**, London,v.173, p. 710–723, 1969.

DE DUVE, C. H.; WATTIAUX, R. Functions of lysosomes.**Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v.28, p.435–452, 1966.

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.

DENECKER, G.; VERCAMMEN D.; DECLERCQ W.;VANDENABEELE, P. Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. **Cell Mol Life Sci**, Birkhauser, v.58,p. 356–370, 2001.

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

FABER, M.; COUDRAY, C.; HIDA, H.; MOUSSEAU, M.; FAVIER A. Lipid peroxidation products, and vitamin and trace element status in patients with cancer

before and after chemotherapy including adriamycin: a preliminary study. **Biol Trace Elem Res.**, London,v.47, p.117-123, 1995.

FADILLIOGLU, E.; ERDOGAN, H.; SOGUT, S.; KUKU, I. Protective effects of erdosteine against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **J Appl Toxicol.**, Chichester, v.23: p. 71–74, 2003.

FADILLIOGLU, E.; ERDOGAN H. Effects of erdosteine treatment against doxorubicin-induced toxicity through erythrocyte and plasma oxidant/antioxidant status in rats. **Pharmacol Res.**,New York, v.47, p. 317–322, 2003.

FADILLIOGLU, E.; OZTAS, E.; ERDOGAN, H.;YAGMURCA, M.;SOGUT, S.; UCAR, M.;IRMAK, M.K: Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicininduced cardiotoxicity in rats. **J App. Toxicol**, Chichester, v. 24, p. 47–52, 2004.

FARRELL, G. C. **Drug-induced liver disease**. Edinburgh, Scotland: Churchill Livingstone, 1994.

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

FENOGLIO, C.; BONCOMPAGNI, E.; CHIAVARINA, B.; CAFAGGI, S.; CILLI, M.; VIALE, M. Morphological and histochemical evidence of the protective effect of procainamide hydrochloride on tissue damage induced by repeated administration of low doses of cisplatin. **Anticancer Res.**, Athens v. 25, n.6B, p.4123-4128, 2005.

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.

FRIESEN, C.; KIESS, Y.; DEBATIN, K. M. A critical role of glutathione in determining apoptosis sensitivity and resistance in leukemia cells. **Cell Death Differ.** , London, v.11, n. 1,p.73–85; 2004.

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.

GEMBA, M.; FUKUIISHI, N. Amelioration by ascorbic acid of cisplatin-induced injury in cultured renal epithelial cells. **Contrib. Nephrol.**, Karger, v. 95, p. 138–142, 1991.

GERLACH, J. C.; SCHNOY, N.; ENCKE, J.; SMITH, M. D.; MULLER, C.; NEUHAUS, P. Improved hepatocyte in vitro maintenance in a culture model with woven multicompartiment capillary systems: electron microscopy studies. **Hepatology.**, Baltimore, v. 22, n. 2, p. 546-552, 1995.

GOBE, G. C; ENDRE, Z.H. Cell death in toxic nephropathies. **Semin Nephrol.**, Philadelphia, v.23, p. 416–424, 2003.

GOLDSTEIN, R. S.; SCHELLMANN, B. Toxic Response of the Kidney; In: KLAASSEN, C.D. CASARETT and DOULL'S. Toxicology. **The Basis of Poisons**. 5a ed., New York: Mc Graw-Hill, Inc., 1994, p. 417-443.

GONZÁLEZ, D.; SAEZ, R. S.; RODILLA, E. M.; YGES, E. L.; TOLEDANO, F. L. Hypersensitivity reactions to chemotherapy drugs. **Alergol Imunol Clin.**, v.15, p.161-181, 2000.

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.

GRATTAGLIANO, I.; PORTINCASA, P.; PALMIERI, V. O.; PALASCIANO, G. Overview on the mechanisms of drug-induced liver cell death. **Ann. Hepatol.**, México, v. 1, 162-168, 2002.

GUNTER, T. E.; GUNTER, K. K.; SHEU, S-S.; GAVIN, C. E. Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. **Am. J. Physiol.**, v.267, p. C313-C339, 1994.

GUTTERIDGE, J. M. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.201, p.291, 1986.

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.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **Clarendon Press**, Cambridge, U.K , 1985.

HALLIWELL, B.; J. M. GUTTERIDGE. Role of iron in oxygen radical reactions. **Methods Enzymol.**, New York, v. 105, p.47, 1984.

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

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. **Annu Rev Biochem.** , Palo Alto,v.54, p.1015- 1069, 1985.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, London, v. 407, p.770-776,2000.

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

HOCH, F. L. Cardiolipins and biomembranes fuction. **Bichim Biophys. Acta**, Amsterdam,v.113, p.71-133, 1992.

IMBERTI, R.; NIEMINEN, A. L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. **Mol Interv.**, Bethesda v. 265, p. 392-400, 1993.

IRAZ, M.; OZEROL, E.; GULEC, M.; TASDEMIR, S.; IDIZ, N.; FADILLIOGLU, E.; NAZIROGLU, M.; AKYOL, O. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) administration on cisplatin-induced oxidative damage to liver in rat. **Cell Biochem Funct.** , Chinchester, v. 24, n. 4, p. 357-361, 2006.

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 USA**, Washington, v. 99, n.22, p.14298-14302, 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.1853-1856, 1996.

JACOBSON, M. D.; RAFF, M. C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. **Nature**, London, v. 374, p. 814-816, 1995.

JAESCHKE, H.; GORES, G.J.; CEDERBAUM, A.I.; HINSON, J. A.; PESSAYRE, D.; LEMASTERS, J. J. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicol. Sci.**, Cary, v.65,p.166-176, 2002.

JARNAGIN, W. R.; RUO, L.; LITTLE, S. A.; KLIMSTRA, D.; D'ANGELICA, M.; DEMATTEO, R. P.; WAGMAN, R.; BLUMGART, L. H.; FONG, Y. Patterns of initial disease recurrence after resection of gallbladder carcinoma and hilar cholangiocarcinoma: implications for adjuvant therapeutic strategies. **Cancer**, New York, v.98, p.1689–1700, 2003.

JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet**, London, v. 344, p. 769-778, 1994.

JIE, L.; LIU, Y.; HABEEBU, S. S. M.; KALSSSEN, C. D. Metallothionein (MT)-null mice are sensitive to cisplatin-induced hepatotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol.**, New York, v. 149, p. 24–31, 1998.

JING, Y.; YANG, J.; WANG, Y.; LI, H.; CHEN, Y.; HU, Q.; SHI, G.; TANG, X.; YI, J. Alteration of subcellular redox equilibrium and the consequent oxidative modification of nuclear factor κ B are critical for anticancer cytotoxicity by emodin, a reactive oxygen species-producing agent. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 40, p. 2183–2197, 2006.

JOHNSON, S.W.; SHEN, D.; PASTAN, I.; GOTTESMAN, M. M.; HAMILTON, T. C. Cross-resistance, cisplatin accumulation, and platinum-DNA adduct formation and removal in cisplatin-sensitive and -resistant human hepatoma cell lines. **Exp Cell Res.**, Orlando, v.226, n.1, p.133-139, 1996.

KAHL, R. Protective and adverse biological action of phenolic antioxidants. In: SIES, H. **Oxidative stress. Oxidants and antioxidants**. New York:: Academic Press, 1991, p. 245–262.

KAMATA, H.; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signaling. **Cell Signal**, Oxford, v.11, n.1, p. 1-14, 1999.

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.

KELLY, S. A.; HAVRILLA, C. M.; BRADY, T. C.; ABRAMO, K. H.; LEVIN, E. D. Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. **Environ. Health Perspect.**, v. 106, n. 7, 1998.

KHARBANGAR, A.; KHYNRIAM, D.; PRASAD, S. B. Effect of cisplatin on mitochondrial protein, glutathione, and succinate dehydrogenase in Dalton lymphoma-bearing mice. **Cell Biology and Toxicology**, Dordrecht Kluwer, v. 16, p. 363-373, 2000.

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

KLEIN, P.; MUGGIA, F. M. Cytoprotection: shelter from the storm **Oncologist.**, Dayton v. 4, n. 2, p. 112-121, 1999.

KOC, A.; DURU, M.; CIRALIK, H.; AKCAN, R.; SOGUT, S. Protective agent, erdosteine, against cisplatin-induced hepatic oxidant injury in rats. **Mol Cell Biochem.**, The Hague, v. 278, n. 1-2, p. 79-84, 2005.

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.

KOC, A.; DURU, M.; CIRALIK, H.; AKCAN, R.; SOGUT, S. Protective agent, erdosteine, against cisplatin-induced hepatic oxidant injury in rats. **Mol. Cell. Biochem.**, Kluwer, v. 278, p. 79-84, 2005.

KOTAMRAJU, S.; KALIVENDI, S. V.; KONOREV, E.; CHITAMBAR, C. R.; JOSEPH, J.; KALYANARAMAN, B. Oxidant-induced iron signaling in doxorubicin-mediated apoptosis. **Methods Enzymol.**, New York, v.378, p.362–382; 2004.

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.

KOUKOURAKIS, M. I. Amifostine in clinical oncology: current use and future applications. **Anticancer Drugs**.v.13, 3, p.181-209, 2002.

KRUIDERING, M.; VAN DE WATER, B.; 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 Chain1 Division of Toxicology, **J Pharmacol Exp Ther**, Bethesda, v. 280, n. 2, p. 638–649, 1997.

KULKARNI, A.P.; BYCZKOWSKI. Hepatotoxicology. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. **Introduction to Biochemical Toxicology**, 1994, p.459-489.

LADNER, C.; EHNINGER, G.; GEY, K. F.; CLEMENS, M. R. Effect of etoposide (VP16-213) on lipid peroxidation and antioxidant status in a high-dose radiochemotherapy regimen. **Cancer Chemother Pharmacol.**, Germany, v.25, p. 210-212, 1989.

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.

LAZO, J. S; KUO, S. M.; WOO, E. S.; PITT, B. R. The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. **Chem Biol Interact**, Amsterdam,v.111-112, p.255-262, 1998.

LEE, W.M. Drug-induced hepatotoxicity. **N Engl J Med.**, Massachusetts, v. 333, n. 17, p.1118-1126, 1995.

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.

LI, X., METZGER, G., FILIPSKI, E. Pharmacologic modulation of reduced glutathione circadian rhythms with buthionine sulfoximine: relationship with cisplatin toxicity in mice. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 143, p.281-290, 1997.

LI, P., NIJHAWAN, D., BUDIHARDJO, I., SRINIVASULA, S. M., AHMAD, M., ALNEMRI, E. S., AND WANG, X. Cytochrome *c* and dATPdependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, Cambridge, v. 91, 479-489,1997.

LI, W.; LAM, M.; CHOY, D.; BIRKELAND, A.; SULLIVAN, M. E; POST, J. M. Human primary renal cells as a model for toxicity assessment of chemotherapeutic drugs. **Toxicol In Vitro**, Oxford, v. 20, n.5, p. 669-676, 2006.

LIEBERTHAL, W.; MENZA, S.A.; LEVINE, J.S.; Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. **Am JPhysiol Renal Physiol.**, Bethesda, v.274, p.315–327, 1998.

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

LIU, H.; KEHRER, J. P. The reduction of glutathione disulfide produced by t-butyl hydroperoxide in respiring mitochondria. **Free Radic Biol Med.**, Tarrytown,v. 20, n. 3, p. 433-442, 1996.

LIU, J.; LIU, Y.; HABEEBU, S. S.; KLAASSEN, C. D. Metallothionein (MT)-null mice are sensitive to cisplatin-induced hepatotoxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.149, 24-31, 1998.

LU, Y.; CEDERBAUM, A. I. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. **Toxicol Sci.**, Cary, v. 89, n.2, p. 515-523, 2005.

LUDWIG, T.; OBERLEITHNER, H; Platinum Complex Toxicity in Cultured Renal Epithelia. **Cell Physiol Biochem.**, S. Karger, v.14, p.431-440, 2004.

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.

MANSOUR, H. H.; HAFEZ, H. F.; FAHMY, N. M. Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. **J Biochem Mol Biol.**, Seoul Korean, v. 39, n. 6, p.656-61, 2006.

MASSOTI, L.; LENAIZ, G.; SPISNI, A.; URRY, D. W. Effect of phospholipids on the protein conformation in the inner mitochondrial membranes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.56, p.892-897, 1974.

MATSUSHIMA, H.; YONEMURA, K.; OHISHI, K.; HISHIDA, A. The role of oxygen free radicals in cisplatin-induced acute renal failure in rats. **J Lab Clin Med.**, New York, v. 131, n. 6, p. 518-526, 1998.

MIQUEL, J. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. In: MIQUEL, J. **Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine**, Boca Raton: CRC Press. , v. 1, p. 3–13, 1989.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**, London, v.191,p. 144-148, 1961.

MOTA, M. P.; FIGUEIREDO, P. A.; DUARTE, J. A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, Lisboa, v. 4, n. 1, p.81–110, 2004.

NAGATA, S. Apoptotic DNA fragmentation. **Exp. Cell. Res.**, Orlando, v. 256, n. 1, p. 12-18, 2000.

NAZIROGLU, M.; KARAOGLU, A.; AKSOY, A. O. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats. **Toxicology**, Limerick, v.195, p. 221–230,2004.

NIEMINEM, A-L.; DAWASON, T.L.; GORES, G.J.; KAWNISCH, T.; HERMAN , B.; LEMASTERS, JJ. Protection by acidic pH and fructose against lethal injury to rat hepatocytes from mitochondrial inhibition, ionophores and oxidant chemicals. **Biochem Biophys Res Commun.**, San Diego, v.167, p.600-606, 1990.

NIEMEYER, C. M.; SANO, T.; SMITH, C. L.; CANTOR, C. R. Oligonucleotide-directed self-assembly of proteins: semisynthetic DNA--streptavidin hybrid molecules as connectors for the generation of macroscopic arrays and the construction of supramolecular bioconjugates. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 22, n. 25, p. 5530-5539,1994.

NISHIKAWA, M.; NAGATOMI, H.; NISHIJIMA, M.; OHIRA, G.; CHANG, B. J.; SATO, E.; INOUE, M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits nephrotoxicity of cisplatin and increases the survival of cancer-bearing mice. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v. 171, p.133-8, 2001.

NOHL, H.; HEGNER, D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? **Eur. J. Biochem.**, Oxford,v.82, p. 863–868, 1978.

O'CONNELL, J.B; MAGGARD, M. A; LIU, J. H; ETZIONI, D. A; LIVINGSTON, E. H; KO, C. Y. Rates of colon and rectal cancers are increasing in young adults. **Am Surg.**, Atlanta, v. 69, p. 866–872, 2003.

OHMACHI, M.; HAYAKAWA, J.; TASAKA, K.; KURACHI, H.; MURATA, Y. Mechanisms of platinum drug resistance. **Trends in Pharmacol Sci.**, Barking, v.26, n.3, p. 113-116 2005.

OLIVER, C.N.; STARKE-REED, B.; STADMAN, E.R.; LIU, G.J.; CARNEY, J.M.; FLOYD, R.A. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia reperfusion-induced injuries to gerbil brain. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 87, p. 5144-5147, 1990.

ORRENIUS, S.; McCONKEY, D.J.; BELLOMO, G.; NICOTERA, P. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. **TIPS**, Cambridge, v.10, p.281-285, 1989.

ORRENIUS, S.; NICOTERA, P. The calcium ion and cell death. **J Neural Transm Suppl.**, Wien, v. 43, p. 1-11, 1994.

OZYURT, H.; YILDIRIM, Z.; KOTUK, M.; YILMAZ, H. R.; YAGMURCA, M.; IRAZ, M.; SÖĞÜT, S.; GERGERLIOĞLU, S. Cisplatin-induced acute renal failure is ameliorated by erdosteine in a dose-dependent manner. **J Appl Toxicol.** Chichester, 24: 269–275, 2004.

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, n.15, p. 2202-2208, 2003.

PIÑEIRO- CARRERO, V. M; PIÑEIRO, E.O. Liver. **Pediatrics.**, Elke Grove, v. 113, n.4, p.1097-1106, 2004.

POLI, G.; ALBANO, E.; DIANZANI, M. U. The role of lipid peroxidation in liver damage. **Chem Phys Lipids**, Limerick, v. 45, p. 117-142, 1987.

POLLERA, C. F.; MEGLIO, F.; NARDI, M.; VITELLI, G.; MAROLLA, P. Cisplatin-induced hepatic toxicity. **J. Clin. Oncol.**, Alexandria, v.5, 318–319,1987.

PRAET, M.; LAGHMICHE, M.; POLLAKIS, G.; GOORMAGHTIGH, E.; RUYSSCHAERT, J. M. In vivo and in vitro modifications of the mitochondrial membrane induced by 4' Epi-adriamycin. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 35, p.2923-2928, 1986.

PRATIBHA, R.; SAMEER, R.; RATABOLI, P. V.; BHIWGADE, D. A.; DHUME, C. Y. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats.**Eur J Pharmacol.**, Amsterdam,v.532, n.3, p.290-293, 2006.

PRATT, D. S.; KAPLAN, M. M. Avaliação da função hepática In: HARRISON **Medicina Interna**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, 2002, 15ª ed, v. II, cap. 293, p.1814-1815.

PROVAN, D.; KRENTZ, A. Gastroenterology. In: **Oxford Handbook of Clinical and Laboratory Investigation**. (PROVAN, D.; KRENTZ, A., Eds), 1st ed, Oxford University Press, New York, pp. 325-354, 2002.

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.

RKER, S. 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**, New York, v. 397, n. 2, p. 262–272, 2002.

RAHN, C.A.; BOMBICK, D.W.; DOOLITTLE, D.J. Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity. **Fundam. Appl. Toxicol.**, Akron, v. 16, p. 435-448, 1991.

RECKNAGEL, R.O.; GLENDE, E.A.; BRITTON, R.S. Free Radical Damage and Lipid Peroxidation; em: MEEKS, R. G.; HARRISON, S.D.; BULL, R.J. **Hepatotoxicology**, 1991: p.401-436.

REED, D.J. Mechanisms of chemically induced injury and cellular protection mechanisms. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. **Introduction to Biochemical Toxicology**, Appleton & Lange, Connecticut, 1994, p.265-294.

RODRIGUES-POUSADA, C.; NEVITT, T; MENEZES, R. REVIEW ARTICLE. The yeast stress response Role of the Yap family of b-ZIP transcription factors The PABMB Lecture delivered on 30 June 2004 at the 29th FEBS Congress in Warsaw **FEBS J**, Oxford, v. 272, p.2639–2647,2005.

ROSEN, M.; FIGLIOMENI, M.; SIMPKINS, H. The interaction of platinum antitumour drugs with mouse liver mitochondria. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v.73, p. 61–74,1992.

ROSSER, B. G.; GORES, G. J. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 108, p. 252-275, 1995.

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.

ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer**, New York, v. 55, n.10, p. 2303-2316, 1985.

ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents Mechanisms of Free-Radical Induced Toxicity and Glutathione-Dependent Protection. **Pharmac. Ther.**, Oxford, v. 37, p. 231 - 249, 1988.

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. 1220-1230, 1996.

RUSSO, A.; CARMICHAEL, J. The roles of intracellular glutathione in antineoplastic chemotherapy. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, Tarrytown, v.12, p.1347-1354, 1986.

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, N. A.; CATÃO, C. S.; MARTINS, N. M.; CURTI, C.; BIANCHI, M. L.; SANTOS, A. C. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Arch. Toxicol.**, Berlin, DOI 10.1007/s00204-006-0173-2, 2007.

SCAFFIDI, C.; FULDA, S.; SRINIVASAN, A.; RIESEN, C.; LI, F.; TOMASELLI, K. J.; DEBATIN, K. M.; KRAMMER, P. H.; PETER, M. E. Two CD95 (APO-1/fas) signaling pathways. **EMBO J.**, Oxford, v.17, p.1675- 1687, 1998.

SCHAFER, F. Q ; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Rad Biol Med.**, Tarrytown, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, 2001.

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

SHEU SS.; NAUDURI D; ANDERS MW. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. **Biochem. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1762, p. 256-265, 2006.

SCHLAME, M.; RUA, D.; GREENBERG, M.L. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. **Prog Lipid Res.**, Oxford, v.39, p. 257- 288, 2000.

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.

SCHULZE-OSTHOFF, K.; BEYAERT, R.; VANDEVOORDE, V.; HAEGEMAN, G.; FIERS, W. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. **EMBO J.**, Oxford, v.12, n.8, p.3095-3104, 1993.

SHACTER, E.; WILLIAMS, J. A.; HINSON, R. M.; RKER, S. S.; LEE, Y. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. **Blood.**, Washington, v.96, p.307-313, 2000.

SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther.**, Oxford, v. 47, n.1, p. 61-71, 1990.

SHAN, X., JONES, D. P., HASHMI, M., ANDERS, M. W. Selective depletion of mitochondrial glutathione concentrations by (R,S)-3-hydroxy-4-pentenoate potentiates oxidative cell death. **Chem. Res. Toxicol.**, Washington, v.6, 75-81, 1993.

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.**, New York, v.264, n.2, p. 343-347, 1999.

SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M.; AMES, B. N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 91, p. 10771-10778, 1994.

SI, M.S; AMERSI, F; GOLISH, S.R; ORTIZ, J.A; ZAKY, J; FINKLESTEIN, D; BUSUTTIL, R.W, AND IMAGAWA, D.K Prevalence of metastases in hepatocellular carcinoma: risk factors and impact on survival. **Am Surg.**, Atlanta, v. 69, p.879–885, 2003.

SILVA, V.S.; CORDEIRO, J. M.; MATOS, M. J.; OLIVEIRA, C. R.; GONÇALVES, P. P. Aluminum accumulation and membrane fluidity alteration in synaptosomes isolated from rat brain cortex following aluminum ingestion: effect of cholesterol. **Neurosci Res.**, Limerick, v. 44, p.181-193, 2002.

SLATTER, T.F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **J. Biochem.**, Tokyo, v. 222, p.: 1–15, 1984.

SOMANI, S. M.; HUSAIN, K.; WHITWORTH, C.; TRAMMELL, G. L.; MALAFA, M.; RYBAK, L. P. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. **Pharmacol. Toxicol.** Copenhagen, **v.86**, 234-241, 2000.

SOUID, 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.

STEWART, D. J.; BENJAMIN, R. S.; LUNA, M. Human tissue distribution of platinum after *cis*-diamminedichloroplatinum. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, Germany, v. 10, p.51–54, 1982.

STEWART, D. J.; MIKHAEL, N. Z.; NANJI, A. A.; NAIR, R. C.; KACEW, S.; HOWARD, K.; HIRTE, W.; MAROUN, J. A. Renal and hepatic concentrations of

platinum: relationship to cisplatin time, dose, and nephrotoxicity. **J Clin Oncol.**, Alexandria, v. 3, n.9, p.1251-1256, 1985.

SWARTZ, M. N. Mitochondrial toxicity--new adverse drug effects. **N Engl J Med.**, Boston, v. 333, n. 17, p.1146-1148, 1995.

SZEWCZYK, A.; WOJTCZAK, L. Mitochondria as a pharmacological target. **Pharmacol. Rev.**, Bethesda, v. 54, p.101-127, 2002.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, Bethesda, v. 279, p.1005–1028, 2000.

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

TRUMP, B.F.; BEREZESKY, I.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, F208-218, 2003.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J. Physiology.**, New York, v.552, p.335-344, 2003.

TYURINA, Y.; KINI, V.; TYURIN, V.; VLASOVA, I.; JIANG, J.; KAPRALOV, A.; BELIKOVA, N.; YALOWICH, J.; KURNIKOV, I.; KAGAN, V. Mechanisms of cardiolipin oxidation by cytochrome c: relevance to pro- and anti-apoptotic functions of etoposide **Mol Pharmacol.**, Bethesda, v.70, p. 706-717, 2006.

VERHAEGEN, S.; MCGOWAN, A.J.; BROPHY, A.R; FERNANDES, R.S.; COTTER TG. Inhibition of apoptosis by antioxidants in the human HL-60 leukemia cell line. **Biochem Pharmacol.** v.50, n.7, p.1021-1029, 1995.

VICHNEVETSKAIA, K.D; ROY, D.N. Oxidative stress and antioxidative defense with an emphasis on plants antioxidants. **Environ. Rev.**, Denver, v.7, p.31–51,1999.

VLADIMIROV, Y. A.; OLENOV, V. I.; SUSLOVA, T. B.; CHEREMISINA, Z. P. Lipid peroxidation in mitochondrial membranes. **Adv.Lipid. Res.**, New York, v.17, p. 73–78, 1981.

VOGELZANG, N. J; TORKELOSON, J. L; KENNEDY, B. J. Hypomagnesemia, renal dysfunction, and Raynaud's phenomenon in patients treated with cisplatin, vinblastine, and bleomycin. **Cancer.**, v.56, n.12, p. 2765-2770, 1985.

WALLACE, K. B.; EELLS, J. T.; MADEIRA, M. C.; CORTOPASSI, G.; JONES, D. P. Mitochondria-mediated cell injury. **Fund. Applied Toxicol.**, v. 38, p. 23-37, 1997.

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.

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,p.867–870, 1987.

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat Rev.**, London, v.23: 209–240, 1997.

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, p.1331-1337, 1998.

WILLS, E. D. Effects of lipid peroxidation on membrane bound enzymes of the endoplasmic reticulum. **J. Biochem.**, Tokyo, v.123, p.983-991, 1971.

WYLLIE, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature**, London, v. 284, p. 555-6, 1980.

UOZUMI, J.; UEDA, T.; YASUMASU, T.; KOIKAWA, Y.; NAITO, S.; UMAZAWA, J.; UEISHI, K. Platinum accumulation in the kidney and liver following chemotherapy with cisplatin in humans. **Int. Urol. Nephrol.**, Budapest v.25, 215-220, 1993.

YAGMURCA, M.; ERDOGAN, H.; IRAZ, M.; SONGUR, A.; UCAR, M.; FADILLIOGLU, E. Caffeic acid phenethyl ester as a protective agent against doxorubicin nephrotoxicity in rats. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v.348: p.27-34, 2004.

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 release of the apoptogenic factor cytochrome c. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 24, p. 624-31, 1997.

YOKOMIZO, A.; ONO, M.; NANRI, H.; MAKINO, Y.; OHGA, T.; WADA, M.; OKAMOTO, T.; YODOI, J.; KUWANO, M.; KOHNO, K. Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 55, p. 4293-4296, 1995.

YOUNES, M., SIEGERS, C.P. Mechanistic aspects of enhanced lipid peroxidation following glutathione depletion in vivo. **Chem. Biol. Interact.**, Limerick, v.34, 257-266, 1981.

ZETTL, U. K.; MIX, E.; ZIELASEK, J.; STANGEL, M.; HARTUNG, H. P.; GOLD, R. Apoptosis of myelin-reactive T cells induced by reactive oxygen and nitrogen intermediates *in vitro*. **Cell Immunol.**, Orlando, v. 178, p. 1-8, 1997.

ZHANG, K.; CHEW, M.; YANG, E.B.; WONG, K.P.; MACK, P. Modulation of cisplatin cytotoxicity and cisplatin-induced DNA cross-links in HepG2 cells by regulation of glutathione-related mechanisms. **Mol Pharmacol.**, Bethesda, v.59, 4, p. 837-843, 2001.

ZHANG, Y.; MARCILLAT, O.; GIULIVI, C.; ERNSTER, L.; DAVIES, K. J. A. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, p. 27-31, 1990.

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.:43553-43556, 2002.

ZICCA, A.; CAFAGGI, S.; MARIGGIO, M. A.; VANNOZZI, M. O.; OTTONE, M.; BOCCHINI, V.; CAVIGLIOLI, G.; VIALE, M. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 442, p. 265–272, 2002.

ZIMMERMAN, H.J.; MADDREY, W.C. Toxic and drug-induced hepatitis. In: SCHIFF, L; SCHIFF, E.R. **Diseases of the Liver.**, Philadelphia: JB Lippincott; 1993, p.707-83.

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.