

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito protetor do carvedilol na toxicidade mitocondrial
renal induzida pela cisplatina em ratos

Maria Augusta Carvalho Rodrigues

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação do efeito protetor do carvedilol na toxicidade mitocondrial
renal induzida pela cisplatina em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Toxicologia.

Área de concentração: Toxicologia.

Orientada: Maria Augusta Carvalho Rodrigues

Orientador: Antonio Cardozo dos Santos

Ribeirão Preto

2009

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

Carvalho Rodrigues, Maria Augusta

Avaliação do efeito protetor do carvedilol na toxicidade mitocondrial renal induzida pela cisplatina em ratos. Ribeirão Preto, 2009.

91 p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Santos, Antonio Cardozo dos

1. Mitocôndria.
2. Cisplatina.
3. Carvedilol.
4. Nefrotoxicidade.
5. ERO (Espécies Reativas de Oxigênio)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Augusta Carvalho Rodrigues

Avaliação do efeito protetor do carvedilol na toxicidade mitocondrial renal induzida pela cisplatina em ratos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Antonio Cardozo dos Santos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

- ❖ Dedico este trabalho aos meus pais, **Cícero e Leila**, que sempre me apoiaram e incentivaram incondicionalmente.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

- ❖ À **Deus**, porque eu sei que Tu estás sempre comigo;

“Santo Anjo do Senhor, meu zeloso guardador, se a ti me confiou a piedade divina, sempre me rege, guarda, governa e ilumina. Amém.”

- ❖ Ao meu orientador, Prof. Dr. **Antonio Cardozo dos Santos**, exemplo de pessoa e pesquisador. Obrigada pela oportunidade e por confiar no meu trabalho;

- ❖ À minha **grande família**: tios, tias, primos e primas; por serem meu refúgio e minha fonte de alegria. Em especial à Vó Ivone e à Tia Zélia, que agora são meus anjos da guarda;

- ❖ À minha irmã, **Bárbara**, pelo companheirismo Ribeirão Pretano;

- ❖ Ao **Gustavo**, por entrar em minha vida e me fazer ainda mais feliz, me ensinando a enxergar a beleza das coisas simples da vida.

AGRADECIMENTOS

- ❖ À Neife e à Nádia, por me receberem de braços abertos, e estarem sempre prontas a me ajudar, com competência e amizade;
- ❖ Ao Danilo e à Aninha, pela amizade e companheirismo no laboratório;
- ❖ Ao doutorando Cezar Pestana e ao Prof. Dr. Carlos Curti pela colaboração com o trabalho;
- ❖ Ao doutorando Jairo Lisboa e ao Prof. Dr. Fernando Barbosa, pela colaboração na dosagem da platina;
- ❖ Ao Prof. Dr. Carlos Curti e à Prof(a). Dr(a). Lusânia Maria Gregg Antunes pelas sugestões durante o exame de Qualificação;
- ❖ Aos docentes e técnicos dos laboratórios de Toxicologia e Bioquímica;
- ❖ À Cidinha e ao Reinaldo pela ajuda com os animais;
- ❖ Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto;
- ❖ À Prof(a). Dr(a). Isarita Martins, pela primeira oportunidade de estágio e por me apresentar encantadoramente à Toxicologia;
- ❖ À Fapesp pela bolsa de estudos e auxílio financeiro ao projeto;
- ❖ A todos os amigos e colegas (principalmente os que permitiram que fizéssemos de Ribeirão Preto um pedacinho de Alfenas) que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, que é parte de um sonho a ser realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
I – INTRODUÇÃO.....	2
1 - Importância Clínica dos Complexos de Platina	2
2 - Farmacocinética e Farmacodinâmica da cisplatina	2
3 - Anatomia e Fisiologia Renal	4
4 - Danos renais induzidos pela cisplatina.....	6
5 - Mitocôndria e morte celular por apoptose.....	8
6 - A importância da mitocôndria e a formação das ERO	10
7 - Estresse oxidativo resultante da exposição a xenobióticos	11
8 - Substâncias Protetoras: Antioxidantes	11
9 - Carvedilol.....	12
10 - Uso clínico da cisplatina e perspectivas futuras	13
II - OBJETIVOS.....	16
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
1 - Reagentes	18
2 - Animais.....	18
3 - Isolamento da fração mitocondrial.....	19
4 - Determinação da Proteína Mitocondrial.....	19

5 - Avaliação da Função Mitocondrial	20
5.1 - Consumo de oxigênio	20
5.2 - Potencial de membrana mitocondrial	22
5.3 - Transporte de Cálcio	23
6 - Estudos envolvendo Estresse Oxidativo e Estado Redox Mitocondrial	23
6.1 – Oxidação da cardiolipina	23
6.2 - Oxidação de NADPH	24
6.3 – Oxidação de proteínas sulfidríla (P-SH)	25
6.4 - Determinação da Glutathione (GSH)	25
6.5 – Lipoperoxidação	26
7 – Determinação de Platina.....	26
8 - Avaliação da apoptose	26
8.1 – Atividade da caspase 3	26
9 - Avaliação da Função Renal.....	27
9.1 – Uréia plasmática.....	27
9.2 – Creatinina plasmática.....	27
10 - Análise Estatística	28
IV - RESULTADOS	30
V - DISCUSSÃO	50
VI – CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO	Erro! Indicador não definido.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina difosfato

Apaf-1 – fator protease ativador da apoptose - 1

ATP – adenosina trifosfato

BHA – hidroxí anisol butilado

BHT – hidroxí tolueno butilado

BSA – albumina bovina sérica

CCCP - carbonil cianeto 3-clorofenil-hidrazona

CISP – cisplatina

CV – carvedilol

Ctr1 – transportador de cobre

DMTU – dimetiltiouréia

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxiribonucléico

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

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

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FDA – American Food and Drug Administration

FIA – Fator Indutor da Apoptose

GPx – glutatona peroxidase

GRd – glutatona redutase

GSH – glutatona reduzida

GSSG – glutatona oxidada

HEPES – ácido N-(2-hidroxi-etil)-piperazina-N'-2-etanosulfônico

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

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

$O_2^{\bullet -}$ - ânion radical superóxido

OCT2 – transportador de cátion orgânico

OH^{\bullet} - radical hidroxila

P-SH – proteína sulfidrila

RCR – Razão de Controle Respiratório

RNA – ácido ribonucléico

SOD – superóxido dismutase

TBA – ácido tiobarbitúrico

TRARS – Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

TPM – transição da permeabilidade mitocondrial

LISTA DE FIGURAS E TABELAS**Figuras**

Figura 1: Estrutura da molécula de cisplatina.....	3
Figura 2: Vias apoptóticas ativadas pela cisplatina em células tubulares renais.....	9
Figura 3: Estrutura do carvedilol.....	13
Figura 4: Desenho esquemático do eletrodo de oxigênio e suas reações de oxidação – redução	21
Figura 5: Estrutura da rodamina 123.....	22
Figura 6: Estruturas da cardiolipina (CL) e do corante 10-N-nonil-acridine orange (NAO).....	24
Figura 7: Níveis de uréia plasmática em ratos	32
Figura 8: Níveis de creatinina plasmática em ratos.....	33
Figura 9: Razão ADP/O em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos	34
Figura 10: Razão de Controle Respiratório (RCR) em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	35
Figura 11: Consumo de oxigênio no estado 3 da respiração mitocondrial	36
Figura 12: Consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial	37
Figura 13: Respiração mitocondrial.....	38
Figura 14: Potencial de membrana mitocondrial	40
Figura 15: Transporte de cálcio em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos	41
Figura 16: Níveis de cardiolipina em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	42
Figura 17: Níveis de NAD(P)H em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	43
Figura 18: Níveis de GSH em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos	44
Figura 19: Níveis do marcador de lipoperoxidação, MDA, em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	45
Figura 20: Níveis de proteína sulfidril (P-SH) em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....	46
Figura 21: Atividade da caspase-3 em homogenato de córtex renal de ratos	47

Tabelas

Tabela 1: Procedimento para dosagem de proteínas na amostra.....20

Tabela 2: Procedimento para dosagem de uréia em plasma27

Tabela 3: Procedimento para dosagem de creatinina em plasma.....28

Tabela 4: Resultados obtidos nos parâmetros relacionados às funções renal e mitocondrial, ao estado redox mitocondrial, ao estresse oxidativo mitocondrial e à apoptose nos quatro grupos de ratos tratados31

Tabela 5: Concentração de platina em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.....48

RESUMO

CARVALHO RODRIGUES, M. A. **Avaliação do efeito protetor do carvedilol na toxicidade mitocondrial renal induzida pela cisplatina em ratos**. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina II) é um efetivo agente anticâncer, porém seu uso clínico é altamente limitado, predominantemente devido à sua nefrotoxicidade. Muitos estudos têm demonstrado que a cisplatina causa disfunção mitocondrial em células epiteliais renais devido à ação de espécies reativas de oxigênio tais como ânions superóxido e radicais hidroxila. A proteção seletiva das mitocôndrias renais contra espécies reativas de oxigênio geradas pela cisplatina é fundamental na quimioterapia de pacientes com câncer. Vários estudos têm sugerido que o carvedilol é capaz de proteger contra a toxicidade mitocondrial cardíaca induzida pelo quimioterápico doxorubicina. Assim, no presente estudo investigou-se o potencial protetor deste fármaco contra a toxicidade mitocondrial renal induzida pela cisplatina, bem como os mecanismos moleculares envolvidos nesta proteção. Foram estudados 4 grupos (n=6, cada) de ratos Wistar machos tratados da seguinte forma: (i) Grupo controle: uma injeção intraperitoneal (i.p.) de DMSO (0,2mL/200g, i.p.) imediatamente antes da injeção de solução salina isotônica (2 ml/200g, i.p.) e posteriormente uma injeção diária de DMSO (0,2mL/200g, i.p.) em dois dias consecutivos; (ii) Grupo cisplatina (CISP): uma injeção de cisplatina (10 mg/kg, i.p.); (iii) Grupo carvedilol (CV): uma injeção de carvedilol (1 mg/kg, i.p.), seguida de uma injeção diária de carvedilol em dois dias consecutivos (1 mg/Kg, i.p) e (iv) Grupo carvedilol + cisplatina (CV+CISP): uma injeção de carvedilol (1mg/kg, i.p.), imediatamente antes da injeção de cisplatina (10 mg/Kg, i.p.) seguida de uma injeção diária de carvedilol nos dois dias seguintes (1 mg/Kg, i.p.). Os animais foram sacrificados 72 horas após o início do tratamento. O grupo CV+CISP apresentou uma significativa redução na lesão renal, marcada pela diminuição da concentração de uréia e creatinina plasmáticas, quando comparado ao grupo CISP. A avaliação da função mitocondrial comprovou o efeito protetor do carvedilol contra a toxicidade mitocondrial renal da cisplatina através da significativa melhora nos valores da (i) RCR, (ii) do consumo de oxigênio no estado 3 e (iii) da razão ADP/O. Além disso, no grupo CV+CISP o potencial de membrana mitocondrial e a captação de cálcio mitocondrial foram preservados. Adicionalmente, a redução da oxidação do NADPH, da cardiolipina, da glutatona e das proteínas sulfidrilas, bem como a redução na formação de MDA no grupo CV+CISP sugerem efeito protetor do carvedilol contra o estresse oxidativo mitocondrial. O grupo CV+CISP também apresentou menor ativação da caspase-3, o que sugere menor indução de apoptose. Os grupos CISP e CV+CISP apresentaram concentrações semelhantes de platina na suspensão mitocondrial renal, indicando que o mecanismo de proteção do carvedilol provavelmente não envolve a formação de complexos e a subsequente inativação da cisplatina.

Os resultados do presente estudo são promissores, pois o carvedilol é um fármaco de uso seguro e já estabelecido na clínica e a comprovação do seu efeito protetor contribuirá para o desenvolvimento de novas estratégias de prevenção dos danos nefrotóxicos da cisplatina.

Palavras-chave: mitocôndria, cisplatina, carvedilol, nefrotoxicidade, ERO, citoproteção.

ABSTRACT

CARVALHO RODRIGUES, M. A. **Evaluation of the protective effect of carvedilol against the renal mitochondrial toxicity induced by cisplatin in rats.** 2009. 91f. Dissertation (Master's Degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Cisplatin (cis-diamminedichloridoplatinum II) is an affective anticancer agent; however its clinical use is highly limited, predominantly due to its nephrotoxicity. Many studies have shown that cisplatin cause mitochondrial dysfunction in renal epithelial cells due to the generation of reactive oxygen species, such as superoxide anions and hydroxyl radicals. The selective protection of the renal mitochondria against the reactive oxygen species generated by cisplatin is of critical importance in the chemotherapy of cancer patients. Some studies have suggested that carvedilol can protect against the cardiac mitochondrial toxicity induced by the chemotherapeutic agent doxorubicin. Therefore, in the present study we investigated the protective effect of carvedilol against renal mitochondrial toxicity, as well as the molecular mechanisms involved in this protection. We studied 4 groups (n=6, each) of male Wistar rats treated as follows: (i) Control group: one injection of DMSO (0,2 mL/200g body weight, i.p.), intraperitoneal injection (i.p.), immediately before the injection of isotonic saline solution (2mL/200g body weight) followed by one injection of DMSO (0,2 mL/200g body weight, i.p.) in the two following days; (ii) Cisplatin group (CISP): one injection of cisplatin (10 mg/kg body weight, i.p.); (iii) Carvedilol group (CV): one injection of carvedilol (CV) (1mg/kg body weight, i.p.) in three consecutive days and (iv) Carvedilol + Cisplatin group (CV+CISP): one injection of carvedilol (1mg/kg, body weight, i.p.) immediately before the injection of cisplatin (10mg/kg, body weight, i.p.), followed by one injection of carvedilol (1mg/kg, body weight, i.p.) in the two following days. Animals were killed 72h after the beginning of the treatment. CV+CISP group presented a significantly reduced renal injury, marked by the decrease of urea and creatinine plasmatic levels, as compared to the CISP group. The evaluation of the mitochondrial function showed the protective effect of carvedilol against the renal mitochondria toxicity induced by cisplatin, as demonstrated by the improvement in the values of (i) RCR; (ii) the oxygen consumption on state 3 respiration and ADP/O ratio. Besides that, in the CV+CISP group the mitochondrial membrane potential and the mitochondrial calcium uptake were preserved. Additionally, the lower oxidation of NADPH, cardiolipin, glutathione and sulfhydryl proteins, as well as the lower values of MDA in the CV+CISP group, suggests a protective effect of carvedilol against the mitochondrial oxidative stress. CV+CISP group also presented lower values of caspase 3, which suggests lower induction of apoptosis. The groups CISP and CV+CISP presented a similar platinum concentration in the mitochondrial suspension, which indicates that the protective mechanism of carvedilol probably does not involve complex formation with cisplatin and its ensuing inactivation.

The present results are promising, since carvedilol is a safe drug, which is currently used in the clinical practice and the evidence of its protective effect will contribute to the development of new strategies to prevent the nephrotoxic damage of cisplatin.

Keywords: mitochondria, cisplatin, carvedilol, nephrotoxicity, ROS, cytoprotection

Introdução

I – INTRODUÇÃO

1 - Importância Clínica dos Complexos de Platina

O uso clínico da cisplatina foi aprovado em 1979 pelo FDA (“American Food and Drug Administration”) e revolucionou o tratamento de certos tipos de tumores, especialmente aqueles do trato genitourinário (SHERMAN; LIPPARD, 1987). Desde então, a cisplatina é um dos agentes quimioterápicos mais amplamente utilizados para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos, bem como hematológicos (NISHIKAWA et al., 2001). É utilizada para o tratamento de câncer de testículos, com percentual de cura superior a 90%, podendo atingir 100% nos casos de detecção precoce (WANG; LIPPARD, 2005); câncer de ovário e de bexiga, sendo também componente importante na quimioterapia empregada contra câncer de pulmão, cabeça e pescoço, pâncreas, mama, endométrio e esôfago (em conjunto com radioterapia); além de câncer cervical avançado, osteosarcomas e melanomas metastáticos, dentre outros. É também utilizada nos casos de tumores sólidos que não responderam ao tratamento padrão. O efeito terapêutico da cisplatina é significativamente aumentado com o aumento da dose, porém a terapia com altas doses é limitada pela nefrotoxicidade (CVITKOVIC, 1998; HANIGAN; DEVARAJAN, 2003).

2 - Farmacocinética e Farmacodinâmica da cisplatina

Estudos iniciais indicavam que a cisplatina entraria nas células principalmente por difusão, porém estudos posteriores sugeriram um transporte ativo pelo transportador de cobre Ctr1 (ISHIDA et al., 2002). Atualmente sabe-se que a principal via de captação de cisplatina pelas células renais é mediada por transportadores, principalmente o transportador de cátion orgânico ou OCT2 (*organic cation transporter*). Esta proteína de membrana parece ser responsável pela captação de cisplatina no túbulo proximal, tanto em animais, quanto em humanos (KRONING; LICHTENSTEIN; NAGAMI, 2000; CIARIMBOLI et al., 2005).

Uma vez na corrente circulatória, a cisplatina liga-se às proteínas plasmáticas numa proporção de 80 a 88%. Seu principal metabólito ativo, monoaquoplatina, reage rapidamente com grupos sulfidríla de aminoácidos (cisteína e metionina), peptídeos (glutathiona) e com proteínas de peso molecular elevado, como albumina e gamaglobulinas, através de ligações covalentes. Sua meia vida plasmática é longa,

aproximadamente 10 dias, sendo que a platina acumula-se progressivamente no plasma. A excreção renal da cisplatina é complexa e combina processos de reabsorção e secreção (BOISDRON-CELLE et al., 2001).

Altas concentrações da cisplatina são encontradas nos rins, fígado, intestino e testículos, mas não no sistema nervoso central (SNC). Quando administrada por infusão rápida, a meia-vida plasmática é mais curta e a quantidade de fármaco excretado é maior. A excreção biliar ou intestinal da cisplatina parece ser mínima. Sua eliminação se faz quase que exclusivamente pelos rins, o que possibilita o seu acúmulo nas células do túbulo proximal renal, onde produz espécies reativas de oxigênio, associadas ao surgimento de nefrotoxicidade (ROSENBERG, 1985; BAJORIN et al., 1986; NISHIKAWA et al., 2001).

A cisplatina é um fármaco de configuração plana, possuindo um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia (Figura 1). A presença de íons cloreto no plasma e nas células modula a reatividade da cisplatina *in vivo*. Sabe-se que o fármaco administrado por injeção intravenosa é ativado durante a passagem pelas membranas celulares (ROSENBERG, 1985).

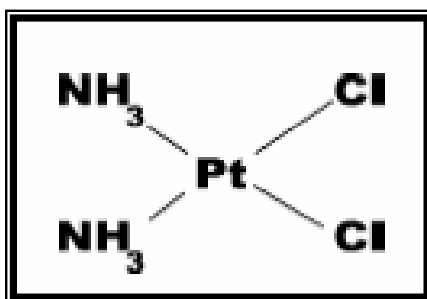


Figura 1: Estrutura da molécula de cisplatina [cis-diaminodicloroplatina (II)] (CULLEN, 2007).

Devido à baixa concentração intracelular de íons cloreto (145 mM no meio extracelular e 3 mM no meio intracelular), uma vez no interior da célula, os íons cloreto da molécula de cisplatina se dissociam da platina, sendo substituídos por grupos hidroxila (COHEN; LIPPARD, 2001). Esta hidrólise intracelular da cisplatina leva à formação de dois metabólitos altamente reativos, carregados positivamente: mono-cloro-mono-aqua-diamino-platina e diaqua-diamino-platina, por substituição de um ou dois íons cloreto, respectivamente. Estes metabólitos são capazes de alquilar bases púricas e pirimidínicas do DNA, formando ligações cruzadas intra e

interfilamentares, o que gera distorções na dupla hélice do DNA e impede sua replicação. Este mecanismo está associado ao efeito antineoplásico da cisplatina (ZWELLING; KOHN, 1979; LIPPARD, 1987; SHERMAN; LIPPARD, 1987; HALABE; WONG; SUTTON, 1991; SCHNELLMANN, 2001). Evidências experimentais indicam que os adutos DNA-cisplatina são os responsáveis pela morte das células em divisão (EASTMAN, 1999). A especificidade da cisplatina em relação à determinada fase do ciclo celular parece diferir entre os tipos celulares, embora os efeitos relativos à ligação cruzada sejam mais pronunciados durante a fase S (KADIKOYLU et al., 2004).

Além das mudanças estruturais do DNA, o tratamento com a cisplatina também está associado à condensação e fragmentação do retículo endoplasmático rugoso, depleção da glutathiona, peroxidação lipídica e dano mitocondrial (CIVITKOVIC, 1998).

3 - Anatomia e Fisiologia Renal

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

A integridade funcional dos rins é vital para a homeostase corporal, uma vez que esses órgãos desempenham o papel principal na excreção de compostos resultantes do metabolismo de xenobióticos, bem como na regulação do volume do fluido extracelular, composição eletrolítica e equilíbrio ácido-base. O glomérulo filtra aproximadamente 20% do sangue que recebe. Cerca de 60 a 80% de todo o soluto e água filtrados no glomérulo são reabsorvidos no túbulo proximal. Agentes tóxicos que provocam danos ao túbulo proximal, com interrupção na produção de energia para os mecanismos ativos de transporte, ou alterações nas funções de enzimas e transportadores de membrana, afetam profundamente a função tubular proximal e conseqüentemente, o rim como um todo (SCHNELLMANN, 2001).

O conceito de nefrotoxicidade está relacionado às alterações funcionais ou estruturais renais, decorrentes da ação tóxica de substâncias no parênquima renal, seja por atingirem alta concentração nos rins ou porque o tecido renal possui

características fisiológicas ou bioquímicas que o tornam mais susceptível àquelas substâncias (GORDON; GATTONE, 1986). Embora constituam apenas 0,5% de toda a massa corporal, os rins recebem cerca de 20 a 25% do fluxo sanguíneo cardíaco e conseqüentemente, qualquer fármaco ou substância química que atinja a circulação sistêmica atingirá os rins em elevadas quantidades. Assim, esse processo que visa a concentração da urina, acaba por concentrar também potenciais toxicantes no fluido tubular. Com a reabsorção da água e eletrólitos, os agentes tóxicos presentes no fluido tubular são concentrados e podem entrar nas células tubulares por difusão passiva. Dessa forma, um xenobiótico presente em concentrações não tóxicas no sangue, atinge concentrações tóxicas nos rins. Assim, o transporte renal, o acúmulo e o metabolismo de xenobióticos contribuem significativamente para a susceptibilidade renal ao dano tóxico. O túbulo proximal é o alvo mais comum dos danos induzidos por agentes tóxicos, devido em parte, à seletiva capacidade de acumulação de determinados xenobióticos nesse segmento do néfron (SCHNELLMANN, 2001).

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

Uma das manifestações mais freqüentes do dano nefrotóxico é a falência renal aguda, caracterizada por um declínio abrupto na filtração glomerular (SCHNELLMANN, 2001). Um fator comum a todas as formas de comprometimento da função renal, que podem levar à falência renal aguda, é o dano celular envolvendo primariamente as células epiteliais tubulares, no segmento S-2 e S-3 do

túbulo proximal, células epiteliais no ramo ascendente da alça de Henle e, possivelmente também, células epiteliais glomerulares e células endoteliais vasculares (GOLDSTEIN, 1993; WERNER; COSTA, 1995).

4 - Danos renais induzidos pela cisplatina

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

A nefrotoxicidade é um efeito adverso comum a certas drogas anticâncer e constitui a maior preocupação no tratamento com a cisplatina, limitando sobremaneira a sua utilidade no tratamento antitumoral (FAURSKOV; BJERREGAARD, 1999; KINTZEL, 2001). Cerca de 20% dos pacientes que recebem altas doses de cisplatina apresentam uma disfunção renal severa (YAO, 2007), a qual representa a maior causa de morbidade e de mortalidade associada à cisplatina (CVITKOVIC, 1998). O rim não é somente o principal responsável pela excreção da cisplatina, mas é também o principal sítio de acúmulo do fármaco (SCHNELLMANN, 2001). Segundo Kuhlmann, Burkahadart e Kohler (1997), a concentração de cisplatina em células do epitélio tubular proximal é 5 vezes maior do que sua concentração sérica.

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

As alterações histopatológicas causadas pela cisplatina incluem a degeneração dos túbulos contornados proximais, de maneira dose-dependente e cumulativa. Assim como alguns metais pesados (cádmio, chumbo, mercúrio), a cisplatina causa encurtamento e danos nas microvilosidades das células do túbulo proximal, com redução da superfície de reabsorção e danos na integridade das membranas celulares (HERAK-KRAMBERGER; SABOLIC, 2001).

O efeito nefrotóxico inicial da cisplatina manifesta-se nos túbulos proximais, seguido de deficiências na filtração glomerular e na função tubular distal. A excreção aumentada de β_2 -microglobulina é um marcador do dano tubular proximal (GRUBB, 1992), enquanto a excreção aumentada de albumina e imunoglobulina G (IgG) estão

relacionadas a problemas na filtração glomerular (HOFMAN; ROSSMULLER; GUDER, 1992). Em estudo com 30 pacientes submetidos à quimioterapia com cisplatina observou-se inicialmente uma significativa elevação da β_2 -microglobulina urinária, seguida de excreção aumentada de albumina e IgG. Esses achados confirmam o dano tubular proximal seguido de progressiva perda da capacidade de filtração renal em consequência da administração de cisplatina (KINTZEL, 2001)

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

O mecanismo pelo qual a cisplatina produz danos celulares não é exatamente conhecido, mas sabe-se que envolve os seus metabólitos e que não se deve ao átomo de platina em si, pois embora gere concentrações similares de platina nos rins, o isômero trans da cisplatina não é nefrotóxico. O efeito antitumor e possivelmente também o efeito nefrotóxico da cisplatina estão relacionados aos metabólitos produzidos por hidrólise intracelular (SCHNELLMANN, 2001).

Alguns estudos têm indicado que a toxicidade induzida pela cisplatina está relacionada à lesão mitocondrial, entretanto, os mecanismos pelos quais ocorre a ativação da cascata de eventos que culmina com a morte celular por apoptose ainda não estão bem definidos (CULLEN, 2007). Vários estudos têm abordado as interações entre a cisplatina e o DNA nuclear, porém apenas aproximadamente 1% da cisplatina intracelular está ligada ao DNA nuclear, sendo que a maior parte da cisplatina intracelular disponível interage com sítios nucleofílicos de outras moléculas, incluindo proteínas de membrana, do citoesqueleto e do citosol, fosfolipídios, RNA e DNA mitocondrial (GONZALEZ et al., 2001; FUERTES et al., 2003).

5 - Mitocôndria e morte celular por apoptose

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

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

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

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

células tubulares renais (Figura 2) tanto em modelos animais quanto em sistemas celulares (MEGYESI; SAFIRSTEIN; PRICE, 1998).

A apoptose é responsável pela nefrotoxicidade, ototoxicidade e outros efeitos adversos da cisplatina (BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003). Segundo alguns autores (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003), a cisplatina, e outros compostos de platina como carboplatina e oxaliplatina induzem a apoptose de células tumorais por mecanismos via receptor de morte celular, bem como por via mitocondrial.

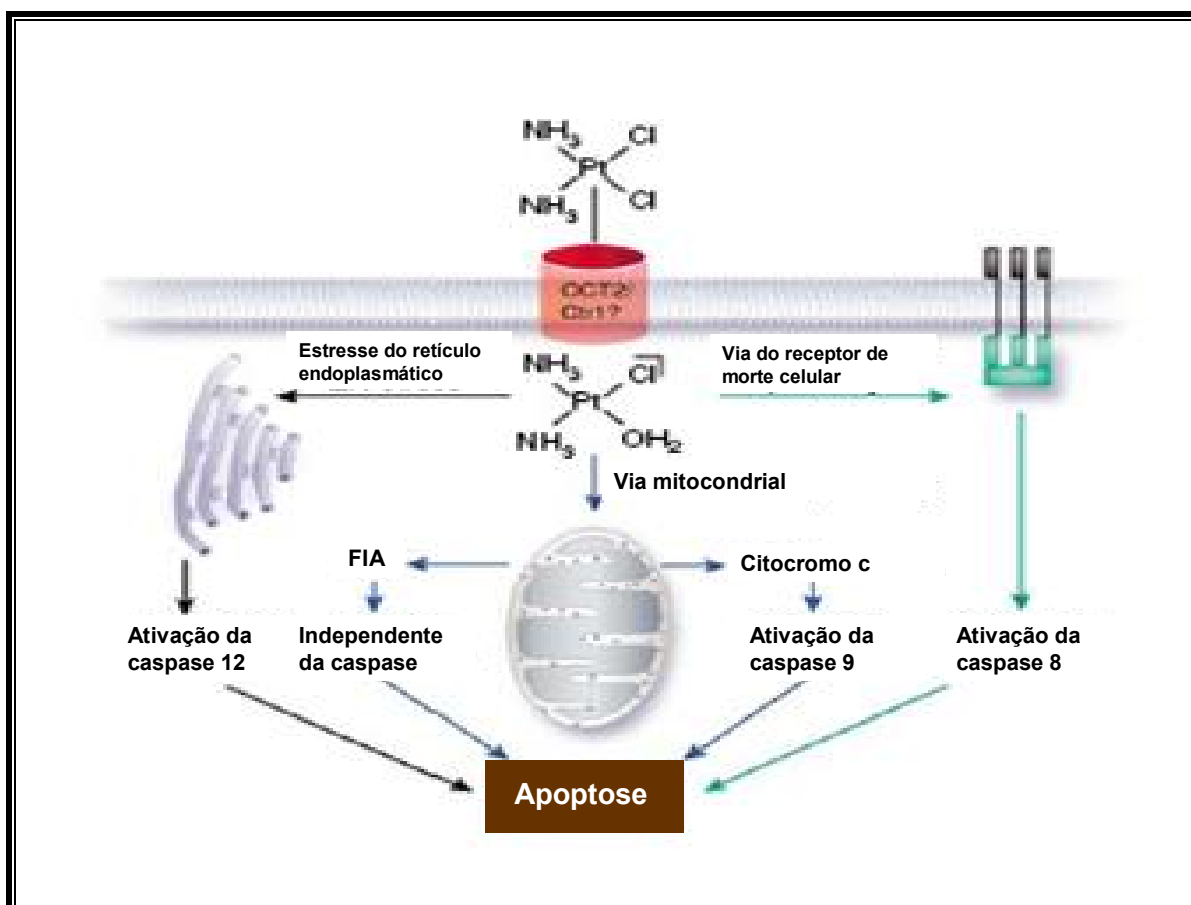


Figura 2: Vias apoptóticas ativadas pela cisplatina em células tubulares renais. A cisplatina ativa tanto a via intrínseca (mitocondrial) quanto a via extrínseca (receptores de morte celular). Além disso, pode induzir o estresse do retículo endoplasmático. A atividade dessas vias leva à apoptose de maneira dependente ou independente das caspases (FIA: Fator Indutor da Apoptose) (PABLA e DONG, 2008).

6 - A importância da mitocôndria e a formação das ERO

Diversos estudos já demonstraram que algumas espécies reativas de oxigênio (ERO) são capazes de induzir diretamente a apoptose, tais como: baixas concentrações de H_2O_2 (ZETTL et al., 1997), $O_2^{\bullet-}$ (JABS; DIETRICH; DANG, 1996), OH^{\bullet} (JACOBSON; RAFF, 1995) e peróxidos de lipídeos (SANDSTROM et al., 1994).

A produção de ERO por mitocôndrias é um evento fisiológico e contínuo em condições aeróbicas. Apesar do funcionamento da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial ter um importante papel na síntese de ATP, por meio do potencial eletroquímico de prótons gerado, a cadeia respiratória mitocondrial produz ERO constantemente. O ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é gerado principalmente pela NADH desidrogenase ou Complexo I, pela succinato desidrogenase ou Complexo II e pela ubiquinona-citocromo c oxidoreductase ou Complexo III (BOVERIS; CHANCE, 1973; TURRENS; BOVERIS, 1980; ZHANG; YU; YU, 1998). A produção de $O_2^{\bullet-}$ no complexo I pode ser (i) promovida pela presença de substratos respiratórios que geram NADH, como o malato, o glutamato e o piruvato (TURRENS; BOVERIS, 1980), e (ii) estimulada pela rotenona, um inibidor da transferência de elétrons entre o complexo I e a coenzima Q (SKULACHEV, 1996; VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2001). A coenzima Q também promove a geração de $O_2^{\bullet-}$ pelo complexo I (TURRENS, 1997). Em condições normais, o $O_2^{\bullet-}$ é transformado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 é reduzido a H_2O pela glutathione peroxidase, processo no qual é consumida glutathione reduzida (GSH), que por sua vez é mantida no estado reduzido pela glutathione redutase, em um processo que consome NADPH. Assim, a mitocôndria possui um sistema antioxidante eficiente composto por GSH, SOD, NADPH, glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GRd), além de vitaminas C e E (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000).

O Ca^{2+} pode estimular a geração de espécies reativas de oxigênio pela mitocôndria (KOWALTOWSKI; VERCESI; FISKUM, 2000). O Ca^{2+} intramitocondrial liga-se à cardiolipina (lipídeo aniônico) presente na face interna da membrana mitocondrial interna, causando alterações ultra-estruturais da cadeia respiratória mitocondrial que facilitam a produção de $O_2^{\bullet-}$ e, conseqüentemente, de H_2O_2 (GRIJALBA; VERCESI; SCHEREIER, 1999). Simultaneamente, o Ca^{2+} mobiliza o Fe^{2+} na matriz mitocondrial, o que estimula a reação de Fenton e a produção do

radical hidroxila (OH^\bullet), que ataca tióis de proteínas, lipídios e DNA mitocondrial (CASTILHO et al., 1995; VERCESI et al., 1997).

7 - Estresse oxidativo resultante da exposição a xenobióticos

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

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

8 - Substâncias Protetoras: Antioxidantes

O termo antioxidante refere-se a uma grande variedade de compostos com mecanismos de ação distintos. Segundo uma definição recente e simplificada (HALLIWELL, 2007), “antioxidante é qualquer substância que retarda, previne ou remove o dano oxidativo direcionado a uma molécula alvo”. A célula possui abundância de substratos oxidáveis, como proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA. Assim, os antioxidantes agem prevenindo a formação ou eliminando os radicais livres e seqüestrando as espécies reativas de oxigênio (ERO) ou seus precursores (HALLIWELL, 1997).

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

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

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

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

9 - Carvedilol

O carvedilol ou 1- (carbazol-4-iloxi) -3-[[2-(o-metoxifenoxi) etil] -2-propranol (Figura 3) é um beta-bloqueador de terceira geração, não-seletivo e como outros beta-bloqueadores, tem sido utilizado no tratamento de doença coronariana, hipertensão e insuficiência cardíaca (MOCHIZUKI et al., 2007). Comparado a outros beta-bloqueadores, o carvedilol possui uma característica única, apresentando, mesmo em baixas concentrações, atividade antioxidante (DANDONA; BURKAHARDT; KOHLER, 2007).

Vários mecanismos de ação têm sido explorados a fim de explicar a ação antioxidante do carvedilol e de seus metabólitos, como o (i) seqüestro de íons ferro, o que impediria a reação de Fenton e a produção do radical hidroxila (OH^\bullet), e também o (ii) seqüestro de radicais livres; porém o mecanismo ainda não está completamente elucidado (YUE et al., 1992; NOGUCHI; NISHINO; NIKI, 2000; DANDONA et al., 2007).

Vários estudos têm sugerido que o carvedilol é capaz de alterar parâmetros mitocondriais, tais como: fosforilação oxidativa, homeostase do cálcio e síntese de ATP (CARREIRA et al., 2006). Dessa forma, o carvedilol poderia ser utilizado para minimizar o estresse oxidativo, um evento importante na nefrotoxicidade da cisplatina.

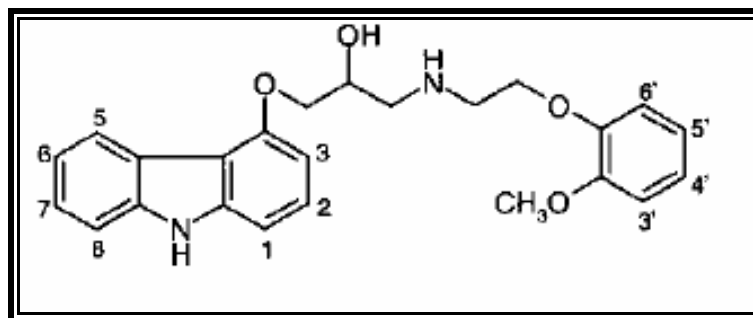


Figura 3: Estrutura do carvedilol (SCHAEFER et al., 1998).

A porção carbazol do carvedilol é a principal característica estrutural que o diferencia dos outros beta-bloqueadores, e sua atividade antioxidante se deve a esta fração da molécula. Hidroxilações nas posições 2, 6 e 8 do carbazol aumentam a atividade antioxidante de 10 a 40 vezes. Entre os vários metabólitos do carvedilol, o 1-[3-hidroxicarbazolil-(4)-oxi]-3-(2metoxifenixietil) aminopropanol-(2) é um dos mais importantes, sendo que sua formação se dá pela introdução de uma hidroxila no grupo carbazol do carvedilol. Este metabólito mostrou uma potente atividade antioxidante em concentrações aproximadamente 30 vezes inferiores à do carvedilol (YUE et al., 1992). Abreu, Santos e Moreno (2000) testaram a ação antioxidante do carvedilol e deste metabólito em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos, confirmando a atividade antioxidante do metabólito em uma concentração 40 vezes menor quando comparado ao carvedilol.

Estudos recentes (OLIVEIRA et al., 2004; SPALLAROSSA et al., 2004; ARMSTRONG, 2004) têm avaliado o efeito protetor do carvedilol contra a toxicidade mitocondrial cardíaca induzida pelo quimioterápico doxorubicina. Os resultados têm sido promissores; então, no presente estudo pretende-se avaliar o efeito protetor do carvedilol contra a toxicidade mitocondrial renal induzida pela cisplatina, efeito ainda não abordado na literatura científica.

10 - Uso clínico da cisplatina e perspectivas futuras

A prevenção da nefrotoxicidade é considerada de grande importância clínica na quimioterapia com a cisplatina (SUEISHI et al., 2002). Muitos análogos de platina têm sido sintetizados e testados como agentes antineoplásicos na tentativa de superar as limitações de uso da cisplatina e aumentar o espectro de tumores tratáveis. Dentre todos esses compostos apenas dois obtiveram aprovação do FDA,

a carboplatina e a oxaliplatina; porém ambos mostraram-se eficazes apenas contra um pequeno espectro de tumores (WANG; LIPPARD, 2005; BOULIKAS; VOUGIOUKA, 2003). Alguns agentes citoprotetores também têm sido empregados 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 agente protetor contra os efeitos adversos da cisplatina, interfere na sua atividade antitumoral (SOUZA et al., 2000; KINTZEL, 2001, CONKLIN, 2004).

Assim, entender o mecanismo de ação dos possíveis agentes citoprotetores é condição importante para o desenvolvimento de novos agentes capazes de minimizar a nefrotoxicidade, fator limitante primário na terapia do câncer com cisplatina.

Como a mitocôndria é o principal alvo de muitas drogas anticâncer, incluindo os compostos de platina (SQUID et al., 2003), tornam-se necessários estudos que possibilitem diminuir as muitas dúvidas existentes sobre a importância do estresse oxidativo no desenvolvimento de efeitos adversos induzidos pela quimioterapia, bem como o impacto dos antioxidantes no desenvolvimento desses efeitos adversos (CONKLIN, 2004).

O mecanismo molecular envolvido na prevenção dos danos renais e as estratégias efetivas de citoproteção ainda são objetos de estudo. A elucidação do papel do estresse oxidativo e do estado redox mitocondrial nesses mecanismos de citoproteção pode contribuir para o aumento da eficácia da quimioterapia, conduzindo a estratégias que possibilitem o uso de antioxidantes capazes de prevenir os danos causados pelas ERO nas células renais (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; KADIKOYLU et al., 2004). Sendo o carvedilol um fármaco seguro, largamente empregado no tratamento de hipertensão e de doenças cardíacas, a comprovação de um efeito protetor contra a mitocondriopatia renal induzida pela cisplatina forneceria uma alternativa viável e promissora para minimizar os danos renais que limitam o sucesso terapêutico deste importante antineoplásico.

Objetivos

II - OBJETIVOS

- ◆ Investigar o possível efeito citoprotetor do carvedilol com relação à toxicidade mitocondrial renal induzida pela cisplatina em ratos;
- ◆ Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na proteção mitocondrial.

*Materiais e
Métodos*

III - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Reagentes

Cisplatina, rotenona, rodamina 123, 1,1,3,3-tetrametoxipropano, OPT, TBA, DTNB e ADP foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Tiopental sódico (Thiopentax ®) foi obtido da Cristália - Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda (Itapira, SP, Brasil). Heparina (Liquemine®) foi obtida da Roche (Rio de Janeiro, Brasil). Carvedilol foi gentilmente doado pela indústria farmacêutica Torrent do Brasil (São Paulo-SP). 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 foram preparadas em solução salina isotônica (NaCl 0,9%) e as de carvedilol em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

2 - Animais

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, sob protocolo n° 07.1.899.53.2 e seguem as normas estabelecidas nos “Princípios Éticos na Experimentação Animal”.

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos, pesando 200-230 g, obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os animais foram alojados em gaiolas mantidas em salas com temperatura ambiente controlada (22-24°C), com ciclos de 12 horas de claro e escuro. Água e ração padrão foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Os animais foram divididos em 4 grupos de 6 animais cada, tratados da seguinte forma:

- I- **Grupo controle (C)**: uma injeção intraperitoneal (i.p.) de DMSO (0,2mL/200g) imediatamente antes da injeção de solução salina isotônica (2 mL/200g, i.p.) e uma injeção diária i.p. de DMSO (0,2mL/200g) nos dois dias seguintes;
- II- **Grupo cisplatina (CISP)**: uma injeção de cisplatina (10 mg/kg, i.p.);
- III- **Grupo carvedilol (CV)**: uma injeção diária de CV (1 mg/kg, i.p.) em três dias consecutivos;

IV- **Grupo carvedilol + cisplatina (CV+CISP)**: uma injeção de CV (1mg/kg, i.p.), imediatamente antes da injeção de cisplatina (10 mg/Kg, i.p.) e posteriormente uma injeção diária de CV (1 mg/Kg, i.p.) nos dois dias consecutivos.

3 - Isolamento da fração mitocondrial

Decorridas 72 horas do início do tratamento, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico (60 mg /kg) (BERRY; EDWARDS; BARRITT; 1991), o sangue foi coletado utilizando-se heparina (Liquemine®) como anticoagulante. Os animais foram decapitados, a cavidade abdominal foi aberta e os rins imediatamente retirados, imersos em meio de homogeneização (mantido em banho de gelo), e então cortados em pequenos fragmentos. O córtex foi cuidadosamente separado da medula e homogeneizado em aproximadamente 25 mL de meio composto de sacarose 250 mM, EGTA 1 mM, albumina bovina sérica 0,2% e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4 (meio de homogeneização). Para tal foi utilizado homogeneizador tipo Potter-Elvehjem (três ciclos de 15 segundos intercalados com 1 minuto de repouso).

Para isolamento das mitocôndrias foi empregado o método de centrifugação diferencial de Pedersen et al. (1978). Os homogenatos foram centrifugados 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 (sacarose 250 mM, EGTA 0,1 mM, albumina bovina sérica 0,14%, e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4) e novamente centrifugado a 13.300 x g por 10 minutos. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. O precipitado obtido foi retomado com 1 mL do meio de ressuspensão (KCl 160 mM e HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4) e homogeneizado delicadamente com pincel embebido no mesmo meio, sendo sempre mantido em banho de gelo. Todos os ensaios com a fração mitocondrial foram realizados em triplicata e em um prazo máximo de 4 horas após o isolamento.

4 - Determinação da Proteína Mitocondrial

Foi empregado o método descrito por Cain e Skilleter (1987), que usa a reação de biureto para a determinação de proteínas. Os primeiros relatos deste procedimento foram descritos por Gornall, Bardawaill e David (1949). Nesta reação o sulfato de cobre é adicionado a uma solução protéica, em um meio fortemente alcalino e uma coloração violeta é produzida, resultante do complexo formado entre

os íons cúpricos e as ligações peptídicas das proteínas. A cor foi monitorada em espectrofotômetro Femto 600 Plus operando a 540 nm.

Solução de ácido cólico a 5% em NaOH 5M foi utilizada para solubilizar as proteínas. O reagente de biureto, composto de sulfato de cobre 0,15%, tartarato de sódio e potássio 0,6% e 30% v/v de solução de NaOH 10%, foi utilizado como reativo de cor.

O procedimento foi realizado como descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Procedimento para determinação de proteínas na amostra.

	Branco	Amostra	Padrão
<i>Ácido Cólico</i> (µL)	100	100	100
<i>Padrão 10mg/mL</i> (µL)	-	-	100
<i>Suspensão Mitocondrial</i> (µL)	-	10	-
<i>Água</i> (µL)	1400	1390	1300
<i>Biureto</i> (µL)	1500	1500	1500

Para o cálculo da concentração considerou-se que a amostra estava dez vezes mais diluída que o padrão e converteu-se a unidade para mL.

A concentração de proteína foi determinada com base em um padrão de albumina bovina sérica (10 mg/mL).

5 - Avaliação da Função Mitocondrial

5.1 - Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi analisado polarograficamente, utilizando-se um monitor biológico de oxigênio (YSI model 5300, Yellow Springs Instruments Co. Inc., Ohio, USA) equipado com um eletrodo tipo Clark (YSI model 5331 oxygen probe, Yellow Springs Instruments Co. Inc., Ohio, USA). As mitocôndrias (1 mg de proteína mitocondrial) foram energizadas com glutamato de potássio 5 mM e malato de potássio 5 mM em um meio de respiração contendo KCl 160 mM, fosfato de potássio 8,5 mM, EGTA 0,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4. A respiração do

estado 3 foi iniciada com 0,4 μmol de ADP (SANTOS et al., 1997). Utilizou-se CCCP (carbonil cianeto 3-clorofenil-hidrazona) 1 μM como agente desacoplador.

A câmara foi mantida a uma temperatura de 30°C acoplada a um banho-maria e o eletrodo tipo Clark ficou em contato com a solução contida na câmara (volume final 1,6 mL). Este eletrodo é constituído por um cátodo de platina acoplado a dois ânodos de prata através de uma ponte de KCl saturada, sendo que os ânodos encontram-se envolvidos por uma membrana de teflon. Quando este eletrodo é polarizado, o oxigênio do meio de incubação contido na câmara é reduzido no cátodo de platina a íons OH^- e o fluxo de elétrons do ânodo de prata para o cátodo de platina produz uma corrente elétrica diretamente proporcional à quantidade e oxigênio presente no meio (Fig.4). O traçado foi registrado com a utilização do programa Data Q (WinDaq Software, Akron, Ohio, USA).

O monitor de oxigênio teve o zero calibrado com uma pequena quantidade de ditionito de sódio que consome o oxigênio (O_2) presente no meio de incubação.

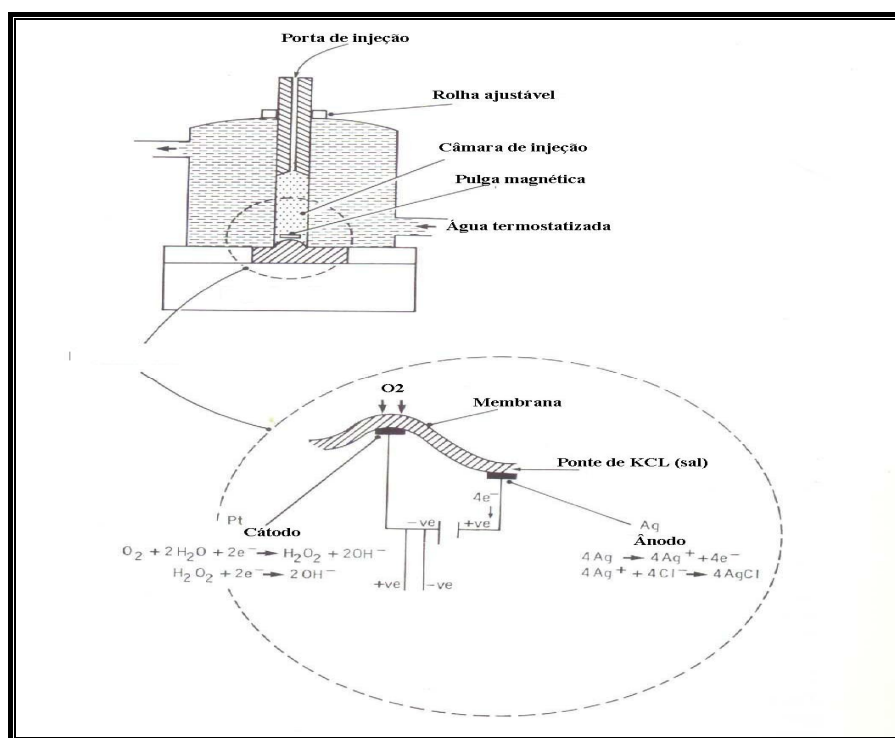


Figura 4: Desenho esquemático do eletrodo de oxigênio e suas reações de oxi - redução (CAIN; SKILLETER, 1987).

A capacidade fosforilativa, representada pela razão ADP/O e pela Razão de Controle Respiratório (RCR), bem como o consumo de O_2 nos estados 3 (na presença de ADP) e 4 (na ausência de ADP) da respiração foram determinados a

partir do traçado polarográfico, de acordo com o método descrito por Chance e Williams (1956).

5.2 - Potencial de membrana mitocondrial

O potencial elétrico da membrana mitocondrial interna foi avaliado pelo monitoramento da captação da rodamina 123 (Fig. 5), um corante fluorescente, lipofílico e catiônico com alta especificidade para mitocôndrias. O gradiente de prótons formado pelo potencial da membrana mitocondrial direciona a captação da rodamina para dentro das mitocôndrias, onde há cargas negativas, obedecendo à equação de Nernst para o fluxo passivo de íons através da membrana, sendo este um processo reversível. Quando o potencial é desfeito pela ação de um desacoplador, a rodamina é liberada da mitocôndria. (CHEN, 1988; HUANG et al, 2007)

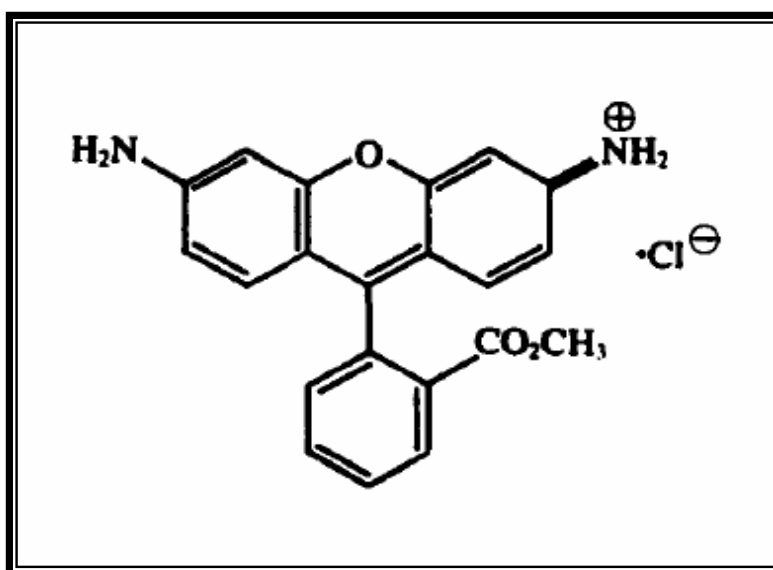


Figura 5: Estrutura da rodamina 123 (CHEN, 1988).

As mitocôndrias (1 mg/mL de proteína) foram ensaiadas em meio constituído de: KCl 160 mM, fosfato de potássio 8,5 mM, HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4, acrescido de 5 μ M de rotenona e 5 μ M de rodamina 123. A formação do potencial de membrana foi induzida com 10 mM de succinato de potássio aos 100 segundos de reação. Após aproximadamente 350 segundos, a fosforilação foi induzida com 0,4 μ mol de ADP. O desacoplador CCCP (1 μ M) foi utilizado para despolarizar a membrana mitocondrial interna após 500 segundos de reação. O tempo total de reação foi estipulado em 600 segundos. A análise foi realizada no espectrofotômetro

de fluorescência Hitachi F-2500 operando em 505 nm (excitação) e 535 nm (emissão), com fenda 5,0 nm (EMAUS; GRUNWALD; LEMASTERS, 1986).

5.3 - Transporte de Cálcio

A captação de cálcio pelas mitocôndrias foi estimada pela variação na absorbância do arsenazo III, um indicador metalocrômico de cálcio livre, que reage com o cálcio formando um complexo de coloração azulada. Quando a mitocôndria é energizada, há um influxo de cálcio através da membrana interna da mitocôndria, dirigido pelo potencial elétrico formado pelo gradiente de prótons, o que diminui a concentração do complexo no meio, diminuindo assim sua absorbância (BORLE, 1990).

Foi utilizado um meio de incubação composto de: KCl 160 mM, HEPES-KOH 10 mM, rotenona 5 μ M, cálcio 20 μ M e arsenazo III 25 μ M, pH 7,4. A proteína mitocondrial (1mg/mL) foi incubada em 2 mL do meio descrito e a captação de cálcio foi induzida pela adição de succinato de potássio 10 mM (SCARPA, 1979), após 100 segundos. A leitura foi realizada no espectrofotômetro Hitachi U-3000 operando a 680 nm.

6 - Estudos envolvendo Estresse Oxidativo e Estado Redox Mitocondrial

6.1 – Oxidação da cardiolipina

Os níveis de cardiolipina foram determinados usando-se o corante específico 10-N-nonil-acridine orange (NAO). A alta afinidade deste corante pela cardiolipina pode ser explicada por duas interações essenciais: (1) interação eletrostática entre o amônio quaternário do NAO e os resíduos de fosfato da cardiolipina e (2) interações hidrofóbicas entre cromóforos adjacentes (Fig. 6). A formação do complexo cromóforo varia da fluorescência verde para a vermelha em função do aumento da concentração de cardiolipina na amostra (PETIT et al., 1992; KAEWSUYA; DANIELSON; EKHTERAE, 2007).

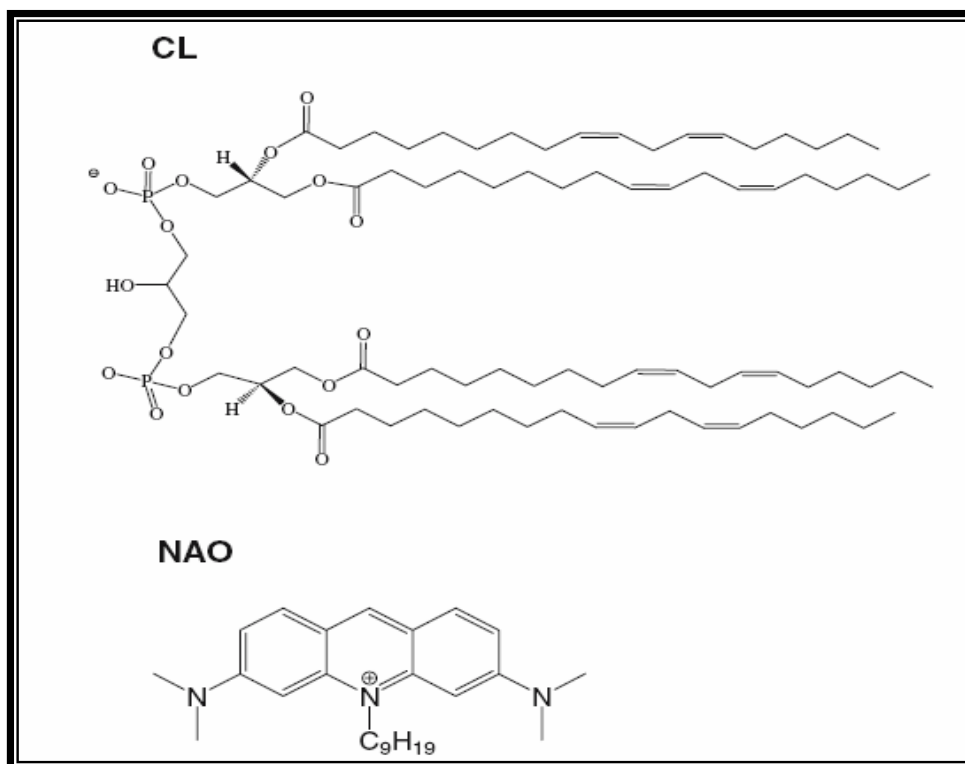


Figura 6: Estruturas da cardiolipina (CL) e do corante 10-N-nonil-acridine orange (NAO) (KAEWSUYA; DANIELSON; EKHTERAEE, 2007).

A suspensão mitocondrial (1 mg de proteína/ mL de meio) foi incubada a 30°C por 45 minutos, na presença de 10-N-nonil-acridine orange 5 μ M (dissolvido em etanol), 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 retomado no mesmo meio. A fluorescência foi determinada em um fluorímetro Hitachi, modelo F-2500, operando em 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão). A fluorescência foi convertida em unidades de fluorescência relativa usando-se quinina como referência (1 mg/mL em H₂SO₄ 0.1N, comprimento de onda de excitação = 360 nm e de emissão = 457 nm) (PETIT et al., 1992; GALLET et al., 1995).

6.2 - Oxidação de NADPH

A oxidação dos nucleotídeos de piridina foi monitorada fluorimetricamente, de acordo com método descrito por Lund, Miller e Woods (1993), que explora a capacidade auto-fluorescente de moléculas endógenas, como o NADPH, e a alteração dessas propriedades fluorescentes sob condições que alteram seu estado redox (CROCE et al., 2007).

Foi utilizado 1 mg de proteína mitocondrial/mL de um meio composto de sacarose 250mM e Hepes-KOH 10mM, pH 7,4. A fluorescência foi determinada em um fluorímetro Hitachi, modelo F-2500, operando em 450 nm (emissão) e 340 nm (excitação).

6.3 – Oxidação de proteínas sulfidrila (P-SH)

Foi empregado o método de Ellmann, cujo princípio baseia-se na reação do DTNB como grupos SH, formando ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), que na forma ionizada, produz uma coloração amarela, com pico de absorbância em 412 nm (OWUSU-APENTEN, 2005).

As proteínas (1mg) da suspensão mitocondrial foram precipitadas com 1,0 mL de ácido metafosfórico 25% e submetidas a uma centrifugação de 3000xg por 5 minutos. O precipitado resultante foi solubilizado com 0,8mL de guanidina 6M, pH 6,0. Foram então realizadas leituras nos comprimentos de onda 412 e 530 nm no espectrofotômetro Hitachi U-3000. Após as leituras foram adicionados 50 µL de DTNB 10 mM (ácido 5,5'-ditiobis[2-nitrobenzóico], solubilizado em metanol) à solução e esta foi incubada por 30 minutos no escuro, à temperatura ambiente e uma nova leitura à 412 e 530nm foi realizada. A concentração foi obtida pela diferença de leitura nestes comprimentos de onda, antes e após a adição do DTNB. O resultado foi calculado com base no coeficiente de extinção molar à 412 nm: $13\ 600\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (GRATTAGLIANO, et al., 1996).

6.4 - Determinação da Glutathiona (GSH)

A determinação da glutathiona foi realizada de acordo com a técnica de Hissin e Hilf (1976) modificada. A suspensão de proteína mitocondrial (1mg) foi tratada com 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugada a 900xg por 3 minutos. O sobrenadante obtido (100 µL) foi adicionado a 2mL de tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4), pH 8,0, contendo EGTA 5mM. A essa solução foram adicionados 100 µL de o-ftaldialdeído 1mg/mL (solubilizado em metanol) e a fluorescência foi medida após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, em um fluorímetro Hitachi, modelo F-2500 operando em 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão).

6.5 – Lipoperoxidação

A lipoperoxidação da membrana mitocondrial foi avaliada através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA forma um cromóforo rosa ao reagir com o ácido tiobarbitúrico, o que permite sua quantificação por método espectrofotométrico.

A suspensão mitocondrial (2mg) foi adicionada ao meio de ressuspensão mitocondrial até completar o volume final de 400 µL. Foram então adicionados 400µL de ácido tiobarbitúrico 1% m/v (TBA, solubilizado em NaOH 50mM), 200 µL de H₃PO₄ 20%, 40 µL de NaOH 10M e 10 µL de BHT 100mM (butil-hidroxitolueno). A solução foi homogeneizada e aquecida a 85°C por 20 minutos. Após esfriar naturalmente, foram adicionados 1,5 mL de butanol, a mistura foi agitada em vortex por 3 minutos e as fases foram separadas por centrifugação a 1500rpm por 5 minutos. A fase orgânica (superior) foi coletada e a concentração determinada a partir da medida da absorbância em 535 nm frente a uma curva de calibração preparada com 1,1,3,3-tetrametoxipropano. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3000 (KOWALTOWSKI, et al., 1996).

7 – Determinação de Platina

Uma alíquota de 80µL do homogenato de córtex renal foi diluída a um volume final de 2,0mL com uma solução contendo: HNO₃ 0,5% v/v e Triton x-100 0,005% v/v. O isótopo ¹⁹⁵Pt foi monitorado por Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma (ICP-MS ELAN DRCII) e a quantificação foi realizada com base em uma curva de calibração contendo 1; 5; 10 e 20 ppb de platina, preparada na mesma solução diluente (GOULLÉ et al., 2005).

8 - Avaliação da apoptose

8.1 – Atividade da caspase 3

Foi utilizado o kit comercial Caspase-3 Fluorimetric Assay[®] (R&D Systems). O homogenato do córtex renal (4mg de proteína) foi diluído (1:3) com o tampão de lise e a solução permaneceu no gelo por 10 minutos. O lisado (200µL) foi adicionado de 200µL do tampão de reação e 20 µL do substrato fluorescente (DEVD-AFC) e incubado em banho-maria (37°C) por 90 minutos. A fluorescência foi determinada no fluorímetro Hitachi, modelo F-2500, operando em 400 nm (excitação) e 505 nm (emissão).

9 - Avaliação da Função Renal

9.1 – Uréia plasmática

A uréia foi determinada com a utilização de Kit diagnóstico (Uréia CE Labtest®), conforme procedimento descrito pelo fabricante (Tabela 2).

O método baseia-se na reação de Berthelot, descrita em 1859, que relata a reação do hipoclorito de sódio e do fenol com a amônia. Nesta reação ocorre a hidrólise da uréia pela ação da urease com formação de íon amônio e CO₂. O íon amônio, por sua vez, reage em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar o azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra e as absorvâncias são determinadas em comprimento de onda de 600 nm (BOLLETER, BUSHMAN, TIDWELL, 1961; WILCOX et al., 1966).

Tabela 2: Procedimento para determinação de uréia em plasma.

	Branco	Amostra	Padrão
<i>Amostra (µL)</i>	-	10	-
<i>Padrão (µL)</i>	-	-	10
<i>Urease tamponada (mL)</i>	1,0	1,0	1,0

Após agitação os tubos foram incubados a 37°C por 5 minutos. Após a incubação adicionou-se 1,0 mL de oxidante de uso (hidróxido de sódio 0,14 mol/L e hipoclorito de sódio 6,05 mmol/L), agitou-se e incubou-se novamente a 37°C por 5 minutos.

A absorvância foi determinada no espectrofotômetro Femto 600 plus operando em 600 nm e a concentração da amostra foi calculada dividindo-se a absorvância da amostra pela absorvância do padrão e multiplicando o valor pela concentração do padrão (70 mg/dL).

9.2 – Creatinina plasmática

A creatinina foi determinada utilizando-se Kit diagnóstico (CREATININA Labtest®), que se baseia na reação descrita por Jaffé, na qual a creatinina reage

com o ácido pícrico em meio alcalino, gerando uma coloração avermelhada (NARAYANAN; APPLETON, 1980).

Uma alíquota de 0,5 mL do plasma foi adicionada de 1,0 mL de ácido pícrico (reagente n°1), agitada e centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos. Este processo (desproteíntização) foi realizado a fim de retirar a interferência de proteínas, já que o plasma apresentou-se turvo em todos os grupos.

Os ensaios foram realizados segundo o procedimento descrito pelo fabricante (Tabela 3).

Tabela 3: Procedimento para determinação de creatinina em plasma

	Branco	Amostra	Padrão
<i>Tampão (n° 2) (mL)</i>	2,0	2,0	2,0
<i>Sobrenadante (mL)</i>	-	0,75	-
<i>Água (mL)</i>	0,25	-	-
<i>Padrão (n° 3) (mL)</i>	-	-	0,25
<i>Ac. Pícrico (n°1) (mL)</i>	0,50	-	0,50

Após agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos e a absorbância foi determinada a 510 nm (A1).

Adicionou-se, então, ao branco e ao teste 0,1 mL de acidificante (ácido acético, reagente n°4); após homogeneização a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos. Uma nova absorbância foi determinada a 510 nm (A2).

Para o cálculo da concentração de creatinina em mg/dL utilizou-se a seguinte fórmula: $(A1 - A2) / \text{Abs. do Padrão} \times 4$.

10 - Análise Estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se teste não paramétrico (Mann-Whitney Test) com a utilização do programa "GraphPad Prism version 5.00 for Windows" (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA). Foi adotado $p < 0,05$ como nível de significância.

Resultados

IV - RESULTADOS

Na análise dos resultados foram adotados os seguintes critérios para determinação do nível de significância:

- a) o grupo tratado com cisplatina (CISP) foi comparado ao grupo controle (tratado com salina e DMSO), para a validação do modelo e comprovação dos efeitos nefrotóxicos;
- b) o grupo tratado com carvedilol e cisplatina (CV+CISP) foi comparado ao grupo tratado somente com cisplatina (agente nefrotóxico) para investigar a possível proteção;
- c) o grupo tratado apenas com o agente supostamente protetor (carvedilol, CV) foi comparado ao grupo controle para verificar a ocorrência de outros efeitos do carvedilol sobre as mitocôndrias, além do efeito protetor com relação à nefrotoxicidade.

Os resultados de todos os ensaios realizados no grupo tratado apenas com carvedilol não apresentaram diferença significativa, isto é, $p < 0,05$, quando comparados aos resultados do grupo controle, demonstrando que o carvedilol não exerceu nenhum efeito sobre as mitocôndrias que pudessem invalidar os modelos experimentais ou as conclusões decorrentes dos efeitos observados.

A tabela 4 relaciona as médias e os valores de desvio padrão de todos os parâmetros avaliados nos quatro grupos de animais e relaciona ainda os números das figuras representativas e o número das páginas em que se encontram.

Tabela 4: Resultados obtidos nos parâmetros relacionados às funções renal e mitocondrial, ao estado redox mitocondrial, ao estresse oxidativo mitocondrial e à apoptose nos quatro grupos de ratos tratados (Controle, CISP, CV e CV/CISP).

Parâmetro	Unidade	Controle	Cisplatina	CV	CV/CISP	Figura	Pág.
Uréia	mg/dL	55,06 (± 6,43)	291,74 * (± 8,71)	51,03 (± 5,34)	38,77 # (± 6,06)	7	32
Creatinina	mg/dL	0,51 (± 0,08)	3,10 * (± 0,11)	0,51 (± 0,05)	0,49 # (± 0,27)	8	33
ADP/O	-	2,37 (± 0,57)	1,54* (± 0,30)	2,32 (± 0,16)	2,61# (± 0,16)	9	34
RCR	-	4,56 (± 0,89)	2,94* (± 0,11)	4,45 (± 0,31)	2,37 # (± 0,57)	10	35
Consumo O₂ estado 3	ngátomosO/min/ mg proteína	139,12 (± 13,80)	90,33 * (± 15,33)	136,11 (± 13,49)	131,80# (± 6,08)	11	36
Consumo O₂ estado 4	ngátomosO/min/ mg proteína	25,66 (± 7,11)	23,33 (± 6,66)	28,97 (± 2,60)	30,17 (± 6,80)	12	37
Respiração mitocondrial	-	Traçado A	Traçado B	Traçado C	Traçado D	13	38
Potencial de membrana	-	Traçado A	Traçado B	Traçado C	Traçado D	14	40
Transporte de cálcio	-	-	-	-	-	15	41
Cardiolipina	Unidades fluorescência	0,38 (± 0,03)	0,29* (± 0,06)	0,42 (± 0,03)	0,42# (± 0,04)	16	42
NADPH	%	100,00 (± 0,86)	79,52* (± 1,48)	100,28 (± 5,02)	100,28# (± 0,83)	17	43
GSH	nmol/mg proteína	3,32 (± 0,52)	1,97* (± 0,11)	3,23 (± 0,31)	2,98# (± 0,26)	18	44
MDA	nmol/mg proteína	0,20 (± 0,04)	0,42* (± 0,04)	0,21 (± 0,03)	0,21# (± 0,07)	19	45
P-SH	nmol/mg proteína	12,34 (± 1,25)	8,72* (± 1,27)	12,46 (± 2,49)	11,29# (± 1,76)	20	46
Caspase-3	%	100,00 (± 17,38)	241,53* (± 28,53)	123,35 (± 37,74)	121,79# (± 29,06)	21	47
Platina	Ppb/mg proteína	3,58 (± 4,01)	1384,50* (± 256,22)	1,38 (± 0,45)	1294,64* (± 753,15)	Tab. 5	48

Os valores são expressos como média ± desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

Nossos resultados indicam que a cisplatina foi capaz de induzir uma marcante insuficiência renal em ratos tratados com 10 mg/kg do fármaco, avaliada pelos níveis plasmáticos de uréia e creatinina. A concentração de uréia no plasma subiu de 55,06 ($\pm 6,43$) mg/dL no grupo controle, para 291,74 ($\pm 8,71$) mg/dL no grupo CISP, o que corresponde a um aumento de 520,67% ($p < 0,05$). No grupo CV+CISP o valor médio de uréia plasmática encontrado foi de 38,77 ($\pm 6,06$) mg/dL, portanto, significativamente menor ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo CISP (Figura 7). No caso da creatinina, a concentração do grupo controle aumentou de 0,51 ($\pm 0,08$) mg/dL para 3,10 ($\pm 0,11$) mg/dL no grupo CISP (507,84%, $p < 0,05$). A concentração no grupo CV+CISP foi de 0,49 ($\pm 0,27$) mg/dL, valor significativamente menor ($p < 0,05$) em relação ao grupo CISP (Figura 7).

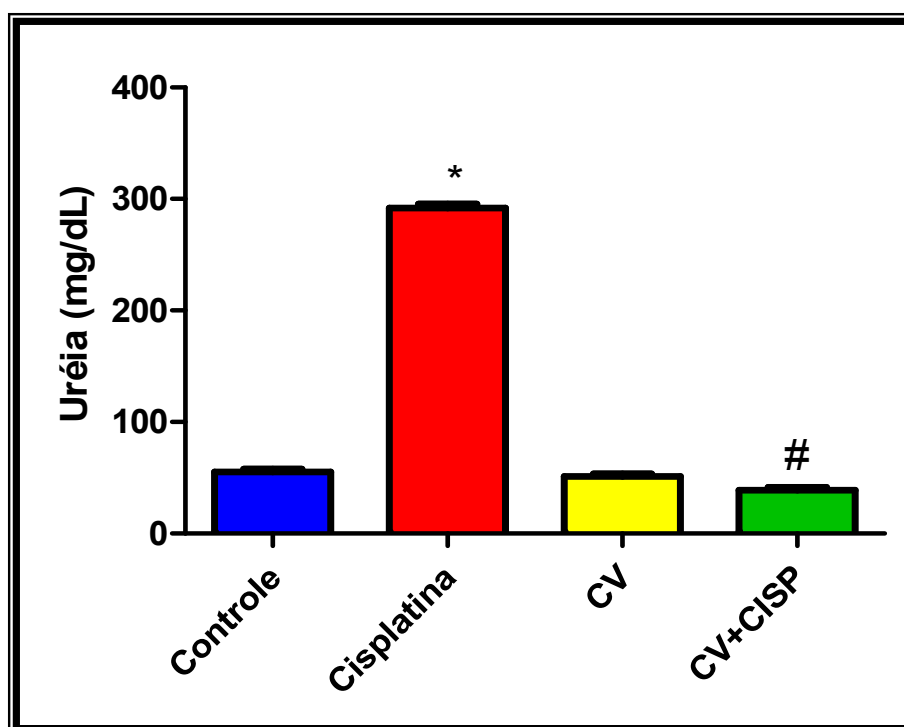


Figura 7: Níveis de uréia plasmática em ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

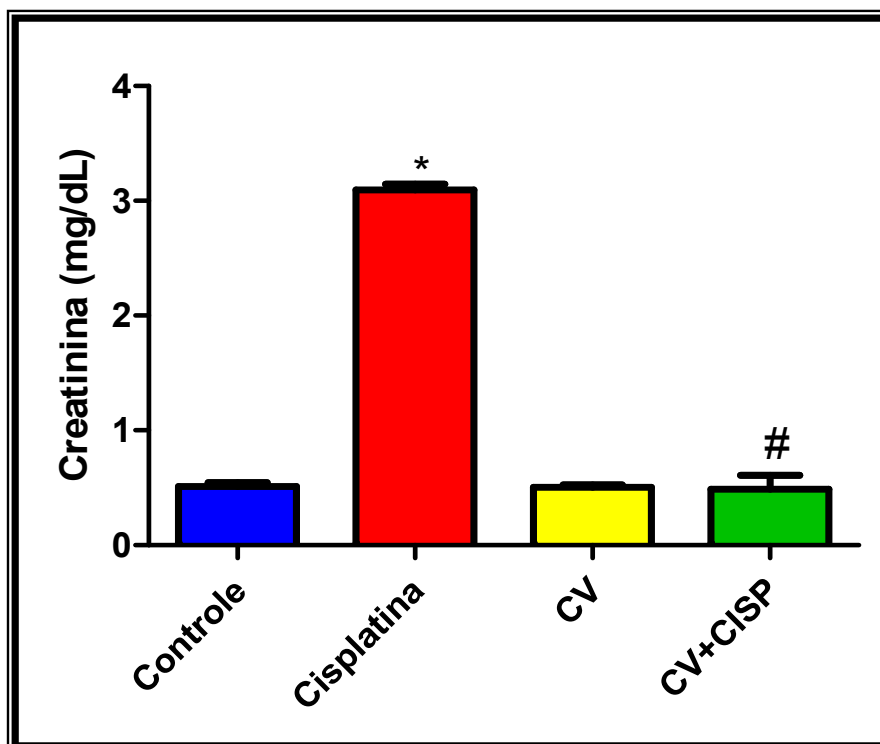


Figura 8: Níveis de creatinina plasmática em ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

Os parâmetros respiratórios ADP/O e RCR foram significativamente ($p < 0,05$) alterados no grupo CISP, ficando também evidente a proteção ($p < 0,05$) no grupo CV+CISP. Os valores de ADP/O para os grupos controle, CISP, CV+CISP e CV foram: 2,37 ($\pm 0,57$); 1,54 ($\pm 0,30$); 2,32 ($\pm 0,16$) e 2,61 ($\pm 0,16$), respectivamente (Figura 9); enquanto os valores de RCR foram: 4,56 ($\pm 0,89$); 2,94 ($\pm 0,11$); 4,45 ($\pm 0,31$) e 4,43 ($\pm 0,91$), respectivamente (Figura 10).

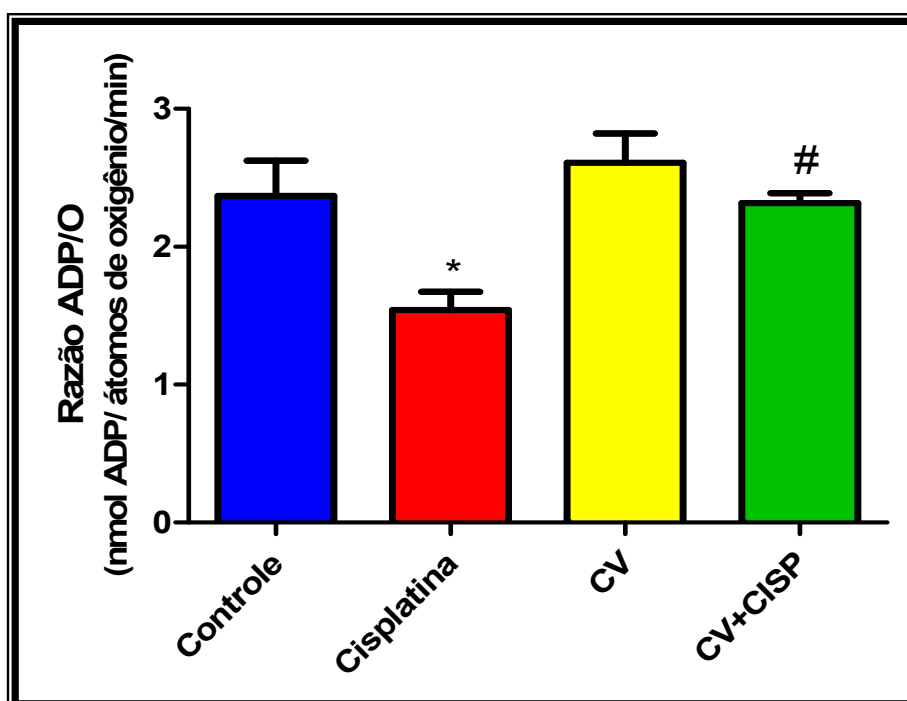


Figura 9: Razão ADP/O em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas então descritas em Materiais e Métodos.

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

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

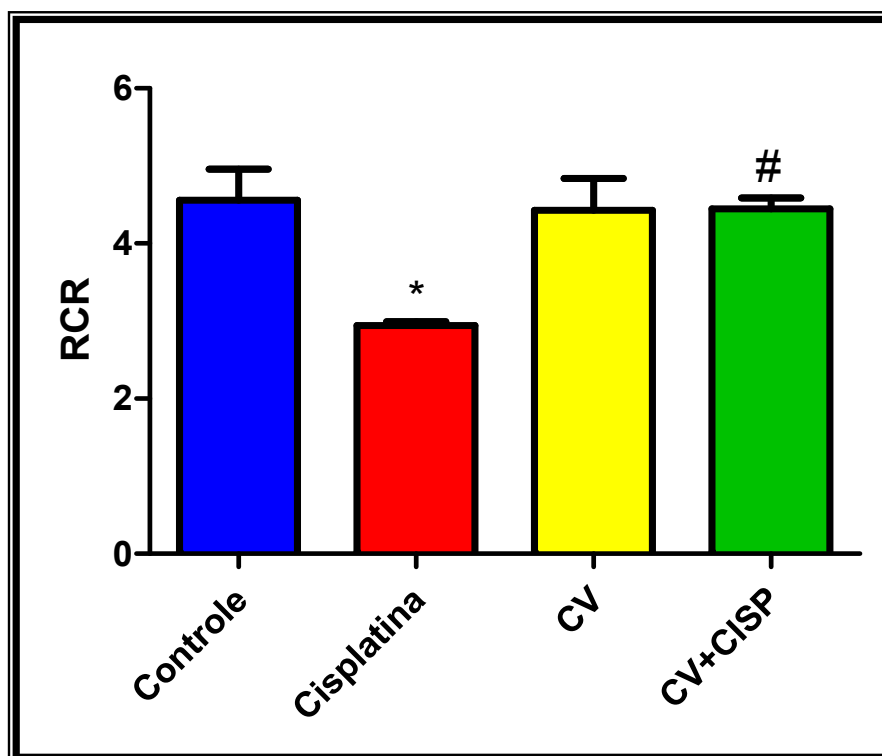


Figura 10: Razão de Controle Respiratório (RCR) em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas então descritas em Materiais e Métodos.

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

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

O consumo de O_2 no estado 3 da respiração foi significativamente ($p < 0,05$) menor no grupo CISP ($90,33 \pm 15,33$ ng de átomos de oxigênio/min/mg de proteína) quando comparado ao grupo controle ($139,12 \pm 13,80$ ng de átomos de oxigênio/min/mg de proteína). O carvedilol mostrou-se um protetor eficiente, com consumo de O_2 significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo CISP, ou seja, $131,80 (\pm 6,08)$ ng de átomos de O_2 /min/mg de proteína (Figura 11). Não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos na avaliação do consumo de oxigênio no estado 4 da respiração mitocondrial, como mostra a Figura 12. Tais parâmetros foram calculados através dos traçados representativos da respiração mitocondrial apresentados na Figura 13.

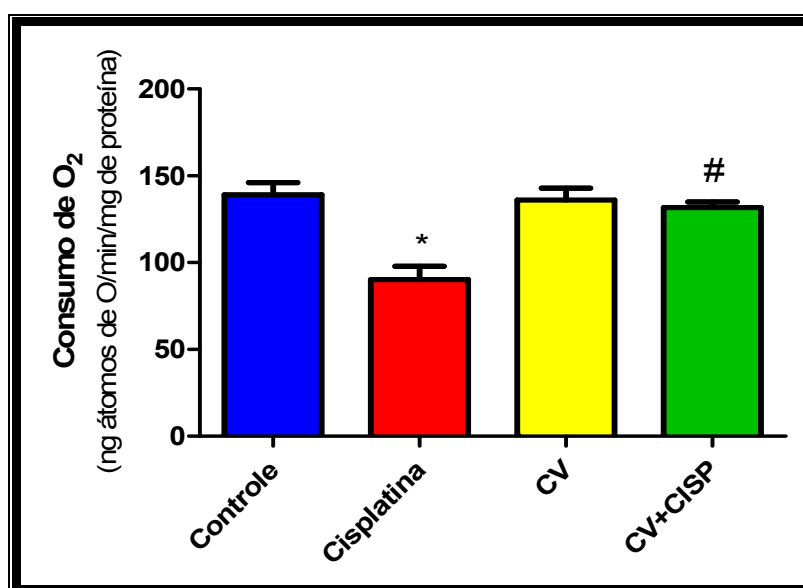


Figura 11: Consumo de Oxigênio no Estado 3 da Respiração Mitocondrial. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

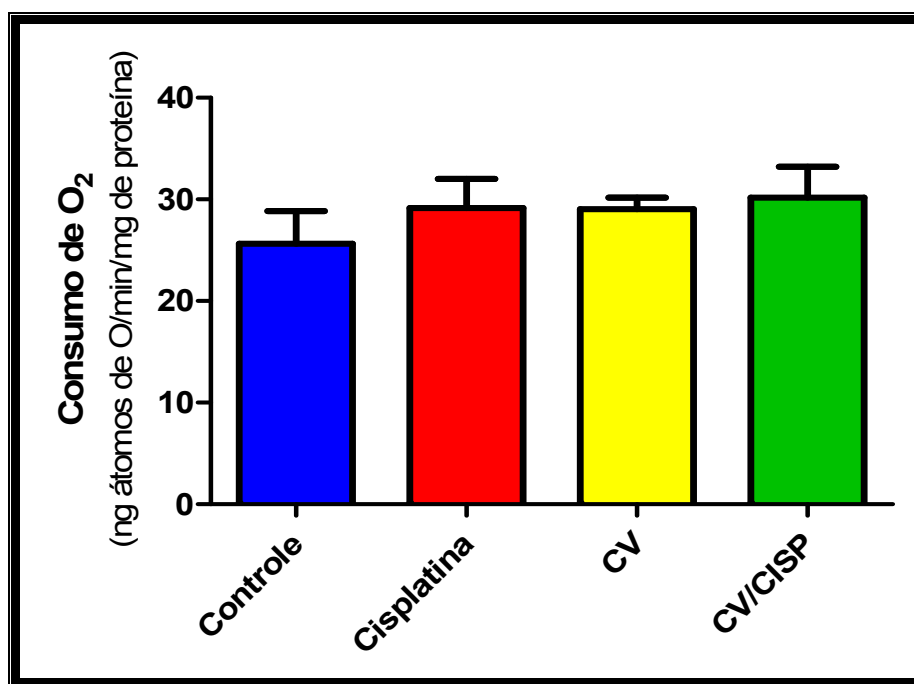


Figura 12: Consumo de Oxigênio no Estado 4 da Respiração Mitocondrial. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

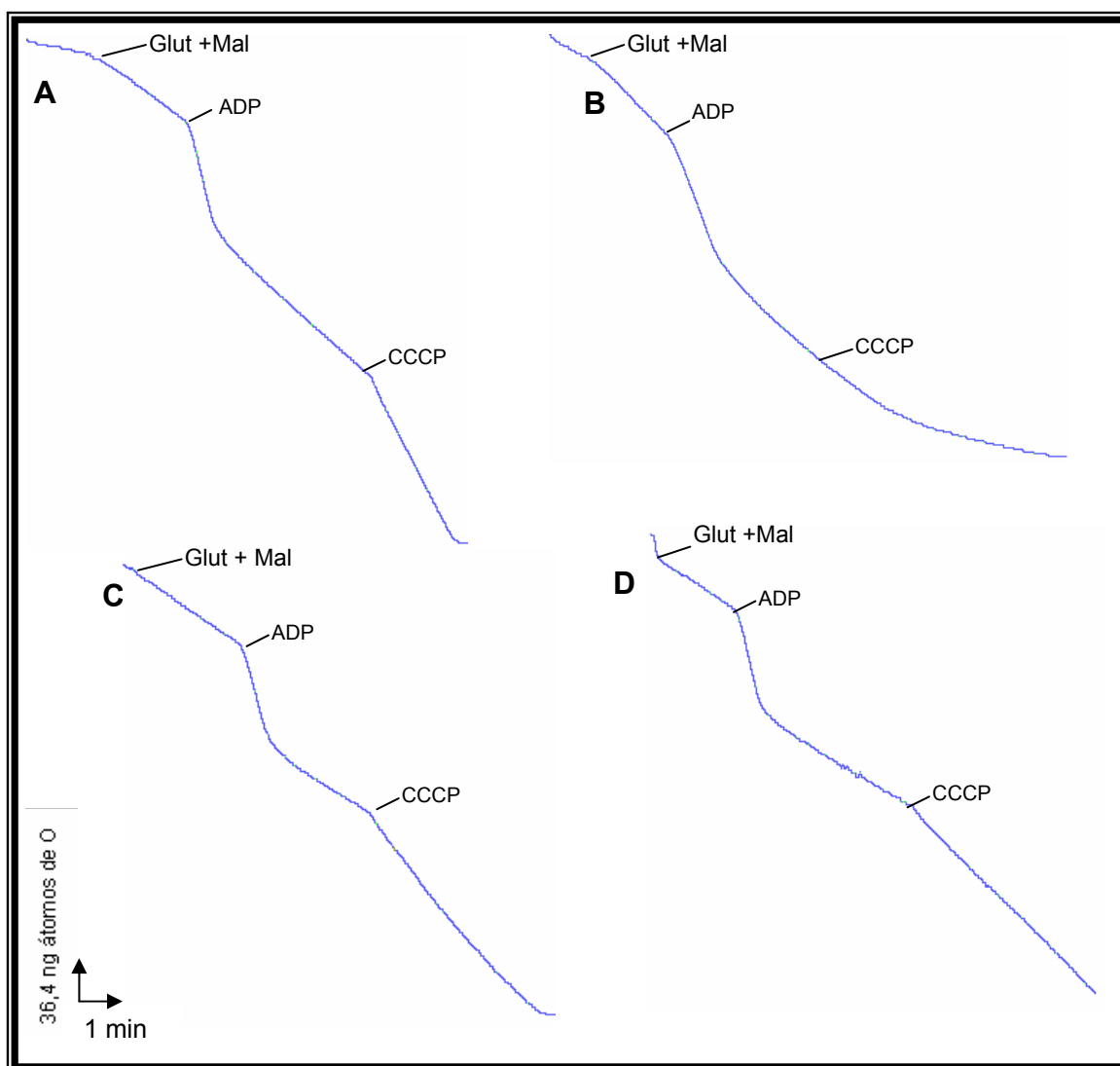


Figura 13: Respiração mitocondrial. Traçados representativos da respiração mitocondrial dos grupos controle (A), Cisplatina (B), CV (C) e CV/Cisp (D); as mitocôndrias foram energizadas com 5 mM de glutamato de potássio e 5 mM de malato de potássio, a fosforilação foi iniciada com 0,4 μ mol de ADP e 1 μ M de CCCP foi utilizado como desacoplador. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

O efeito da cisplatina no potencial elétrico transmembrana mitocondrial está representado na Figura 14. Os traçados representam a diminuição da fluorescência do meio, conferida pela sonda fluorescente rodamina 123, em decorrência da captação dessa sonda pelas mitocôndrias. A intensidade da fluorescência é inversamente proporcional ao potencial de membrana, assim, quanto maior o potencial de membrana formado, menor a fluorescência, sendo que o decaimento nos traçados indica aumento do potencial de membrana e vice-versa. Em todos os traçados, após a adição do substrato succinato de potássio (10 mM) ocorre o desenvolvimento do potencial de membrana, com conseqüente decréscimo da fluorescência. A adição do ADP (substrato para o estado 3 da respiração) causou um imediato decréscimo no potencial, correspondente à energia utilizada para sintetizar o ATP através da fosforilação oxidativa. Uma vez completo o ciclo da fosforilação, o potencial de membrana retornou aos níveis anteriores à adição do ADP nos traçados **A** (grupo controle), **C** (CV) e **D** (CV + CISP). O grupo protegido pelo carvedilol (traçado D), apesar de ter fosforilado o ADP mais lentamente que o grupo controle, foi capaz de recuperar o potencial inicial. No grupo CISP (traçado B), no entanto, nota-se claramente que a fosforilação do ADP ocorreu mais lentamente e que o potencial não retornou aos níveis anteriores à adição do ADP, desfazendo-se progressivamente, mesmo antes da adição do agente desacoplador CCCP. O CCCP desfaz o gradiente de prótons, despolarizando completamente a membrana mitocondrial interna e comprovando a validade do modelo experimental.

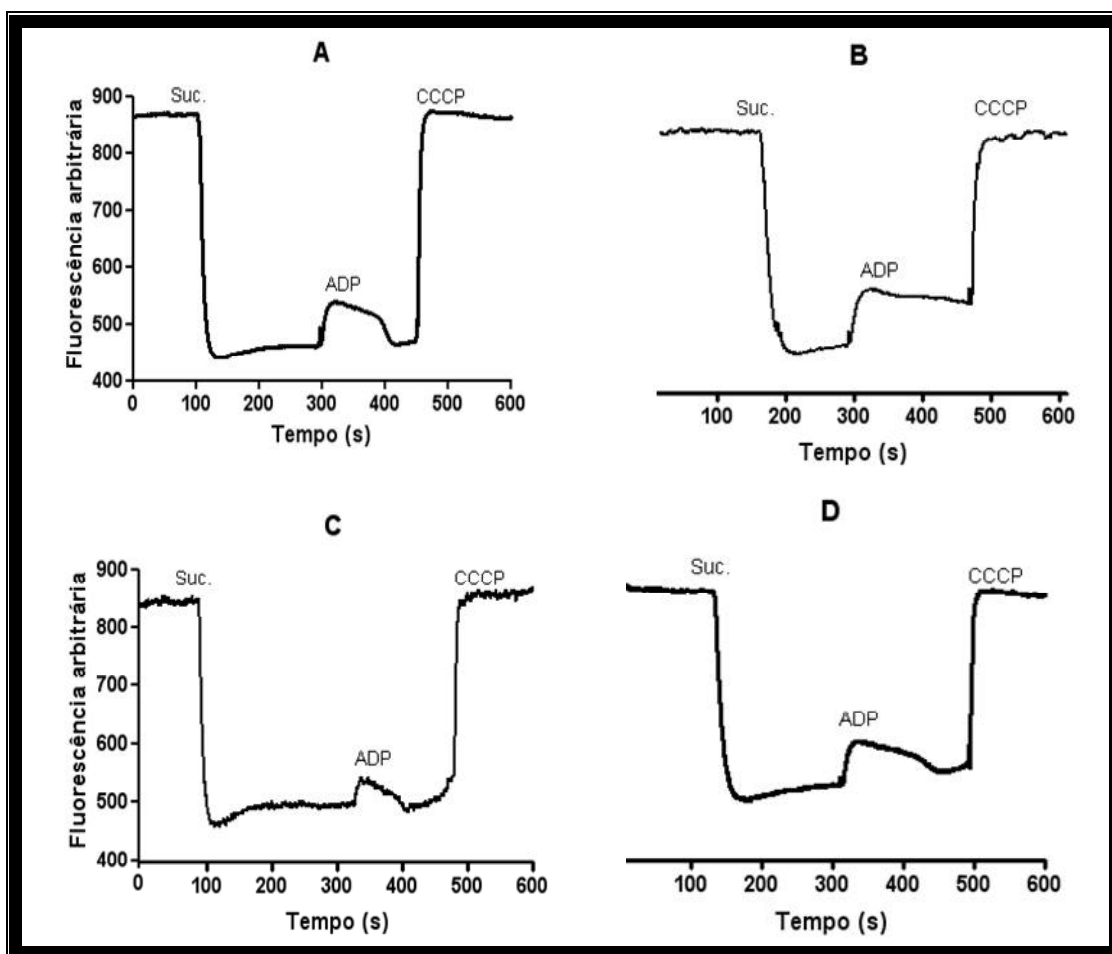


Figura 14: Potencial de membrana mitocondrial. (A) Controle; (B) Cisplatina; (C) Carvedilol; (D) Carvedilol + Cisplatina; Suc.= succinato de potássio 10 mM; ADP= trifosfato de adenosina 400 nmol; CCCP = carbonil cianeto 3-clorofenil hidrazona 1 μ M. As condições experimentais descritas em Materiais e Métodos.

Na Figura 15 pode-se constatar uma menor captação de cálcio no grupo CISP com relação ao grupo controle, demonstrada pelo menor decaimento da absorbância do arsenazo III (indicador de cálcio livre) após a adição de succinato de potássio (10 mM). Os grupos controle, CV e CV+CISP apresentaram comportamento muito semelhante, com uma considerável queda na absorbância do arsenazo III, o que indica captação de cálcio pela mitocôndria.

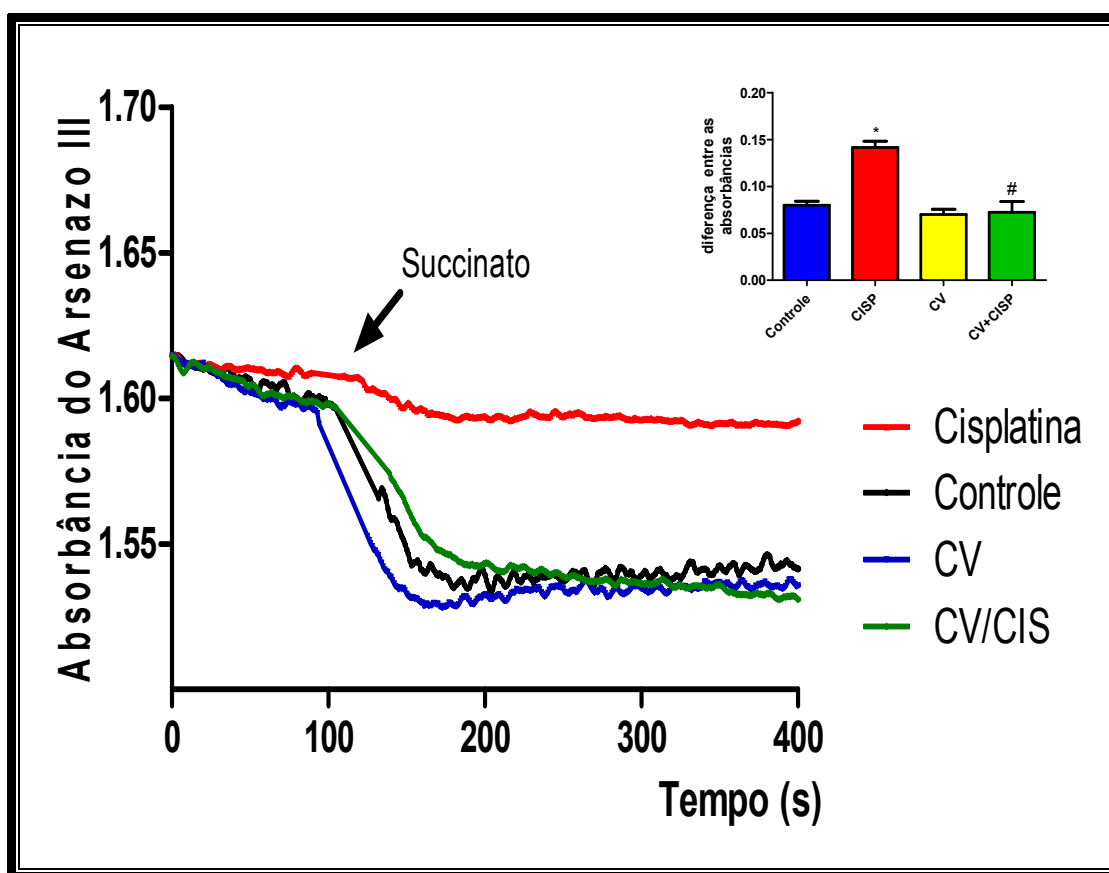


Figura 15: Transporte de cálcio em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. O gráfico superior representa a análise estatística da variação das absorbâncias aos 300 segundos. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

No ensaio de determinação da cardiolipina (Figura 16) os valores de fluorescência encontrados foram convertidos em unidades de fluorescência relativa usando-se solução de quinina (1mg/ml em H₂SO₄ 0.1N) como referência. A quantidade de cardiolipina nas mitocôndrias diminuiu de 0,38 (\pm 0,03) no grupo controle para 0,29 (\pm 0,06) no grupo CISP, indicando significativa oxidação da molécula ($p < 0,05$). No grupo CV+CISP os níveis de cardiolipina (0,42 \pm 0,04), mantiveram-se muito próximos aos do grupo controle, com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo CISP.

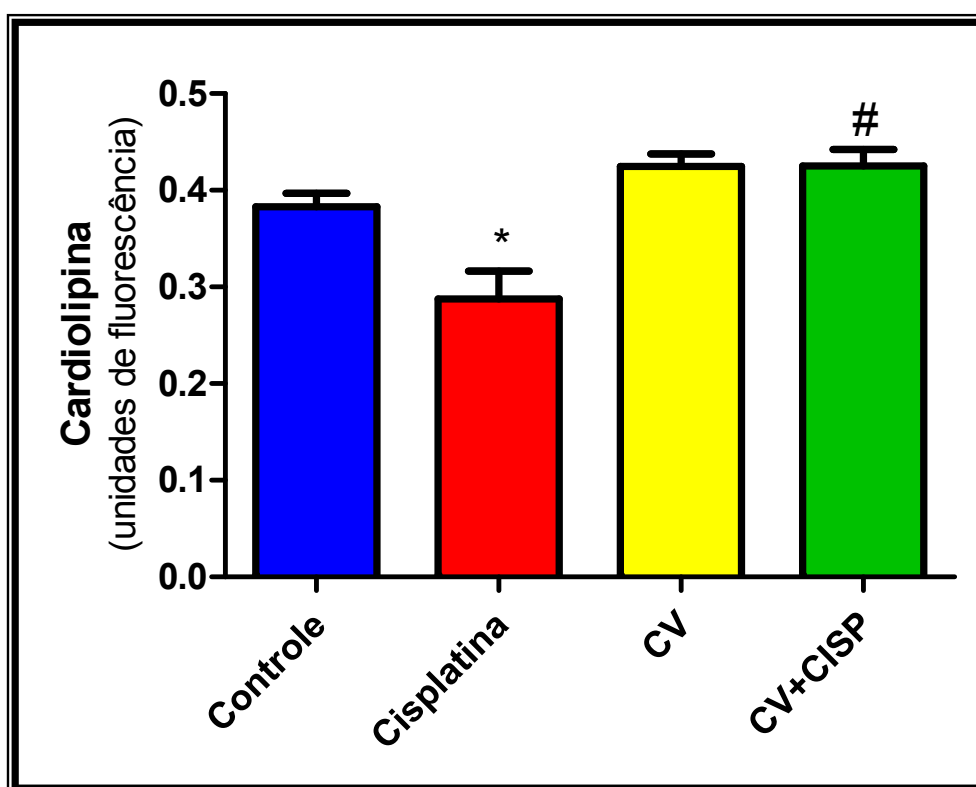


Figura 16: Níveis de cardiolipina em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

Os níveis de NAD(P)H (Figura 17) apresentaram uma significativa redução no grupo tratado com cisplatina ($79,52\% \pm 1,48$) em relação ao grupo controle ($100\% \pm 0,86$) ($p < 0,05$). O grupo CV+CISP ($92,57\% \pm 1,18$) apresentou proteção significativa quando comparado ao grupo CISP. O grupo carvedilol ($100,28\% \pm 0,83$) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle.

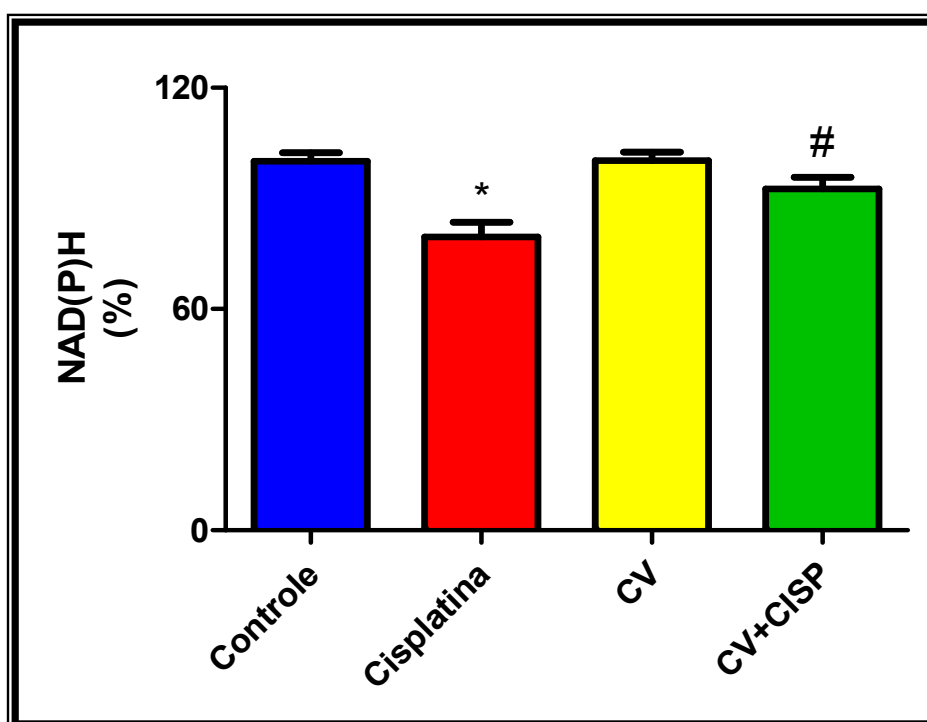


Figura 17: Níveis de NAD(P)H em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

A concentração da glutatona reduzida caiu de 3,32 (\pm 0,52) para 1,97 (\pm 0,11) nmols/mg de proteína, ao comparar o grupo controle com o grupo cisplatina. A média da concentração de GSH no grupo CV+CISP foi de 2,98 (\pm 0,26) nmols de /mg de proteína, semelhante ao controle e significativamente ($p < 0,05$) maior que o valor encontrado no grupo cisplatina.

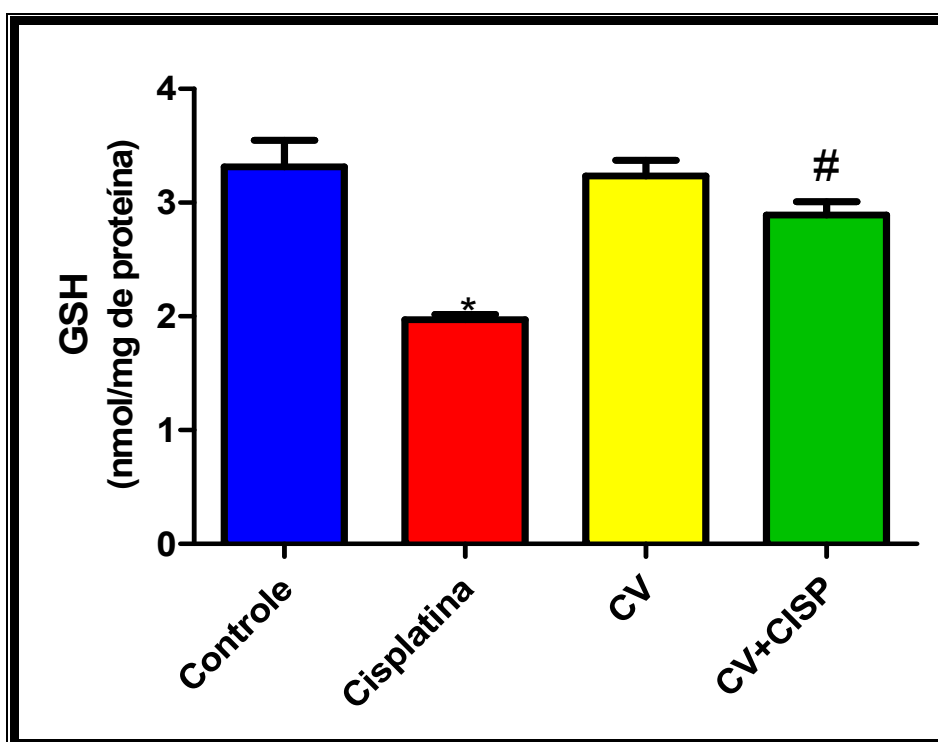


Figura 18: Níveis de GSH em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

A concentração média do marcador de lipoperoxidação, MDA, no grupo controle foi $0,20 (\pm 0,04)$ nmols/mg de proteína, enquanto o grupo CISP apresentou uma concentração significativamente ($p < 0,05$) maior, de $0,42 (\pm 0,04)$ nmols/mg de proteína. O grupo CV/CISP apresentou um resultado muito semelhante ao do controle ($0,21 \pm 0,07$ nmols/mg de proteína) (Figura 19).

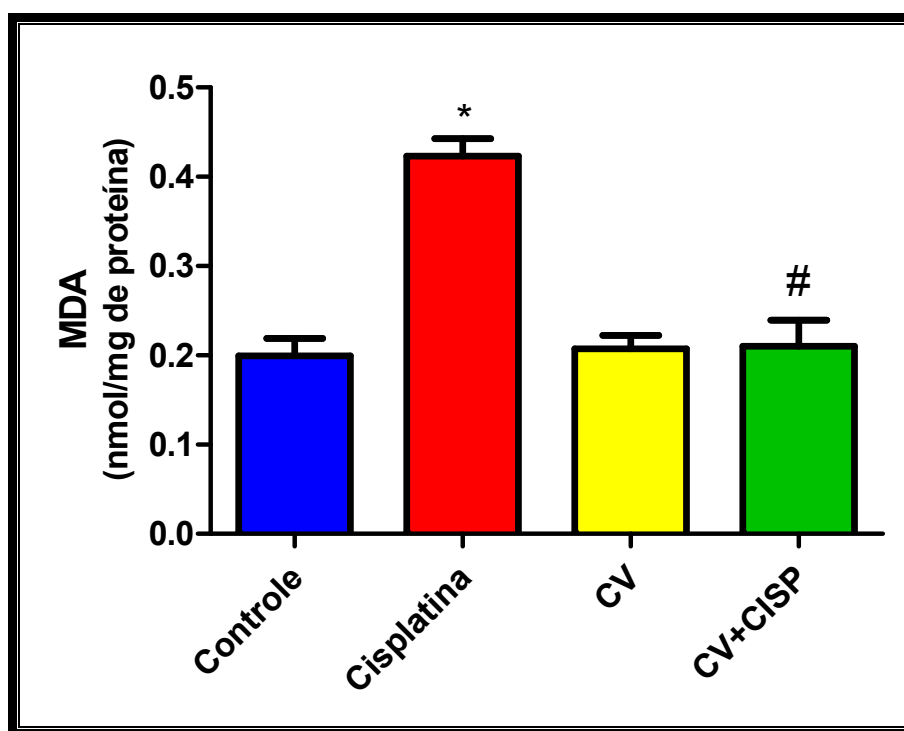


Figura 19: Níveis do marcador de lipoperoxidação, MDA, em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

Os níveis de proteína sulfidrílica do grupo CISP ($8,72 \pm 1,27$ nmols/mg de proteína) foram significativamente ($p < 0,05$) inferiores aos níveis do grupo controle ($12,34 \pm 1,25$ nmols/mg de proteína). O grupo CV/CISP, por sua vez, obteve médias ($11,29 \pm 1,76$ nmols/mg de proteína) significativamente maiores ($p < 0,05$) que o grupo CISP, como representado na Figura 20.

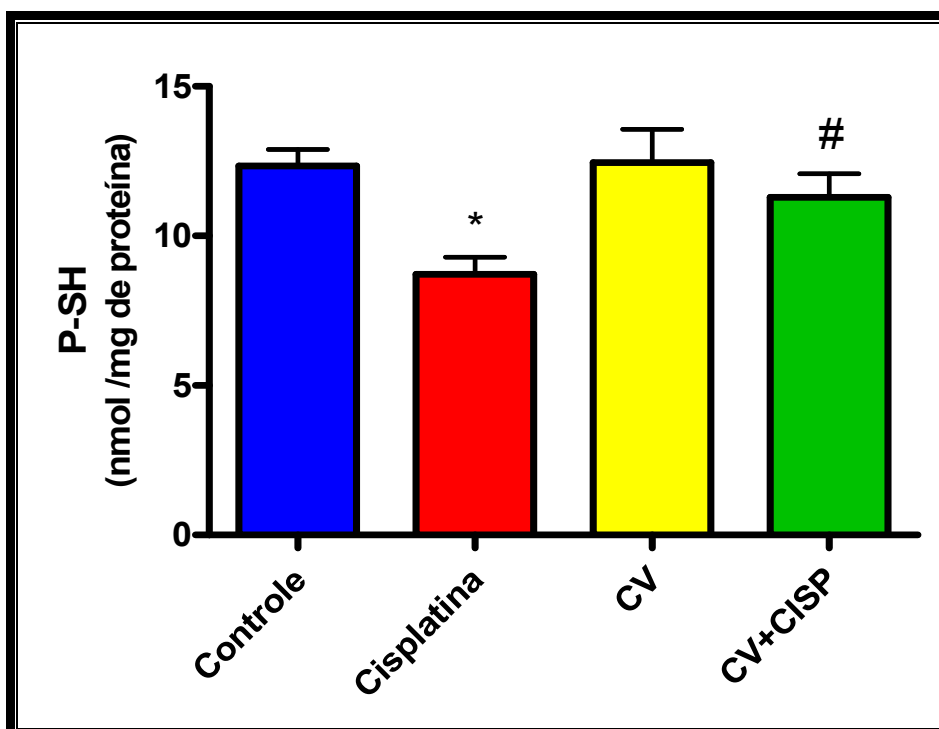


Figura 20: Níveis de proteínas sulfidrílicas (P-SH) em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

A cisplatina mostrou-se capaz de ativar a caspase 3, executora final da apoptose, aumentando em significativamente ($p < 0,05$) a quantidade de caspase 3 no grupo CISP ($241,43\% \pm 28,53$) em relação ao controle, considerado 100%. O grupo CV+CISP apresentou redução significativa da atividade da caspase executora ($121,79\% \pm 29,06$) em relação ao grupo CISP, com valores mais próximos aos do grupo controle (Figura 21).

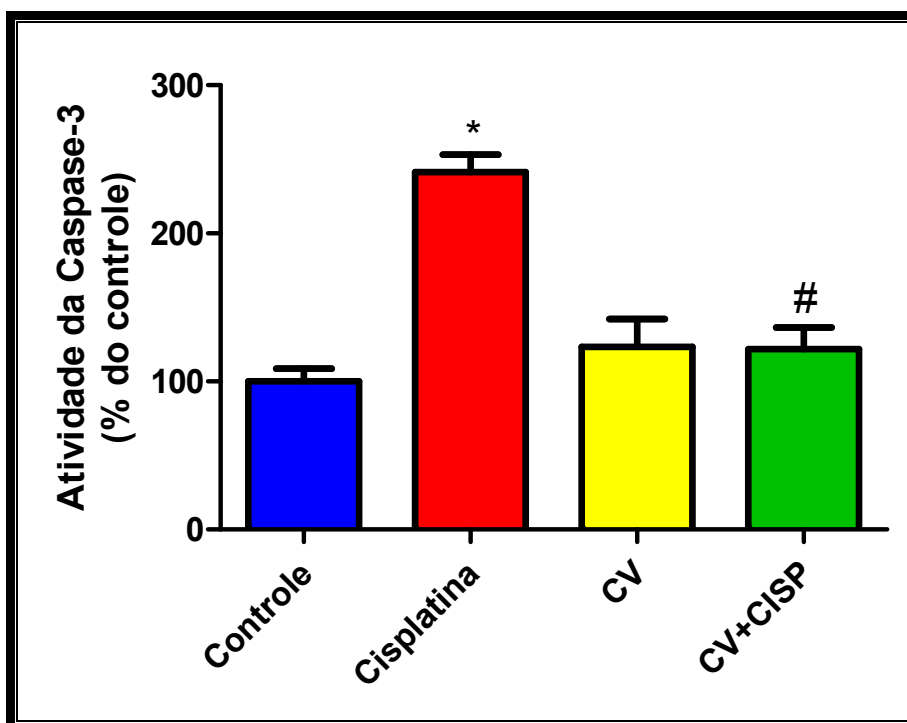


Figura 21: Atividade da caspase-3 em homogenato de córtex renal de ratos. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

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

A concentração de platina na suspensão mitocondrial é apresentada na Tabela 5. Foram encontradas concentrações elevadas de platina nos grupos tratados com o fármaco, porém não houve diferença significativa entre a concentração de platina no grupo CV/CISP ($1294,64 \pm 753,15$ ppb/mg de proteína) em relação ao grupo CISP ($1384,50 \pm 256,22$ ppb/mg de proteína). Os grupos controle e CV apresentaram concentrações mínimas de platina, $3,85 \pm 4,01$ ppb/mg de proteína e $1,38 \pm 0,45$ ppb/mg, respectivamente.

Tabela 5: Concentração de platina em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos.

Grupos	Platina (ppb/mg proteína)
Controle	3,85 ($\pm 4,01$)
Cisplatina	1384,50 ($\pm 256,22$) *
CV	1,38 ($\pm 0,45$)
CV/CISP	1294,64 ($\pm 753,15$) *

Os valores são expressos como média \pm desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

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

Discussão

V - DISCUSSÃO

A integridade funcional dos rins é de importância vital para a homeostase corpórea, pois os rins têm o papel principal na excreção de metabólitos, na regulação do volume de fluido extracelular, composição de eletrólitos e balanço ácido-básico. Além disso, os rins sintetizam e liberam hormônios e metabolizam a vitamina D. Efeitos tóxicos que atinjam os rins podem alterar algumas ou todas essas funções alterando profundamente o metabolismo geral (SCHNELLMANN, 2001).

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

macromoléculas próximas ao sítio onde foram gerados. Então, embora a biotransformação seja menor nos rins do que no fígado, as enzimas do citocromo P450 têm um papel importante na nefrotoxicidade pela proximidade do sítio de ação. Assim como em outros órgãos, a toxicidade é resultado do balanço entre a geração de metabólitos reativos e sua detoxificação (HODGSON; LEVI, 2004).

A cisplatina é um dos principais fármacos usados no tratamento de tumores sólidos, porém a nefrotoxicidade limita seu uso. Os rins, além de serem responsáveis por grande parte da excreção da cisplatina, também são seu sítio primário de acumulação. A cisplatina é responsável por vários efeitos, como falência renal aguda e crônica, perda de magnésio renal e poliúria. Pacientes em tratamento com cisplatina perdem de 10 a 30% da função renal (BONEGIO; LIEBERTHAL, 2005). Lesões tubulares intersticiais são as causas primárias da nefrotoxicidade da cisplatina, e lesões nos túbulos proximais, especificamente no segmento S3 da porção medular externa têm sido demonstradas em modelos animais. Uma das formas de diagnosticar a lesão renal causada pela cisplatina é através das alterações da concentração plasmática de creatinina. A excreção urinária de marcadores da lesão tubular, como β -2-microglobulina, N-acetil- β -D-glicosaminidase e α ₁glicoproteína ácida aumentam após o início do tratamento com a cisplatina. Um estudo recente em animais demonstrou a presença de glicose, aminoácidos e metabólitos do ciclo do ácido tricarboxílico na urina dois dias após a exposição à cisplatina (YAO et al., 2007).

No nosso estudo a insuficiência renal aguda ficou caracterizada pelas alterações significativas nas concentrações plasmáticas de uréia e creatinina encontradas nos animais tratados com cisplatina, possivelmente devido às lesões provocadas nas células dos túbulos renais. A lesão renal foi induzida experimentalmente utilizando-se uma dose relativamente alta da cisplatina (10 mg/Kg), mas comumente empregada na clínica, ou seja, aproximadamente 30 mg/m², considerando-se uma pessoa de 60 kg (AJITH; NIVITHA; USHA, 2007). As lesões tubulares são responsáveis pela diminuição do índice de filtração glomerular, com conseqüente acúmulo plasmático dos produtos gerados no metabolismo do nitrogênio, representados pelos níveis de nitrogênio não-protéico (nitrogênio uréico sanguíneo) e da creatinina, substância endógena resultante da degradação da creatina muscular e cuja produção e excreção estão primariamente relacionadas com a massa muscular (HENRY, 1995).

A concentração plasmática de creatinina é bastante estável, variando menos de 10% ao longo do dia em indivíduos normais. É filtrada nos glomérulos e não é reabsorvida nos túbulos (FIRST, 1996). Um aumento dos níveis de creatinina sérica reflete danos renais cumulativos irreversíveis (CIVITKOVIC, 1998). A creatinina sérica encontra-se aumentada sempre que a razão de filtração glomerular estiver baixa, devido à doença renal ou à obstrução pós-renal (HARTMANN, 1994).

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

As alterações plasmáticas de uréia e creatinina encontradas nos animais tratados com cisplatina nesse estudo são convergentes com os resultados obtidos por Nishikawa et al. (2001) e Sueishi et al. (2002). Segundo Kintzel (2001) uma redução na razão da filtração glomerular (GFR) de 20 a 40% é um achado freqüente em pacientes submetidos ao tratamento com cisplatina. Comparado ao grupo CISP, o grupo CV+CISP apresentou significativa redução nos níveis de uréia e creatinina plasmáticas, com médias dos resultados semelhantes às do grupo controle, o que mostra uma eficiente proteção contra a lesão renal. Gamal el-Din e Al-Bekairi (2006) testaram o efeito protetor do carvedilol na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos e obtiveram uma diminuição significativa dos níveis de uréia e creatinina plasmáticos no grupo protegido em relação ao grupo cisplatina, o que converge com nossos resultados. O grupo avaliou, ainda, o peso dos rins em relação à porcentagem de peso corpóreo dos ratos e, como resultado, obteve um aumento de 136% no grupo tratado com cisplatina em relação ao grupo controle e posterior redução de 40% no grupo protegido com carvedilol em relação ao grupo cisplatina. Neste mesmo estudo, alguns parâmetros de estresse oxidativo, como a peroxidação

lipídica foram avaliados em homogenato de tecido; porém não foram abordados os efeitos nas mitocôndrias renais, nosso objeto de estudo por tratar-se de um alvo importante e provavelmente precoce na lesão renal causada pela cisplatina.

Acredita-se que a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina seja acompanhada de alterações na função e na estrutura mitocondrial (GORDON; GATTONE, 1986). Brady et al. (1990) sugerem que o dano mitocondrial é o evento central na toxicidade da cisplatina no túbulo proximal renal.

Nossos resultados sugerem uma inibição do fluxo de elétrons da cadeia respiratória com conseqüente inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial. A razão ADP/O descreve a relação estequiométrica entre a fosforilação e a respiração e, sendo que os valores teóricos ideais para a razão ADP/O variam entre 2 e 3, o que está de acordo com os resultados obtidos no nosso grupo controle. Os estados clássicos da respiração mitocondrial são a respiração do estado 4 (basal, na presença de substrato) e a respiração do estado 3 (ativado com ADP). A relação entre as velocidades da respiração nos estados 3 e 4 é denominada RCR ou Razão de Controle Respiratório, que é um parâmetro relacionado à função mitocondrial e indica o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a síntese de ATP. Valores abaixo de 3 para a RCR indicam mitocôndrias desacopladas (CAIN; SKILLETER, 1987). Nosso estudo revelou diminuição significativa do consumo de O₂ no estado 3, da razão ADP/O e do RCR, no grupo tratado com a cisplatina, o que indica que o fármaco afetou a fosforilação oxidativa, sugerindo um efeito inibidor da cadeia transportadora de elétrons. Este efeito inibitório é caracterizado pela habilidade em interromper o fluxo de elétrons através da combinação com carreadores protéicos de elétrons dos complexos respiratórios e por prevenir a formação do par redox, o que se reflete no consumo de oxigênio no estado 3 da respiração (MORELAND, 1994). Por outro lado, o grupo CV+CISP apresentou um aumento significativo desses parâmetros em relação ao grupo CISP, demonstrando que parte da capacidade de fosforilação oxidativa foi preservada.

Estudos realizados por Kruidering et al. (1997) demonstraram que a cisplatina inibe os complexos de I a IV da cadeia respiratória em 15 a 55% após 20 minutos de incubação com 50 a 500 µM do fármaco, respectivamente. Iguchi et al. (2004) testaram o efeito protetor do antioxidante edaravone, um potente seqüestrador de radicais hidroxila e peroxila, na nefrotoxicidade renal induzida pela cisplatina em ratos. Os ratos foram sacrificados no primeiro e no quinto dia após a administração

da cisplatina, as mitocôndrias do córtex renal foram isoladas a fim de avaliar a respiração e, já no primeiro dia, foram observados decréscimos significativos no estado 3 da respiração mitocondrial, na RCR e na razão ADP/O, sendo que no quinto dia o decréscimo foi ainda maior. Em todos os testes o edaravone mostrou-se eficaz contra o efeito nefrotóxico da cisplatina.

Nossos estudos demonstraram redução no potencial de membrana mitocondrial causado pela cisplatina, confirmando resultados anteriores obtidos em nosso laboratório (Santos et al., 2007), sendo que essa redução foi marcadamente menor no grupo CV+CISP.

Um estudo recente de Melli et al. (2008) demonstrou que a cisplatina causa perda do potencial de membrana mitocondrial em células neuronais, bem como induz a formação de vacúolos autofágicos em neurônios; o grupo demonstrou, ainda, que o ácido alfa lipóico pode proteger a lesão neuronal causada pelo antineoplásico, em parte, devido ao seu efeito antioxidante.

A influência da cisplatina no potencial de membrana também foi testada por Jing et al. (2007) em células EC-109, provenientes do esôfago. A adição da cisplatina às células levou à inibição do crescimento celular de maneira dose e tempo-dependente. O fármaco levou à formação de ERO celulares, resultando em redução do potencial de membrana mitocondrial e apoptose. O colapso no potencial de membrana reflete, segundo os autores, a abertura de megacanaís mitocondriais (poros de transição de permeabilidade mitocondrial).

No presente estudo, além da diminuição do potencial de membrana, no grupo CISP também ocorreu diminuição na captação do cálcio, o que poderia estar relacionado a um comprometimento dos transportadores deste íon e/ou da integridade da membrana mitocondrial. Na realidade, ambos os eventos, diminuição do potencial de membrana e diminuição da captação de cálcio, estão relacionados à perda da integridade da membrana (SANTOS et al., 2007). O traçado do transporte de cálcio do grupo CV+CISP foi muito semelhante ao do grupo controle, mostrando que o efeito protetor foi satisfatório em relação a esse evento e, provavelmente, com relação à manutenção da integridade da membrana mitocondrial. O cálcio pode ser transportado para a matriz mitocondrial utilizando a energia do gradiente eletroquímico de prótons gerado na membrana interna da mitocôndria. O influxo ocorre em resposta ao potencial negativo existente no interior da membrana, enquanto o efluxo ocorre por troca com o H^+ do exterior ou com o sódio do citosol.

Entre outros fatores, a manutenção da baixa concentração citosólica de cálcio é o resultado do balanço entre influxo e efluxo do cátion na mitocôndria (VERCESI; REYENAFARJE; LEHNINGER, 1978).

Gemba et al. (1987) verificaram os primeiros efeitos da cisplatina na captação do cálcio de mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos e seus resultados já sugeriam a inibição da captação de cátions divalentes como cálcio e magnésio, contribuindo para a nefrotoxicidade da cisplatina. Posteriormente, pesquisadores do mesmo grupo (KAMEYAMA; GEMBA, 1991) incubaram células do córtex renal de ratos com cisplatina e concluíram que a diminuição da captação de cálcio estava relacionada à depleção da glutatona mitocondrial, e esta, por sua vez, estava ligada à diminuição da glutatona citoplasmática.

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

A diminuição da captação de cálcio pode levar ao aumento dos níveis citosólicos e à quebra da homeostase intracelular do cálcio, mecanismo relacionado à Transição da Permeabilidade Mitocondrial (TPM) (SANTOS et al., 2007).

A TPM é regulada por uma série de moduladores, dentre eles o potencial de membrana, o Ca^{2+} , o pH e o estado redox mitocondrial, através de um mecanismo sensível à voltagem. Uma hipótese para o mecanismo envolvido na TPM é que o fenômeno depende da diminuição do potencial de membrana mitocondrial, cujo valor limite é aumentado por alterações nos grupos sulfidríla (BERNARDI et al., 2001).

Baseados em evidências de que a TPM é estimulada pela oxidação do tiol e pela depleção do NADPH mitocondrial, Kowaltowski, Castilho e Vercesi (2001) testaram a hipótese de que a TPM era causada pelo estresse oxidativo. O grupo observou que uma ampla quantidade de antioxidantes protege contra a TPM. O fato de que a catalase e as tiol peroxidases têm esse efeito protetor indica que a TPM pode ser diretamente induzida por ERO e depende da presença de H_2O_2 . O H_2O_2 mitocondrial deriva do ânion superóxido e é convertido à radical hidroxila via reação de Fenton, antes de promover a TPM (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001). A TPM está envolvida no controle da morte celular causada pela abertura do

poro, que permite o equilíbrio de solutos com peso de até 1,5 kDa entre o citosol e a matriz, resultando em um aumento do volume da matriz mitocondrial e facilitando a liberação de mediadores apoptóticos da mitocôndria (KAASIK et al., 2007). Dependendo da habilidade da célula em gerar ATP extramitocondrial (glicólise), a TPM pode levar à apoptose ou à necrose. Várias condições podem aumentar a probabilidade de indução da TPM pelo acúmulo de cálcio na matriz, incluindo o aumento de ERO, de fosfato inorgânico e de ácidos graxos livres (KINSEY et al., 2007).

A regulação das interações entre o retículo endoplasmático e a mitocôndria no controle do cálcio intracelular livre é importante no controle de muitas funções celulares, especialmente aquelas envolvidas na morte celular (BOWSER et al., 2002). O mecanismo pelo qual o cálcio liberado pela mitocôndria, eventualmente, não é captado pelo retículo endoplasmático, não é exatamente conhecido. Um dos mecanismos propostos para explicar a quebra da homeostase intracelular do cálcio sugere que a ativação da TPM, está relacionada à ativação de fatores indutores da apoptose, o que funcionaria como um gatilho para a ativação das caspases e a iniciação do processo apoptótico (KANNAN; JAIN, 2000; BOWSER et al., 2002). O aumento da TPM está associado à liberação do Fator Indutor de Apoptose (FIA), o qual foi identificado e caracterizado como uma proteína de aproximadamente 50 kDa, localizado na membrana mitocondrial interna (KANNAN; JAIN, 2000). A perturbação da homeostase celular do cálcio é um importante mecanismo envolvido nas alterações do metabolismo celular e, em alguns casos, no mecanismo de citotoxicidade que conduz à apoptose. O cálcio intramitocondrial pode ser alterado quando há colapso do potencial de membrana mitocondrial, levando à disfunção da mitocôndria e conseqüente ao estresse oxidativo (McCONKEY; ORRENUIS, 1997; BOWSER, 2002).

O estado redox do NADPH é um dos parâmetros implicados nas respostas mitocondriais envolvendo liberação do cálcio acumulado na matriz mitocondrial e TPM. Outros mecanismos dependentes de NADPH são a regulação de proteínas tiólicas e a regulação dos níveis de glutathiona mitocondriais, os quais são mantidos por glutathionas redutases dependentes do NADPH. A oxidação do NADPH induz, junto com outros fatores, a TPM, o que pode culminar em apoptose (MINGATTO et al., 2000; RYDSTROM, 2006). El Daly (1996) testou várias enzimas hepáticas e renais a fim de verificar a lesão causada pela cisplatina em ratos e o provável efeito

protetor da cisteína e da vitamina E, provenientes do extrato de duas plantas. O estudo revelou que, em resposta às baixas concentrações de proteínas com grupamentos sulfidrílicos (P-SH) causadas pela cisplatina, houve aumento da atividade sérica das enzimas NADP-isocítrica desidrogenase e glutathione redutase, além do aumento significativo da glicose-6-fosfato desidrogenase renal. Tais alterações ocorreriam como processos compensatórios para neutralizar os efeitos da cisplatina, através da geração de NADPH e a manutenção dos grupos sulfidrílicos reduzidos.

Nossos experimentos mostraram uma oxidação significativa do NADPH mitocondrial no grupo CISP, o que não ocorreu no grupo CV+CISP, sugerindo uma proteção eficaz contra o estresse oxidativo neste segundo grupo. O conjunto de alterações observadas em nossos experimentos com cisplatina, como perda do potencial de membrana, quebra da homeostase celular do cálcio e oxidação do NADPH, estão diretamente relacionados e nos permitem especular a participação da TPM na indução da morte celular pela cisplatina.

Além do par redox NADPH/NADP⁺, outro importante sistema antioxidante mitocondrial é o ciclo redox da glutathione. A glutathione é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, e constitui a “não-proteína” sulfidrílica predominante nas células eucarióticas e em algumas procarióticas (WEIJL, CLETON, OSANTO, 1997). A glutathione e o NADPH são conhecidos por proteger a mitocôndria do estresse oxidativo, inibindo a lesão mediada por radicais livres através da sua capacidade de eliminar do peróxido de hidrogênio e manter o ambiente celular reduzido nas condições fisiológicas normais (SOMANI, et al., 2000; TURRENS, 2003). A glutathione reduzida (GSH) pode ser oxidada pela ação da glutathione peroxidase, formando glutathione dissulfeto (GSSG) a qual é tóxica para a célula pela formação de derivados cisteinil, especialmente na presença de metais de transição (JENNER, 1994). A GSSG pode retornar à forma reduzida (GSH), por uma reação catalisada pela enzima glutathione redutase, na presença de NADPH; entretanto, para que esse ciclo de reações ocorra, culminando na redução de peróxidos lipídicos e H_2O_2 à H_2O e mantenha a capacidade antioxidante, é necessário que haja uma eficiente função bioenergética mitocondrial (SHAN; AW; JONES, 1990; STOWE; CAMARA, 2009). Assim, as concentrações de NADPH e GSH presentes na mitocôndria estão intimamente relacionadas, o que está em linha com nossos

resultados que demonstram depleção por oxidação das duas moléculas no grupo CISP.

A depleção da glutatona é um dos passos iniciais e determinantes no mecanismo mitocondrial de estresse oxidativo. Os eventos que envolvem a citotoxicidade induzida pela cisplatina ocorrem após a depleção da GSH e a lipoperoxidação lipídica (ZHANG; LINDUP, 1994).

Hamers, et al. (1993) testaram a capacidade da glutatona em diminuir a neurotoxicidade em ratos tratados com cisplatina. Doses variáveis de glutatona (200 a 500 mg/kg) foram injetadas intravenosamente em ratos tratados com 1 e 2 mg/kg de cisplatina (i.p.) e após 5 semanas de tratamento, seguidas de 5 semanas de recuperação, os animais apresentaram uma redução significativa no desenvolvimento de neuropatia, a qual foi avaliada pela velocidade de condução no nervo sensor. Nossos experimentos mostraram que a redução da glutatona mitocondrial acompanhou depleção de outros indicadores, como o NADPH e proteínas sulfidríla, bem como o aumento de MDA (lipoperoxidação) no grupo CISP. Por outro lado, ficou evidente no grupo CV+CISP a capacidade protetora do carvedilol contra essas alterações. Sargazi, Shenkin e Roberts (2006) também descreveram diminuição da glutatona, aumento da produção de MDA e diminuição da atividade da glutatona peroxidase em células tubulares renais tratadas com 100 μ M de cisplatina. Um estudo *in vivo* de Dilliogluligil et al. (2005) relatou a diminuição da concentração de GSH e da enzima superóxido dismutase em ratos tratados com 5 mg/kg de cisplatina, além do aumento de MDA e óxido nítrico, eventos que foram protegidos pelo tratamento concomitante com as vitaminas A e E, devido às suas propriedades antioxidantes.

Os grupamentos-SH tanto de proteínas como de “não-proteínas” (principalmente GSH) estão envolvidos na manutenção de várias funções celulares, incluindo algumas atividades enzimáticas, como a atividade das ATPases, que desempenham importante papel na transição da permeabilidade mitocondrial (TPM). Esses grupos também exercem papel importante na manutenção da estrutura da membrana plasmática e participam de processos de transporte ativo, como nos transportadores sódio glicose-dependente. A depleção das proteínas-SH normalmente ocorre por sua oxidação, formando proteínas dissulfeto e dissulfidos (LEVI, et al., 1980; POTDEVIN, et al., 1988; ZHANG; LINDUP, 1994).

Em 1980, Levi e colaboradores testaram a influência dos grupamentos sulfidríla no mecanismo de nefrotoxicidade da cisplatina em ratos. Após 120 horas do tratamento dos animais com 6mg/kg de cisplatina, as proteínas-SH diminuíram 14% em relação ao grupo controle. Essa diminuição foi mais pronunciada nas frações mitocondrial e citosólica das células, onde também foram encontradas as maiores concentrações de platina. Os estudos *in vitro*, entretanto, mostraram que a cisplatina não interagia diretamente com os grupos -SH, o que levou os autores a sugerir a possibilidade de algum metabólito do fármaco ser o responsável pela oxidação desses grupamentos.

Atualmente sabe-se que uma das vias causadoras da nefrotoxicidade da cisplatina é a formação de ERO e que os grupamentos sulfidríla são muito sensíveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio. Além disso, a modificação na estrutura dessas proteínas pelo estresse oxidativo geralmente é acompanhada do enfraquecimento de várias funções mitocondriais e da quebra da homeostase intracelular do cálcio (ZHANG; LINDUP, 1994).

Nossos resultados mostraram a diminuição significativa da concentração de proteínas sulfidríla em mitocôndrias isoladas do córtex renal de ratos tratados com a cisplatina e a capacidade protetora do carvedilol em relação à oxidação desses grupamentos. Além da diminuição das proteínas sulfidríla, Zhang e Lindup (1994) observaram também a diminuição da captação de cálcio, do potencial de membrana mitocondrial e da glutatona (GSH) após a incubação de fatias de rins de ratos com 2 mM de cisplatina; resultados compatíveis com os obtidos em nossos estudos.

A peroxidação lipídica é um mecanismo de morte celular utilizado como marcador de estresse oxidativo. Peróxidos lipídicos derivados de ácidos graxos poliinsaturados são instáveis e se decompõem formando uma série de compostos complexos, que incluem compostos carbonil reativos, dentre eles o MDA (malondialdeído). Esses compostos eletrofílicos estáveis são capazes de se difundir através das células causando danos aos seus componentes e interferindo em suas funções. Os aldeídos são potentes inibidores enzimáticos, pois podem se ligar aos grupos nucleofílicos de alguns aminoácidos (tirosina, cisteína, serina, lisina, histidina), componentes críticos dos sítios ativos enzimáticos e necessários para a manutenção da estrutura terciária das enzimas (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991).

O MDA pode se combinar com vários grupos funcionais de moléculas, incluindo proteínas, lipoproteínas, DNA e RNA e sua monitoração em amostras biológicas pode ser usada como importante indicador da peroxidação lipídica *in vitro* e *in vivo* para diversas doenças (SEVILLA et al., 1997).

Vários estudos têm demonstrado que as ERO podem produzir dano celular por atacar as membranas mediante a peroxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, que por sua vez podem alterar a estrutura de membrana, a função mitocondrial, a função lisossomal e a membrana celular. Um estudo recente demonstrou que o uso de ácido ascórbico, um potente antioxidante amplamente utilizado, injetado por via intraperitoneal na concentração de 250mg/kg em ratos que sofreram isquemia/reperfusão foi capaz de impedir a peroxidação lipídica. O grupo que sofreu stress oxidativo devido à isquemia/reperfusão apresentou concentração de MDA em torno de 97,9 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, enquanto o grupo protegido com ácido ascórbico apresentou uma concentração de apenas 35,1 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, muito semelhante ao grupo controle (34,4 $\mu\text{mol/mg}$ de proteínas). Além de reduzir a peroxidação lipídica o ácido ascórbico também foi capaz de impedir significativamente a depleção da GSH e reduziu a lesão renal (KORKMAZ, KOLANKAYA, 2009). Similarmente, em nossos estudos, a capacidade antioxidante do carvedilol foi capaz de proteger as mitocôndrias renais da peroxidação lipídica causada pela cisplatina.

Também observamos decréscimo nos níveis de cardiolipina no grupo CISP, o que provavelmente ocorre devido ao ataque oxidativo a esse lipídeo mitocondrial; enquanto no grupo CV+CISP, o decréscimo nos níveis de cardiolipina foi consideravelmente menor, sugerindo diminuição da formação das ERO pelo efeito do antioxidante. Petrosillo, Ruggiero e Paradies (2003) demonstraram que a produção de ERO pelas mitocôndrias afeta a atividade dos complexos I, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial através do dano oxidativo à cardiolipina, cuja função, dentre outras, é manter coesa a cadeia transportadora de elétrons (ZHANG; MILEYKOVSKAYA; DOWHAN, 2002).

Localizada quase exclusivamente na membrana mitocondrial interna, a cardiolipina é um fosfolípido de estrutura incomum, sendo particularmente rica em ácidos graxos insaturados, particularmente ácido linoléico (mais de 80%), o qual é altamente vulnerável ao dano oxidativo. Assim, as moléculas de cardiolipina são alvos comuns e iniciais do ataque dos radicais livres, tanto devido ao seu alto

conteúdo de ácidos graxos insaturados, quanto pela sua localização na membrana mitocondrial interna, próximo ao local da formação das ERO, principalmente formadas nos complexos I e III da cadeia respiratória (PETROSILLO et al., 2008).

Devido às suas peculiaridades, a cardiolipina tem se mostrado como um importante fator na regulação de muitos processos da bioenergética mitocondrial, incluindo transporte de elétrons, união dos supercomplexos da cadeia transportadora de elétrons na membrana interna, transporte de ânions, síntese de ATP e ligação do citocromo c (PETROSILLO et al., 2008). O citocromo c é estabilizado ao ligar-se na cardiolipina, a qual funciona como âncora, mantendo a proteína funcional na cadeia respiratória. A peroxidação da cardiolipina pode reduzir sua ligação ao citocromo c, resultando na liberação desta proteína, que atua como fator pró apoptótico, levando à morte celular por apoptose (SHIDOJI et al., 1999).

A toxicidade da cisplatina tem sido associada a dois tipos de morte celular, a apoptose e a necrose, dependendo da concentração e do tempo de exposição ao fármaco. A necrose é um tipo de morte celular independente de ATP, caracterizada por intumescimento na célula e em suas organelas e lise celular. A apoptose é um tipo de morte celular programada, dependente de energia caracterizada por redução do volume celular, condensação da cromatina, invaginação da membrana plasmática, exteriorização da fosfatidilserina e ativação de uma família de cisteíno-proteases denominadas caspases (CUMMINGS; SCHNELLMANN, 2002).

Estudos propõem a apoptose como principal mecanismo de morte celular associada à nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, em que a cisplatina recruta a via mitocondrial apoptótica mediada por Bax, ativando as caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 2) a caspase executora -3 (KAUSHAL, et al., 2001; WEI, et al., 2007). Foi demonstrado que as células epiteliais dos túbulos renais transcrevem e expressam múltiplas caspases, inclusive as iniciadoras e executoras (KAUSHAL, SINGH, SHAH, 1998), o que facilita a ocorrência da apoptose nesse tecido.

No início da indução da apoptose pode ser observada a perda do potencial de membrana mitocondrial, considerado um ponto irreversível (JEONG; SEOL, 2008), associado à liberação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, e à subsequente ativação das caspases-9 e -3. Membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 podem prevenir esses eventos, enquanto membros pro-apoptóticos da mesma família podem ativá-lo. A produção de ERO possui um papel importante na morte celular, regulando o processo que envolve a sinalização da apoptose. Há um

crescente consenso entre pesquisadores que o estresse oxidativo e o estado redox têm um papel central na regulação da apoptose (YOUN et al., 2008).

A liberação do citocromo c durante a abertura do poro não atua apenas como estímulo pró-apoptótico, mas também pode, em uma fase inicial, seqüestrar elétrons livres liberados para fora da matriz pelo complexo IV, reduzindo a geração de $O^{\cdot -}$ inicial. A caspase 3, entretanto, uma vez ativada pode alterar o transporte de elétrons na cadeia respiratória nos complexos I e III, induzindo a geração do ânion superóxido, formando um ciclo que leva ao colapso no potencial de membrana e inicia apoptose (RICCI; GOTTLIEB; GREEN, 2003).

Nossos resultados mostraram um aumento significativo da atividade da caspase-3 nos ratos tratados com cisplatina, indicando que a via apoptótica de morte celular foi ativada. O tratamento com carvedilol inibiu a ativação da caspase executora-3 pela cisplatina, o que provavelmente preveniu a morte celular por apoptose, explicando a menor extensão dos danos renais no grupo CV+CISP.

Wang et al. (2006) avaliaram as vias apoptóticas envolvidas na morte de células Jurkat tratadas com cisplatina. A via intrínseca (mitocondrial) foi inibida com a utilização do inibidor específico da caspase-9 (zLEHD-FMK), o que bloqueou a apoptose, sugerindo a importância da via mitocondrial na apoptose induzida pela cisplatina. Um estudo de Bian et al. (2003) teve como objetivo determinar as vias apoptóticas envolvidas na resposta aos tratamentos com doxorubicina e cisplatina em células tumorais tipo-S (provenientes de neuroblastoma). Seus resultados indicaram que a ativação da caspase-9 é necessária no mecanismo apoptótico tanto para a doxorubicina quanto para a cisplatina, e que em células tratadas com essas drogas a caspase-8 não foi ativada, já que o bloqueio da sua função não interferiu na morte celular. Nossos estudos *in vivo* estão em linha com esses achados *in vitro*.

A habilidade para medir e quantificar a exposição à platina em matrizes biológicas é um pré-requisito para entender a farmacocinética dos agentes antitumorais que possuem a platina em sua molécula (BROUWERS et al., 2006).

Atualmente sabe-se que a porção de cisplatina não ligada às proteínas plasmáticas (5 a 40%) entra nas células através de transportadores e, no núcleo, se ligam ao DNA. São os adutos de Pt-DNA formados que afetam a replicação e a transcrição do DNA, inibindo o crescimento dos tumores (BROUWERS et al., 2006).

Estebán-Fernandez et al. (2008) avaliaram a acumulação e o fracionamento da platina proveniente de três fármacos (carboplatina, cisplatina e oxaliplatina) em

ratos. A carboplatina, apesar de apresentar o menor potencial nefrotóxico, causou o maior acúmulo de platina nos rins, o que indica que a deposição de platina nos rins não é fator determinante para o desenvolvimento da nefrotoxicidade nesta classe de fármacos. Com relação à distribuição celular da platina nos rins, a cisplatina foi o fármaco que apresentou maiores valores para as concentrações nuclear e mitocondrial de platina.

Brouwers et al. (2008) testaram *in vivo* a capacidade citoprotetora do tiosulfato de sódio, da glutatona e a da acetilcisteína, compostos que possuem grupamentos –SH em suas moléculas e são capazes de proteger alguns tecidos (rins, por exemplo) da toxicidade induzida pela cisplatina. Os autores verificaram que o uso concomitante desses compostos com a cisplatina diminuiu também a ligação da platina ao DNA em células mononucleares do sangue periférico, o que sugere que esses compostos podem afetar a atividade antitumoral do fármaco. Diferentemente, em nossos experimentos, demonstramos que o carvedilol não interferiu na chegada da cisplatina nas mitocôndrias renais, uma vez que a concentração de platina foi semelhante nos grupos CV+CISP e CISP. Tal achado sugere que o carvedilol protege contra a nefrotoxicidade da cisplatina por um mecanismo que não envolve a formação de complexos inativos com a cisplatina, o que impediria seu acesso aos tecidos, incluindo o tecido tumoral, e diminuiria seu efeito antitumor. Resultados semelhantes foram observados por Appenroth et al. (1997), com relação às vitaminas C e E.

Nossos estudos têm demonstrado a participação da mitocôndria nas alterações induzidas pela cisplatina e nos permite relacioná-las ao surgimento da falência renal em ratos, demonstrando o envolvimento das espécies reativas de oxigênio, bem como a efetividade da ação protetora do carvedilol, provavelmente devido ao seu efeito seqüestrador de radicais livres e de íon ferro. O tratamento com antioxidantes a fim de prevenir os efeitos tóxicos da cisplatina vem sendo amplamente explorado; estudos com amifostina, superóxido dismutase, ebselem, ácido 2,3-dimercaptosuccínico, vitaminas E e C mostraram-se efetivos (SUEISHI et al., 2002). Segundo Appenroth et al. (1997), as vitaminas C e E apresentam efeito protetor sem contudo alterar a concentração de platina no córtex renal. Tsuruya et al. (2003) também demonstraram que a concentração de platina em células epiteliais renais tubulares e em rins de animais tratados com cisplatina e DMTU manteve-se inalterada, sugerindo que o efeito antioxidante do DMTU preveniu os efeitos tóxicos

da cisplatina sem contudo impedir sua chegada ao sítio de ação. Li e colaboradores (2002) testaram não só o efeito protetor do salicilato, que entre outras atividades, atua como seqüestrador de radicais livres, na toxicidade induzida pela cisplatina, como também sua interferência na ação do quimioterápico. Os autores incubaram células tumorais MTLn3, provenientes de câncer de mama, da seguinte forma: I - controle (sem tratamento), grupo II - tratado com cisplatina, grupo III - tratado apenas com salicilato, e grupo IV - tratado com salicilato e cisplatina, e observaram a ocorrência de metástase apenas nos grupos I e III, indicando que o tratamento com salicilato simultaneamente com a cisplatina não interferiu na atividade antineoplásica do quimioterápico.

Há algum tempo o nosso grupo tem trabalhado com o quimioterápico cisplatina. Em um estudo recente, realizado *in vivo*, nós demonstramos o envolvimento do dano oxidativo mitocondrial na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos, delineando vários processos mitocondriais envolvidos nesse evento (SANTOS et al., 2007). Posteriormente, em outro estudo, também *in vivo*, utilizamos um seqüestrador de radicais hidroxila (DMTU) como droga antioxidante modelo e demonstramos o papel central da prevenção do dano oxidativo mitocondrial na proteção contra a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos (SANTOS et al., 2008).

A amifostina é o único agente citoprotetor aprovado pelo FDA para o uso em pacientes em tratamento com a cisplatina com o objetivo de diminuir a nefrotoxicidade. Sua atuação se dá através da doação de grupos tióis protetores, que são seletivos para células normais em detrimento das tumorais. No entanto, seu uso é limitado pelos efeitos adversos, custo elevado e, principalmente porque a possibilidade da amifostina interferir com a atividade antitumoral da cisplatina ainda não foi completamente descartada (YAO, et al. 2007). Sastry e Kellie (2005) relataram que a combinação desses dois fármacos em uma paciente com carcinoma celular de ovário resultou no agravamento da toxicidade da cisplatina.

O carvedilol tem mostrado atividade protetora na toxicidade cardíaca induzida pela doxorrubicina (OLIVEIRA et al., 2004; SPALLAROSSA et al., 2004; ARMSTRONG et al., 2004) e, segundo nossos estudos, também parece proteger contra a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos. Em estudo comparativo com o atenolol, outro beta bloqueador, confirmou-se que o efeito cardioprotetor do carvedilol contra a toxicidade mitocondrial cardíaca causada pela doxorrubicina, se

deve ao seu efeito antioxidante e não ao antagonismo do receptor beta adrenérgico (OLIVEIRA et al., 2004).

Diversos estudos recentes têm explorado a capacidade protetora do carvedilol em vários tecidos, células e órgãos expostos ao estresse oxidativo. Kumar e Dogra (2009) verificaram a proteção contra a neurodegeneração causada pelo estresse oxidativo induzido pela colchicina em ratos. Células HL-60 (provenientes de leucemia humana) tiveram sua produção de ERO diminuída pelo tratamento com carvedilol; o estudo comprovou a potente atividade protetora do carvedilol contra o radical peróxido, porém o seqüestro de óxido nítrico não foi verificado (Lojek et al., 2008).

Alguns estudos relataram o uso do captopril (fármaco usado como anti-hipertensivo devido à sua capacidade de inibir a enzima conversora de angiotensina - ECA) como protetor da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos e em humanos. Em estudos iniciais o uso do fármaco foi efetivo na diminuição do fluxo de plasma renal, no entanto não foi capaz de prevenir o decréscimo na taxa de filtração glomerular em ratos (OFFERMAN, et al., 1985a; OFFERMAN, et al., 1985b). Estudos mais recentes utilizando o captopril mostraram que o fármaco foi capaz de prevenir a lesão renal induzida pela cisplatina em ratos, além de impedir o aumento do MDA, a depleção da glutatona e a geração de óxido nítrico no tecido renal. A ação antioxidante do captopril parece estar relacionada à presença de grupamentos sulfidrílicos em sua molécula (EL-SAYED; ABD-ELLAH; ATTIA, 2008).

Em transplantes renais a lesão causada por isquemia e reperfusão está relacionada à produção de espécies reativas de oxigênio. Experimentos realizados com ratos que fizeram uso do carvedilol antes e após a isquemia/reperfusão mostraram diminuição da lesão renal através da diminuição da creatinina sérica e aumento da atividade da superóxido dismutase (HAYASHI, 2008). O carvedilol também se mostrou capaz de diminuir a lesão renal causada pela gentamicina (KUMAR et al., 2000). A gentamicina é um antibiótico efetivo contra infecções causadas por gram negativos, porém seu uso é limitado pela nefrotoxicidade, que envolve mecanismos de danos renais causados por radicais livres. Ratos tratados com 2 mg/kg de carvedilol 3 dias antes e nos 8 dias consecutivos à administração de 80 mg/kg de gentamicina, tiveram redução significativa de creatinina e uréia plasmática, além da diminuição da lipoperoxidação lipídica e melhora na condição renal, verificada mediante estudos fisiopatológicos.

Nossos estudos estão em linha com estes achados recentes e fornecem dados que indicam que o carvedilol é um potente agente protetor contra a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina. Por tratar-se de um fármaco já utilizado na clínica e, portanto, seguro, as perspectivas da sua utilização futura como protetor renal durante a quimioterapia com a cisplatina são bastante promissoras.

Conclusões

VI – CONCLUSÕES

1. Nossos estudos confirmaram o importante papel das mitocôndrias e das espécies reativas de oxigênio na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos.

2. O carvedilol apresentou um significativo efeito protetor contra a nefrotoxicidade mitocondrial induzida pela cisplatina, como demonstrado pelos ensaios de função renal (uréia e creatinina plasmáticas), função mitocondrial (respiração mitocondrial, potencial de membrana e captação de cálcio), estudos envolvendo estresse oxidativo (oxidação do NADPH, das proteínas sulfidril, da GSH, lipoperoxidação e cardiolipina) e apoptose (caspase-3), além de não influenciar a concentração de platina no tecido renal (dosagem de platina).

3. O efeito protetor do carvedilol provavelmente deve-se à sua capacidade de seqüestrar radicais livres e íons ferro, estes últimos envolvidos na reação de Fenton e Haber-Weiss, responsáveis pela produção de radicais hidroxil, altamente reativos.

4. Nossos resultados mostraram-se convergentes e em linha com outros estudos com antioxidantes anteriormente publicados.

Referências

REFERÊNCIAS*

- ◆ ABREU, R.M.V.; SANTOS, D.J.S.L.; MORENO, A.J.M. Effects of carvedilol and its analog BM-910228 on mitochondrial function and oxidative stress. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** Bethesda, v. 295, n. 3, p. 1022-30, 2000.

- ◆ 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.**, Oxford, v. 45, p. 921-927, 2007.

- ◆ APPENROTH, D.; FROB, S.; KERSTEN, L.; SPLINTER, F. -K.; WINNEFELD, K. Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v. 71, p. 677-683, 1997.

- ◆ ARMSTRONG SC. Anti-oxidants and apoptosis: attenuation of doxorubicin induced cardiomyopathy by carvedilol. **J. Mol. Cell Cardiol.**, London, v. 37. n. 4, p. 817-21. 2004.

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

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

- ◆ 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.

- ◆ BERNARDI, P.; PETRONILLI, V.; DI LISA, F.; FORTE, M. A mitochondrial perspective on cell death. **Trends Biochem. Sci.**, Tarrytown, v. 19, p. 77-101, 2001.

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

- ◆ 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.

- ◆ BIAN, X.; GIORDANO, T. D.; LIN, H. J.; SOLOMON, G.; OPIPARI, A. W. Jr. Chemoetrapy-induced apoptosis of S-type neuroblastoma cells requires caspase-9 and is augmented by CD95/Fas stimulation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 279, n. 6, p. 4663-9, 2003.

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

- ◆ BOLLETER, W. T.; BUSHMAN, C. J.; TIDWELL, P. W. Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. **Anal. Chem.**, Washington, v. 33, n. 4, p. 592-4 1961;

- ◆ BONEGIO, R.; LIEBERTHAL, W. Cisplatin-induced nephrotoxicity, in Tarloff JB, Lash LH (eds.): **Toxicol. Kidney**, 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2005, pp. 779–815.

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

- ◆ BORLE, A., B. An Overview of Techniques for the Measurement of Calcium Distribution, Calcium Fluxes, and Cytosolic Free Calcium in Mammalian Cells. **Environ. Health Perspect.**, Pittsburg, v. 84, p. 45-56, 1990.

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

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

- ◆ BRADY, H. R.; KONE, B. C.; STROMSKI, M. E.; ZEIDEL, M. L.; GIEBISCH, G.; GULLANS, S. R. Mitochondrial injury: an early event in cisplatin toxicity to renal proximal tubules. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, Bethesda, v. 258, p. 1181-1187, 1990.

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

- ◆ BROUWERS, E. E.; TIBBEN, M. M.; ROSING, H.; HILLEBRAND, M. J.; JOERGER, M.; SCHELLENS, J. H.; BEIJEN, J. H. Sensitive inductively coupled plasma mass spectrometry assay for the determination of platinum originating from cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in human plasma ultrafiltrate. **J. Mass Spectrom.**, Chichester, v. 41, n. 9, p. 1186-94, 2006.

- ◆ BROUWERS, E. E. M.; HUITEMA, A. D. R.; SCHELLENS, J. H. M.; BEIJEN, J. H. The effects of sulfur-containing compounds and gemtubicine on the binding of cisplatin to plasma proteins and DNA determined by inductively coupled plasma mass spectrometry and high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. **Anticancer Drugs.**, London, v. 19, p. 621-30, 2008.

- ◆ 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.

- ◆ CARREIRA, R. S.; MONTEIRO, P.; GON ALVES, L. M.; PROVIDÊNCIA, L. A. Carvedilol: just another Beta-blocker or a powerful cardioprotector? **Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets**, Amsterdam, v. 6, n. 4p. 257-66, 2006.

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

- ◆ CIARIMBOLI, G.; LUDWIG, T.; LANG, D.; PAVENSTADT, H.; KOEPEL, H.; PIECHOTA, H.J.; HAIER, J.; JAEHDE, U.; ZISOWSKY, J.; SCHLATTER, E. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. **Am. J. Pathol.** Munster, v. 167, n. 6, p. 1477-84, 2005.

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

- ◆ CHEN, L., B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Ann. Rev. Cell Biol.**, Boston, v. 4, p. 155-81, 1988.

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

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

- ◆ CORNELISON, T. L.; REED, E. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin and ormaplatin. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 50, p. 147-58, 1993.

- ◆ CROCE, A., C.; SIMONE, U.; VAIRETTI, M.; FERRIGNO, A.; BOTTIROLI, G. Autofluorescence properties of rat liver under hypermetabolic conditions. **Photochem. Photobiol. Sci.**, Cambridge, v. 6, p. 1202–1209, 2007.

- ◆ CULLEN, K.J.; YANG, Z.; SCHUMAKER, L.; GUO, Z. Mitochondria as a target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. **J. Bioenerg. Biomembr.**, Baltimore, v. 39, n. 1, p. 43-50, 2007.

- ◆ CUMMINGS, B. S.; SCHNELLMANN, R. G. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: Caspase 3 –dependent and independent pathways. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 302, n. 1, p. 8-17, 2002.

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

- ◆ DANDONA P, BURKAHARDT, G.; KOHLER DP. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. **J. Hypertens.**, London, v. 25, n.4, p. 731-41, 2007.

- ◆ DAUGAARD, G.; ABILDGAARD, U.; HOLSTEIN-RANTHLOU, N. H.; EYSAAC, P. P.; AMTORP, O.; DIKHOFF, T. G. Acute effect of cisplatin on renal

hemodynamics and tubular function in dog kidneys. **Ren. Physiol.**, Basel, v. 9, p. 308-316, 1986.

- ◆ DAVIES, S.M.K.; POLJAK, A.; DUNCAN, M.W.; SMYTHIE, G.A.; MURPHY, M.P. Measurements of protein carbonyls, ortho- and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex activity in mitochondria from young and old rats. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 31, p. 181-90, 2001.
- ◆ DEKANT, W.; VAMVAKAS, S. Biotransformation and transport membrane in nephrotoxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, Boca Raton, v. 26, p. 309-34, 1996.
- ◆ DILLIOGLUGIL, M. O.; MARAL KIR, H.; GULKAC, M. D.; OZON KANLI, A.; OZDOGAN, H. K.; ACAR, O.; DILLIOGLUGIL, O. Protective effects of increasing vitamin E and A doses on cisplatin-induced oxidative damage to kidney tissue in rats. **Urol. Int.**, Basel, v. 75, n. 4, p. 340-4, 2005.
- ◆ DRODGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, Washington, v. 82, p. 47-95, 2002.
- ◆ EASTMAN, A. The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis. In: LIPPERT, B. (Ed) **Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug**. 2nd ed. New York: Wiley-VCH, 1999. p.111-35.
- ◆ EL DALY, E.S. Protective effect of cysteine and vitamin E, Crocus sativus and Nigella sativus extracts on cisplatin-induced toxicity in rats. **J. Islamic Acad. Sci.**, v. 9, n. 4, p. 105-118, 1996.
- ◆ EL-SAYED, EL-S. M.; ABD-ELLAH, M. F.; ATTIA, S. M. Protective effect of captopril against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Pak. J. Pharm. Sci.**, Karachi, v. 21, n. 3, p. 255-61, 2008.
- ◆ EMAUS, R. K.; GRUNWALD, R.; LEMASTERS, J. J. Rhodamine-123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria - spectral and metabolic properties. **Biochim. Biophys. Acta**, Budapest, v. 850, p. 436-48, 1986.
- ◆ ESTEBAN-FERNÁNDEZ, D.; VERDAGUER, J. M.; RAMÍREZ-CAMACHO, R.; PALACIOS, M. A.; GÓMEZ-GÓMEZ, M. M. Accumulation, fractionation, and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin,

and carboplatin administration. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v. 32, n. 2, p. 140-6, 2008.

- ◆ ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v.11, n. 1, p. 81-128, 1991.
- ◆ FAURSKOV, B.; BJERREGAARD, H. F. Effect of cisplatin on transepithelial resistance and ion transport in the A6 renal epithelial cell line. **Toxicol. In Vitro**, Oxford, v.13, p. 611-617, 1999.
- ◆ FIELD, M.J.; BOSTROM, T.E.; SEOW, F.; GYORY, A.Z. COCKAYNE DJ. Acute cisplatin nephrotoxicity in the rat. Evidence for impaired entry of sodium into proximal tubule cells. **Pflugers Arch.**, Berlin, v. 414, n.6, p.647-50, 1989.
- ◆ FIRST, M. R. Renal function. In: KAPLAN, L.A.; PESCE, A.J. **Clinical chemistry. Theory, analysis and correlation**. 3rd ed. St. Louis: Mosby, 1996. cap.26, p.346-358.
- ◆ FUERTES, M.A.; CASTILLA, J.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M. Cisplatin biochemical mechanism of action: From cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. **Curr. Med. Chem.** Madrid, v. 10, n. 3, p. 257-266, 2003.
- ◆ 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.
- ◆ GAMAL EL-DIN, A. M.; AL-BEKAIRI, A. M. Carvedilol, a beta adrenoceptor blocker with antioxidative potential, attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J. Appl. Sci. Res.**, Riyadh, v. 2, n. 6, p. 331-5, 2006.
- ◆ GEMBA, N.; NAKATAMI, E.; TERAMOTO, N.; NAKANO, S. Effect of cisplatin on calcium uptake by rat kidney cortical mitochondria. **Toxicology Lett.**, Amsterdam, v. 38, p. 291-297, 1987.
- ◆ GOLDSTEIN, R.S.; Biochemical heterogeneity and site-specific tubular injury. In: HOOK, J. B.; GOLDSTEIN, R. S. **Toxicology of the kidney**, New York, Raven Press, 1993. p.201-48.

- ◆ GONZALEZ, V.M.; FUERTES, M.A.; ALONSO, C.; PEREZ, J.M.; Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Mol. Pharmacol.** Madrid, v. 59, n. 4, p. 657-63, 2001.
- ◆ GORDON, J. A.; GATTONE, V. H. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.250, n. 6, p. F991-98, 1986.
- ◆ GORNALL G.A.; BARDAWILL, J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 177, p. 751 - 766. 1949.
- ◆ GOULLE J.P. ; MAHIEU L.; CASTERMANT J.; NEVEU N.; BONNEAU L.; LAINE G.; BOUIGE D.; LACROIX C. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair reference values. **Forensic Sci. Int.**, Limerick, v. 153, p. 39-44, 2005.
- ◆ GRATTAGLIANO, I.; VENDEMIALE, G.; SABBÀ, C.; BUONAMICO, P.; ALTOMARE, E. Oxidation of circulating proteins in alcoholics: role of acetaldehyde and xanthine oxidase. **J. Hepatol.**, Oxford, v. 5, p. 28-36, 1996.
- ◆ GRIJALBA, M.T.; VERCESI, A.E.; SCHEREIER, S. Ca⁺² induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca⁺² – stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. **Biochemistry.**, Washington, v. 38, p. 13279-87, 1999.
- ◆ GRUBB, A. Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biologic fluids. **Clin. Nephrol.**, Munchen-Deisenhofen, v. 38, n.1, p. S20-7, 1992.
- ◆ GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 899, p. 136-47, 2000.
- ◆ HALABE, A.; WONG, N. L. M.; SUTTON, R. A. L. Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. **Nephron.**, Basel, v. 57, p. 197-200, 1991.
- ◆ HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Transactions.**, Singapore, v. 35, n. 5, p. 1147-50, 2007.

- ◆ HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics - what they are and how to evaluate them. **Adv. Pharmacol.**, New York, v. 38, p. 3-20, 1997.
- ◆ HAMERS, F. P.; BRAKKEE, J. H.; CAVALLETTI, E.; TEDESCHI, M.; MARMONTI, L.; PEZZONI, G.; NEIJT, J. P.; GISOEN, W. H. Reduced glutathione protects against cisplatin-induced neurotoxicity in rats. **Cancer Res.**, v. 53, n. 3, p. 544-9, 1993.
- ◆ HANIGAN, M. H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther.**, Athens, v. 1, p. 47-61, 2003.
- ◆ HARTMANN, A. E. Nitrogen metabolites and renal function. In: MACCLATCHEY, K. D. **Clinical laboratory medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. cap.16, p. 371-85.
- ◆ HAYASHI, T.; SAIATOU, K.; NOSE, K.; NISHIOKA, T.; ISHI, T.; UEMURA, H. Efficacy of carvedilol for ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. **Transplantat. Proc.**, Osaka, v. 40, p.2139-2141, 2008.
- ◆ HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. In: **Avaliação da função renal e da água, eletrólitos e balanço ácido-básico**. 18 ed. São Paulo: Manole, 1995. p. 135-58.
- ◆ HERAK-KRAMBERGER, C. M.; SABOLIC, I. The integrity of renal cortical brush-border and basolateral membrane vesicles is damaged *in vitro* by nephrotoxic heavy metals. **Toxicol.**, Amsterdam, v.156, n. 2-3, p.139-47, 2001.
- ◆ HISSIN, P.J.; HILF, R. A fluorimetric method for determination o oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 74, p. 214-226, 1976.
- ◆ HODGSON, E.; LEVI, P. Susceptibility of the renal system. In: HODGSON, E. **A textbook of modern toxicology**. 3rd edition. New York: John Wiley & Sons, 2004. cap. 15, p. 273-78.
- ◆ HOFMAN, W.; ROSSMULLER, B.; GUDER, W. G. a new strategy for characterizing proteinuria and haematuria from single pattern of defined proteins in urine. **Eur. J. Clin. Chem. Biochem.**, Berlin, v. 30, p. 707-12, 1992.

- ◆ HUANG, M.; CAMARA, A. K. S.; STOWE, D. F.; QI, F.; BEARD, D. A. Mitochondrial Inner Membrane Electrophysiology Assessed by Rhodamine-123 Transport and Fluorescence. **Ann. Biomed. Eng.**, Milwaukee, v. 35, n. 7, p. 1276–1285, 2007.
- ◆ HUTCHISON, F.N.; PEREZ, E.A.; GANDARA, D.R.; LAWRENCE, H.J.; KAYSEN GA. Renal salt wasting in patients treated with cisplatin. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.108, n.1, p.21-5, 1988.
- ◆ IGUCHI, T.; NISHIKAWA, M.; CHANG, B.; MUROYOA, O.; SATO, E. F.; NAKATANI, T.; INOUE, M. Edaravone inhibits acute renal injury and cyst formation in cisplatin-treated rat kidney. **Free Radic. Res.**, London, v. 38, n. 4, p. 333-41, 2004.
- ◆ ISHIDA, S.; LEE, J.; THIELE D. J.; HERSKOWITZ, I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.99, n. 22, p. 14298-302, 2002.
- ◆ JABS, T.; DIETRICH, R .A.; DANG, J.L. Initiation of runaway cell death in a *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. **Science.**, Washington, v.273, p.1853-6, 1996.
- ◆ JACOBSON, M.D.; RAFF, M.C. Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. **Nature.**, London, v. 374, p. 814-6, 1995.
- ◆ JENNER, P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. **Lancet.**, London, v. 344, n. 8925), p. 796-8, 1994.
- ◆ JEONG, S. Y.; SEOL, D. W. The role of mitochondria in apoptosis. **BMB Rep.**, Seoul, v. 41, n. 1, p. 11-22, 2008.
- ◆ JING, X.; CAI, X.; HU, H.; CHEN, S.; CHEN, B.; CAI, J. Reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential are modulated during CDDP-induced apoptosis in EC-109 cells. **Biochem. Cell Biol.** Ottawa, v. 85, p. 265-271, 2007.
- ◆ KAASIK, A.; SAFIULINA, D.; ZHARKOYSKY, A.; VEKSLER, V. Regulation of mitochondrial matrix volume. **Am. J. Physiol.**, Bethesda v. 292, p. 157-163, 2007.

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

- ◆ KAEWSUYA, P.; DANIELSON, N., D.; EKHTERAEE, D. Fluorescent determination of cardiolipin using 10-N-nonyl acridine orange. **Anal. Bioanal. Chem.**, Oxford, v. 387, p. 2775–2782, 2007.

- ◆ KAMEYAMA, Y.; GEMBA, M. Cisplatin-induced injury to calcium uptake by mitochondria in glutathione-depleted slices of rat kidney cortex. **Japan J. Pharmacol.**, Kyoto, v. 55, p. 174-76, 1991.

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

- ◆ KAUSHAL, G. P.; SINGH, A. B.; SHAH, S. V. Identification of caspase (ICE-like proteases) gene family in rat kidney and altered expression in ischemia/reperfusion injury. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 274, p. F587-F595, 1998.

- ◆ KAUSHAL, G. P.; KAUSHAL, V.; HONG, X.; SHAH, S. V. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. **Kidney Int.**, New York, v. 60, n. 5, p. 1726-36, 2001.

- ◆ KINSEY, G. R.; MCHOWAT, J.; PATRICK, K. S.; SCHNELLMANN, R. G. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A₂γ in Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. **The J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Charleston, v. 321, n. 2, p. 307-315, 2007.

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

- ◆ KORKMAZ, A.; KOLANKAYA, D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. **Ren. Fail.**, Philadelphia, v. 31, n. 1, p. 36-43, 2009.

- ◆ KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; GRIJALBA, M.T.; BECHARA, E. J. H.; VERCESI, A. E. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of

inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 721, n. 6, p. 2929-2934, 1996.

- ◆ KOWALTOWSKI, A.J.; VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 26, p. 463-71, 1999.
- ◆ KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E; FISKUM, G. Bcl-2 prevents mitochondrial permeability transition and cytochrome c release via maintenance of reduced pyridine nucleotides. **Cell Death Differ.**, London, v.10, p. 903-10, 2000.
- ◆ KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 495, p. 12-15, 2001.
- ◆ KRONING, R.; LICHTENSTEIN, A.K.; NAGAMI, G.T. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. **Cancer Chemoter. Pharmacol.**, Los Angeles, v. 45, n. 1, p. 43-9, 2000.
- ◆ KRUIDERING, M.; DE WATER, B. V.; DE HEER, E.; MULDER, G. J.; NAGELKERKE, J. F. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 280, p. 638-49, 1997.
- ◆ KUHLMANN, M. K.; BURKAHARDT, G.; KOHLER, H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. **Nephrol. Dial. Transplant.** Homburg/Saar, v. 12, n. 12, p. 2478-80, 1997.
- ◆ KUMAR, K. V.; SHIFOW, A. A.; NAIDU, M. U. R.; RATNAKAR, K.S. Carvedilol: A beta blocker with antioxidant property protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Life Sci.**, Hyderabad, v. 66, n. 26, p. 2603-2611, 2000.
- ◆ KUMAR, A.; DOGRA, S. Neuroprotective effect of carvedilol, an adrenergic antagonist against colchicine-induced cognitive impairment and oxidative damage in rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, Tarrytown, v. 92, n.1, p. 25-31, 2009.

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

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

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

- ◆ LEVI, J.; JACOBS, C.; KALMAN, S. M.; McTIGUE, M.; WEINER, M. W. Mechanism of cisplatin nephrotoxicity: I. Effects of sulfhydryl group in rat kidneys. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Bethesda, v. 213, p. 545-550, 1980.

- ◆ LI, G.; SHA, S.; ZOTOVA, E.; AREZZO, J.; WATER, T. V.; SCHACHT, J. Salicylate protects hearing and kidney function from cisplatin toxicity without compromising its oncolytic action. **Lab. Invest.**, Hagerstown v. 82, n. 5, p. 585-96, 2002.

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

- ◆ LOJEK, A.; PECIOVA, J.; MACICKOVA, T.; NOSAL, R.; PAPEZIKOVA, I.; CIZ, M. Effect of carvedilol on the production of reactive oxygen species by HL-60 cells. **Neuro. Endocrinol. Lett.**, Stockholm, v. 29, n. 5, p. 779-83, 2008.

- ◆ 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.

- ◆ MASUBUCHI, Y.; SUDA, C.; HORIE, T. Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. **J. Hepatol.** Oxford, v. 42, p. 110-116, 2005.

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

- ◆ MEGYESI, J.; SAFIRSTEIN, R. L.; PRICE, P. M. Induction of p21WAF1/CIP1/SD11 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced renal failure. **J. Clin. Invest.**, Ann Arbor, v. 101, p. 777-82, 1998.

- ◆ MELLI, G.; TAIANA, M.; CAMOZZI, F.; TRIOLO, D.; PODINI, P.; QUATTRINI, A.; TARONI, F.; LAURIA, G. Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy. **Exp. Neurol.**, Orlando, v. 214, n. 2, p. 276- 284, 2008.

- ◆ MINGATTO, F. E.; SANTOS, A. C.; RODRIGUES, T.; PIGOSO, A. A.; UYEMURA, S. A.; CURTI, C. Effects of nimesulide and its reduced metabolite on mitochondria. **British J. Pharmacol.**, London, v. 131, p. 1154-60, 2000.

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

- ◆ MOCHIZUKI M, YANO M, ODA T, TATEISHI H, KOBAYASHI S, YAMAMOTO T, IKEDA Y, OHKUSA T, IKEMOTO N, MATSUZAKI M. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca²⁺ leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 49, n. 16p. 1722-32, 2007.

- ◆ MORELAND, D. E. Effects of toxicants on oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: HODGSON, E; LEVI, P. E., 2 ed., **Introduction to Biochemical Toxicology**, Norwalk: Appleton e Lange, 1994, cap.15, p. 345-366.

- ◆ NARAYANAN, S.; APPLETON, H., O. Creatinine: A review. **Clin. Chem.**, New York, v. 26, n. 8, p. 1119-26, 1980.

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

- ◆ NOGUCHI, N.; NISHINO, K.; NIKI, E. Antioxidant action of antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 59, n. 9, p. 1069-1076, 2000.

- ◆ ^aOFFERMAN, J. J.; SLEIJFER, D. T.; MULDER, N. H.; MEIJER, S.; SCHRAFFORDT KOOPS, H.; DONKER, A. J. The effect of captopril on renal function on patients during the first cis-diamminedichloroplatinum II infusion. **Cancer Chemoter. Pharmacol.**, Berlin, v. 14, n. 3, p. 214-4, 1985.

- ◆ ^bOFFERMAN, J. J.; MULDER, N. H.; SLEIJFER, D. T.; MEIJER, S.; KOOPS, H. S.; DONKER, A. J.; VAN DER HEM, G. K. Influence of captopril on cis-diamminedichloroplatinum-induced renal toxicity. **Am. J. Nephrol.**, Basel, v. 5, n. 6, p. 433-6, 1985.

- ◆ OLIVEIRA, P. J.; BJORK, J. A.; SANTOS, M. S.; LEINO, R. L.; FROBERG, M. K.; MORENO, A. J.; WALLACE, K. B. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 200, n. 2, p. 159-68, 2004.

- ◆ OWUSU-APENTEN, R.; Colorimetric analysis of protein sulfhydryl groups in milk: Applications and processing effects. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v. 45, p. 1-23, 2005.

- ◆ PABLA, N.; DONG, Z. Cislatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotectives strategies. **Kidney Internat.** New York, v. 73, p. 994-1007, 2008.

- ◆ PEDERSEN, P. L.; GRENAWALT, J. W.; REYNAFARJE, B.; HULLIHEN, J.; DECKER, G. L.; SOPER, J. W.; BUSTAMENTE, 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 cardiolipina in the release of cytochrome c from mitochondria. **FASEB J.**, Bethesda, v. 17, p. 2208-8, 2003.

- ◆ PETROSILLO, G.; MATERA, M.; CASANOVA, G.; RUGGIERO, F. M., PARADIES, G. Mitochondrial dysfunction in rat brain with aging involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipina. **Neurochem. Int.**, Oxford, v. 53, p. 126-131, 2008.

- ◆ POTDEVIN, S.; COURJAULT-GAUTIER, F.; RIPOCHE, P.; TOUTAIN, H. J. Similar effects of cis-diamminechloroplatinum(II) and cis-diamine-1,1-cyclobutanedicarboxylatoplatinum(II) on sodium-coupled glucose uptake in renal brush-border membrane vesicles. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v. 72, n. 10, p. 663-70, 1998.
- ◆ 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.
- ◆ RICCI, J. E.; GOTTLIEB, R. A.; GREEN, D. R. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. **J. Cell Biol.**, New York, v. 160, p. 65-75, 2003.
- ◆ RYDSTROM, J. Mitochondrial NADPH, transhydrogenase and disease. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1757, p. 721-726, 2006.
- ◆ ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer.**, New York, v.55, p.2303-16, 1985.
- ◆ SADZUKA, Y.; SHOJI, T.; TAKINO, Y. Effects of cisplatin on the activities of enzymes, which protect against lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v. 43, p. 1872-5, 1992.
- ◆ SANDSTROM, P. A.; TEBBEY, P.; 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.; CATAO, 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.**, New York, v. 81, n. 7, p. 495-504, 2007.
- ◆ SANTOS, N. A.; BEZERRA, C. S.; MARTINS, N. M.; CURTI, C.; BIANCHI, M. L.; SANTOS, A. C. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, Berlin, v. 61, n. 1, p. 145-55, 2008.

- ◆ SARGAZI, M.; SHENKIN, A.; ROBERTS, N. B. Aluminum-induced injury to kidney proximal tubular cells: effects on markers of oxidative damage. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, Stuttgart, v. 19, n. 4, p. 276-73, 2006.

- ◆ SASTRY, J.; KELLIE, S. J.; Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. **Pediatr. Hematol. Oncol.** London, v. 22, p. 441-5, 2005.

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

- ◆ SCHAEFER, W. H.; POLITOWSKI, J.; HWANG, B.; DIXON, F.; GOALWIN, A.; GUTZAIT, L.; ANDERSON, K.; DEBROSSE, C.; BEAN, M.; RHODES, G. R., Metabolism of carvedilol on dogs, rats, and mice. **Drug Metab. Dispos.**, New York, v. 26, n. 10, p. 958-969, 1998.

- ◆ 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.

- ◆ SEVILLA, C. L.; MAHLE, N. H.; ELEIZER, N.; UZIEBLO, A.; O'HARA, S. M.; NOKOBUKO, M.; MILER, R.; ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Development of monoclonal antibodies to the malonaldehyde-deoxyguanosine adduct, primidopurinone. **Chem. Res. Toxicol.**, Washington, v. 10, p. 172-180, 1997.

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

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

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

- ◆ SHIDOJI, Y.; HAYASHI, K.; KOMURA, S.; OHISHI, N.; YAGI, K. Loss of molecular interaction between cytochrome c and cardiolipin due to lipid

peroxidation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 264, n. 2, p. 343-7, 1999.

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

- ◆ 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, n. 5, p. 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.

- ◆ SPALLAROSSA, P.; GARIBALDI, S.; ALTIERI, P.; FABBI, P.; MANCA, V.; NASTI, S.; ROSSETTIN, P.; GHIGLIOTTI, G.; BALLESTRERO, A.; PATRONE, F.; BARSOTTI, A.; BRUNELLI, C. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. **J. Mol. Cell Cardiol.**, London, v. 37, n. 4, p. 837-46, 2004.

- ◆ STOWE, D. F.; CAMARA, A. K. F. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. **Antiox. Redox Signal.**, v. 11, n. 6, 2009. DOI: 10.1089/ars.2008.2331.

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

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

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

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

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

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

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

- ◆ VERCESI, A. E.; REYNAFARJE, B.; LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of H⁺ ejection and Ca²⁺ uptake coupled to electron transport in rat heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 253, p. 6379-85, 1978.

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

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

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

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

- ◆ WEI, Q.; DONG, G.; YANG, T.; MEGYESI, J.; PRICE, P. M.; DONG, Z. Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, Bethesda, v. 293, p. F1282-F1291, 2007.

- ◆ WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treat. Rev.**, Amsterdam, v. 23, n. 4, p. 209-40, 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, n. 12, p. 1331-7, 1998.

- ◆ WERNER, M.; COSTA, M. J. Nephrotoxicity of xenobiotics, **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v. 237, p. 107-54, 1995.

- ◆ WILCOX, A. A.; CARROL, W. E.; STERLING, R. E.; SATARLING, H. A.; WARE, A. G. Use of the Berthelot reaction in the automated analysis of serum urea nitrogen, **Clin. Chem.**, New York, v. 12, n. 3, p. 151-57, 1966.

- ◆ WILSON, M. R. Apoptosis: unmasking the executioner. **Cell Death Differ.**, London, v. 5, p. 646-52, 1998.

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

- ◆ YAO, X.; PANICHPISAL, K.; KURTZMAN, N.; NUGENT, K. Cisplatin nephrotoxicity: A Review. **Am. J. Med. Sci.**, Hagerstown, v. 334, n. 2. p. 115-124, 2007.

- ◆ YOUN, M. J.; SO, H. S.; KIM, H. J.; KIM, Y.; LEE, H. J.; SOHN, J. S.; KIM, Y. K.; CHUNG, S. Y.; PARK, R. Berberine, a natural product, combined with cisplatin enhanced apoptosis through a mitochondriacaspase-mediated pathway in HeLa cells. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 31, n. 5, p. 789-95, 2008.

- ◆ YUE, T.L.; FEUERSTEIN, G.Z. Carvedilol, a new vasodilator and β -adrenoceptor antagonists, inhibits oxygen radical mediated lipid peroxidation in swine ventricular membranes. **Pharmacol. Commun.**, v. 1, p. 27-35, 1992.

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

- ◆ 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. 4353-6, 2002.

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

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