

Mecanismos celulares e moleculares da nefrotoxicidade pela cisplatina

Simone Mafalda Rodrigues Camargo, Nestor Schor

A cisplatina é um antineoplásico amplamente utilizado na quimioterapia de tumores, aumentando a sobrevida ou mesmo promovendo a cura do paciente. O seu principal efeito colateral é a nefrotoxicidade. Os mecanismos desse efeito adverso ainda não são bem conhecidos, podendo estar relacionados à apoptose, necrose, peroxidação lipídica e aumento da concentração de cálcio intracelular. A presente revisão tem por objetivo colaborar para o conhecimento dessa faceta da cisplatina, condição imprescindível para a formulação de esquemas terapêuticos que atenuem a lesão renal, sem comprometer a eficácia dessa importante droga.

Disciplina de Nefrologia, Departamento de Medicina, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo
Endereço para correspondência:
Rua Botucatu, 740 – Vila Clementino
CEP 04023-900 São Paulo, SP
Tel.: (011) 574-6300 – Fax (011) 573-9652
e-mail: nschor.dmed@epm.br

Cisplatina, Nefrotoxicidade, Apoptose, Peroxidação lipídica, Concentração de cálcio intracelular.

Cisplatin, Nephrotoxicity, Apoptosis, Lipid peroxidation, Intracellular calcium concentration.

Introdução

A cisplatina foi descoberta acidentalmente na década de 60¹ e começou a ser utilizada na quimioterapia do câncer já na década de 70². Atualmente, é um dos agentes quimioterápicos mais utilizados e, em conjunto com outras drogas, pode proporcionar a cura do câncer de testículo em 80% a 85% dos casos^{3,4} e prolongar a sobrevida de pacientes com outros tipos de tumor, tais como de cabeça e pescoço, pulmão, ovário, cérvix uterino, endométrio e bexiga⁵.

Após penetrar na célula e sofrer modificações químicas², a droga liga-se ao DNA genômico e/ou no mitocondrial⁶. Alterações conformacionais ocasionadas

pela ligação da cisplatina ao DNA genômico afetam os processos de replicação e transcrição, e provocam torções da fita de DNA que dificultam a ação das enzimas de reparo e o remodelamento da cromatina. A impossibilidade de reparo da fita de DNA pode levar a célula tumoral à apoptose^{7,8}. Por outro lado, a ligação da cisplatina com o DNA mitocondrial leva à diminuição de ATP e, conseqüentemente, à diminuição da atividade de ATPases e alteração do conteúdo de cálcio. A diminuição da respiração celular pode produzir espécies reativas de oxigênio, levando à peroxidação lipídica das células^{9,10}. Esses mecanismos parecem estar relacionados entre si e com a nefrotoxicidade causada pela droga, que é o fator mais limitante de seu uso. Nesta revisão, analisaremos os estudos que relacionam apoptose, necrose, peroxidação lipídica e aumento da concentração de cálcio intracelular na nefrotoxicidade induzida por essa droga.

Nefrotoxicidade da cisplatina

A insuficiência renal aguda (IRA) induzida pela cisplatina é dose-dependente e pode ser revertida com a retirada da droga¹¹. Caracteriza-se por ser não-oligúrica, com proteinúria discretíssima típica de lesão tubular (β 2-microglobulina)¹² e por excreção aumen-

tada de magnésio^{13,14}. Há redução do fluxo sanguíneo glomerular, sem diminuição do coeficiente de ultrafiltração glomerular (Kf)¹⁵. A taxa de filtração glomerular mostrou-se significativamente diminuída em modelos animais, e em humanos permanece praticamente inalterada^{15, 16}. Pode se observar também enzimúria na fase aguda e que servem de marcadores de lesão tubular (N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), γ -glutamyltransferase, lisozima e fosfatase alcalina)¹⁷. Há um aumento da osmolaridade e do volume urinário, que pode ser devido à alteração da síntese ou liberação de vasopressina¹⁸, mudanças na tonicidade intersticial¹⁹, lesão da porção ascendente espessa da alça de Henle²⁰ ou sobrecarga da porção distal devido à lesão na porção proximal²¹.

O exame morfológico mostra que as lesões iniciais afetam preferencialmente as células epiteliais. As células da porção S3 do túbulo proximal, do túbulo distal e do coletor podem estar comprometidos em diferentes graus, dependendo das espécies estudadas, mas sempre as células do túbulo proximal são as mais prejudicadas²². As mudanças glomerulares mais comuns são glomeruloesclerose não-específica²³.

A cisplatina apresenta um *clearance* renal maior que da creatinina (156% em relação a esta última), por ser secretada pelos túbulos. Ela também se acumula nos túbulos, e isso pode ser o motivo de maior toxicidade nessas células²⁴.

Apoptose

Existem dois mecanismos distintos de morte celular, necrose e apoptose. A apoptose tem sido bastante estudada desde a década de 70. É um processo ativo que pode ocorrer em situações tanto fisiológicas como patológicas, e sua descoberta foi de extrema importância no estudo da morfogênese e do câncer. Morfológicamente, a célula em apoptose caracteriza-se por diminuição de tamanho, envolvendo tanto o citoplasma como o núcleo. A membrana citoplasmática e as organelas mantêm-se íntegras, mas há formação de vacúolos. A alteração morfológica mais característica aparece no núcleo, quando a cromatina condensada se redistribui periféricamente. A célula diminui de tamanho, o material intracelular é dividido em corpos cercados pela própria membrana citoplasmática, que são absorvidos pelas células vizinhas ou macrófagos residentes. A necrose, em contraste, é um processo

passivo acidental, sempre patológico, que resulta em perda progressiva da estrutura e da função, após lesão irreversível. Há entumescimento da célula e das organelas em geral, lesão da membrana com liberação do material intracelular e desencadeamento de reação inflamatória²⁵ (Figura 1).

Bioquimicamente, a apoptose tem sido caracterizada pela ativação de endonucleases que "cortam" o DNA em pedaços de tamanho homogêneo. A fita de DNA está "enrolada" em proteínas chamadas histonas, e a esse complexo se dá o nome de nucleossoma, ocorrendo aproximadamente a cada 200 pares de bases. As endonucleases ativadas cortam o DNA entre os nucleossomas, resultando em fragmentação ordenada a espaços de tamanhos múltiplos de 200 pares de bases. Essa clivagem característica propicia o aparecimento de bandas ou degraus à eletroforese em gel de agarose, e é uma das técnicas mais utilizadas para detecção grosseira da apoptose. A necrose, por sua vez, apresenta-se nesse método com um aspecto de esfregaço, já que ocorre clivagem desordenada do DNA, com fragmentos de tamanho menor (Figura 2).

A partir de estudos com o nematode *Caenorhabditis elegans*^{26, 27}, no qual se verificou haver genes que são

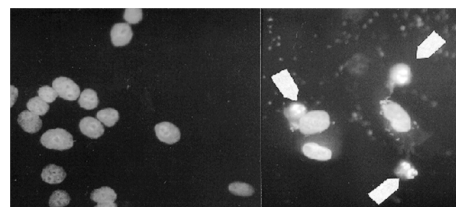


Figura 1. Núcleo de células LLC-PK₁ marcadas com o corante fluorescente Hoechst 33342: normal (esquerda) e apoptose (direita). Podemos observar nitidamente os corpos apoptóticos (setas), com a cromatina condensada e DNA fragmentado mais brilhante.

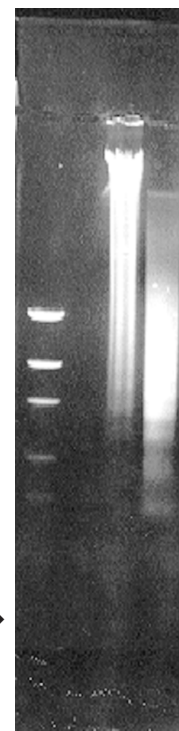


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose, onde se pode observar DNA de células LLC-PK₁ com padrões característicos de necrose (esfregaço) e apoptose (escada). Esse é um dos testes mais comuns para se analisar apoptose qualitativamente.

S. M. R. Camargo / N. Schor - Mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina

responsáveis para manutenção da vida (*ced-9*) e outros necessários para a morte (*ced-3* e *4*), pesquisadores começaram a procurar genes homólogos em mamíferos. Foi identificado o *bcl-2* como homólogo do *ced-9*, ICE (*interleukin-1 β -converting enzyme*) como homólogo de *ced-3* e o homólogo de *ced-4* não foi identificado. Esses genes codificam enzimas, que nos mamíferos são chamadas de caspases por serem cisteína aspases. As caspases são divididas em subfamílias e parecem formar uma cascata proteolítica-chave na apoptose. Sua ativação é indispensável para o aparecimento do fenótipo das células apoptóticas e pode ser prevenida por inibidores das caspases, endógenos ou exógenos. As subfamílias são ICE (caspases 1, 4, 5), CPP32 (caspases 3, 6, 8, 10, 7) e ICH (caspases 2, 9) (Figura 3).

A caspase-1 (*ICE-interleukin-1 β -converting enzyme*) é sintetizada como uma pró-enzima inativa de 45 Kda e é ativada proteoliticamente por um mecanismo desconhecido em resposta a diversos agentes inflamatórios. A forma ativa é composta de 2 sub-unidades, uma de 20 Kda e outra com 10 Kda. Ela é a protease responsável pela conversão do precursor inativo da citocina (31 Kda), pró-interleucina 1 β (pró IL-1 β) para a sua forma ativa (17,5 Kda). Ela também

parece estar envolvida na maturação proteolítica do fator indutor de interferon- γ (IGIF), que é uma citocina de 18 Kda e estimula células T a produzir interferon- γ ^{28, 29}. Foram descobertas mais duas enzimas que, pela sua homologia de seqüências, foram classificadas como da família ICE, sendo caspases 4 (ICe1 II/TX/TCH2) e 5 (ICe1 III/TX), as quais parecem estar relacionadas com a regulação da apoptose³⁰⁻³³.

A caspase 3 foi clonada e mostrou codificar uma cisteína protease de 32 Kda, por isso chamada de CPP32. Independentemente, em outros dois laboratórios³⁴⁻³⁶, a caspase-3 foi também clonada e recebeu o nome de Yama (Deus Indu da morte) e de *apopain*. É a protease humana similar àquela codificada pelo gene *ced-3* nos nematódeos, sendo amplamente distribuída e bastante expressa em linfócitos, sugerindo ser mediador de apoptose no sistema imune. É uma das enzimas-chave da apoptose, responsável pela clivagem proteolítica de muitas proteínas como a enzima nuclear PARP. A PARP, poly(ADP-ribose) polimerase, é responsável por certos mecanismos de reparo do DNA.

No grupo da caspase-3 temos ainda as caspases-6, -7, -8, -9 que formam o subgrupo com função

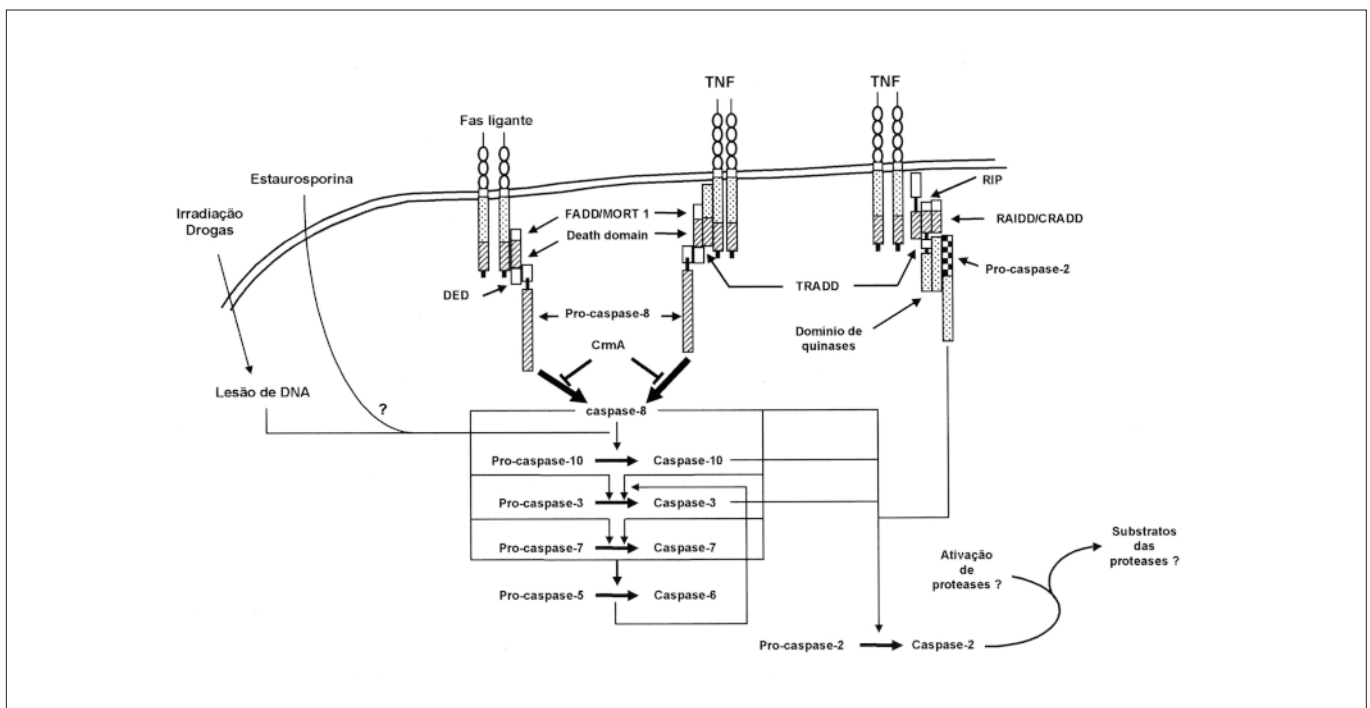


Figura 3. Esquema hipotético da cascata proteolítica das caspases, montado a partir de inibidores específicos. As caspases foram descritas pela primeira vez em 1992 e ainda há muitas dúvidas de como agem e interagem.

semelhante à ced-3. Caspase-6, Mch2 (*mammalian ced-3 homologue*), 34 Kda, tem alta afinidade com caspase-3 e pode ser ativada por esta. Caspase-7 (Mch3/ICE-LAP3/cmh-1), 35 Kda, foi clonada em três laboratórios diferentes simultaneamente³⁷⁻³⁹, sendo semelhante à ced-3, mas conhecido como regulador negativo da apoptose. Caspase-8 (Mach/FLICE/Mch 5) têm várias isoformas de aproximadamente 55 Kda, é bastante expressa em leucócitos do sangue periférico, sugerindo ter papel importante na apoptose induzida na homeóstase dos linfócitos.

Os receptores de CD95 (Fas) e TNF (p55-r e TNFR1) são membros da família de receptores TNF/fator de necrose tumoral. A ativação desses receptores de citocinas, pelos seus ligantes naturais ou anticorpos agonistas, resultam em apoptose. Os receptores de CD-95 e TNF mostram uma região terminal chamada *death domain* e a esse domínio se liga FADD/MORT (*fas-associated protein with death domain*) e TRADD (TNFR1 associated death domain protein), além da RIP (*receptor interacting protein*), CAP1-4 e DED (*death domain effector*). A caspase-8 liga-se a esse complexo e desencadeia a cascata proteolítica, levando a mudanças características durante a apoptose. Caspase-10 (Mch 4) tem 55 Kda, é bem semelhante a caspase-8 e é bastante distribuída no organismo. Ela ativa as pró-caspases-3, -7 e mesmo a -10, podendo mesmo ser ativada pela caspase-8^{40,41f}.

Caspases-2 (ICH-1/Need 2) e -9 (ICE-LAP6/Mch6) formam um outro subgrupo, não tendo substrato definido e cliva o PARP depois de ativada pela caspase-3 ou granzyme B, respectivamente⁴².

Essas caspases têm inibidores, como a proteína codificada pelo gene do vírus *cowpox*, a CrmA (cytokine endogen modifier), um peptídeo de 38 Kda, que parece facilitar a infecção viral, inibindo a resposta inflamatória do hospedeiro e a apoptose mediada por CD95^{38, 43}. Outro produto de gene viral, uma proteína de 35 Kda de baculovírus, a p35, também parece atenuar apoptose por agir na via das caspases⁴⁴. O IAP (inhibitor of apoptosis protein) é endógeno e tem mostrado inibir a atividade das caspases-3 e -7, mas não das caspases-1, -6 e -8. Há também inúmeros inibidores sintéticos disponíveis no mercado atualmente^{45, 46}.

Na molécula, a apoptose é regulada por uma crescente lista de oncogenes (bcl-2, myc, ras, abl, fos) e genes supressores de tumor (p53, Rb). A família de polipeptídeos homólogos à bcl-2 parecem ter um papel

particularmente modulador, induzindo apoptose (bax, bcl-xs e bak) ou suprimindo-a (bcl-2, bcl-xl, mcl-1)⁴⁷.

Essa via de morte pode estar interrompida nas células tumorais, conferindo vantagens de sobrevivência e proliferação por mutações nos proto-oncogenes, em genes supressores de tumor (p53) ou genes envolvidos nos mecanismos de reparo à lesão no DNA, assim como esta pode estar estimulada em doenças neurodegenerativas, AIDS e lesão isquêmica. Radiação ionizante e muitas drogas, como as utilizadas no tratamento do câncer, danificam o DNA e podem levar as células à morte por apoptose⁴⁸⁻⁵⁵. Em células tumorais o gene p53 está mutado, deletado ou rearranjado. Ele está envolvido no ciclo celular e parece mediar o reparo do DNA, participando do *checkpoint* da célula na fase G1 da divisão celular. Se a célula está normal, a divisão continua e entra na fase S, e se o p53 detecta algum dano no DNA, essa alteração é reparada. Quando isso não for possível, a célula decide entrar em apoptose. Vários estudos têm verificado que a cisplatina mantém o ciclo celular estacionado em um dos dois *checkpoints*, G1 ou G2/M com subsequente quebra da dupla cadeia de DNA, fenômeno relacionado à apoptose. Este pode ser o mecanismo de morte celular ocasionada pela cisplatina⁵⁶⁻⁵⁹. Vários autores têm tentado compreender os mecanismos pelos quais a cisplatina induz apoptose e se esses mecanismos estão relacionados com a resistência de certos tumores à droga. Kondo e colaboradores⁶⁰ sugerem que ela induz apoptose por via das caspases, independente dos níveis de p53 e pode ser inibida pelo tetrapeptídeo inibidor de ICE (Ac-YVAD-CMK) ou pela superexpressão dos genes inibidores de apoptose bcl-2 e bcl-X_L. Outros pesquisadores confirmaram o envolvimento das caspases na indução da apoptose pela cisplatina. Estudaram também se a resistência a essa droga era devido à perda da capacidade de entrar em apoptose e sugeriram que os mecanismos de apoptose não estão envolvidos na resistência à droga em células de leucemia *in vitro*⁶¹. Gibb e colaboradores⁶² sugerem que a resistência está relacionada com a apoptose, mas que é determinada pelas características celulares e genéticas da célula-alvo. Um outro fator estudado e que pode estar envolvido com a sensibilidade ou resistência da célula é a capacidade de reparo do DNA, após tratamento com a cisplatina⁶³. Além disso, o mecanismo envolvido na apoptose de células resistentes e sensíveis pode ser diferente⁶⁴.

S. M. R. Camargo / N. Schor - Mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina

Como já foi mencionado anteriormente, a nefrotoxicidade da cisplatina é um dos efeitos colaterais que limitam seu uso. Ela causa lesão tubular e a morte das células tubulares pode ocorrer por necrose ou apoptose, dependendo da dose e tempo da exposição^{65,66}. Em células de túbulo proximal *in vitro*, a cisplatina induz necrose em altas doses (800 μM) e apoptose em doses menores (8 μM). Também foi verificado que a apoptose induzida pela cisplatina foi inibida por antioxidantes, sugerindo que as espécies reativas do oxigênio possam estar envolvidas^{67, 68}.

As espécies reativas do oxigênio promovem clivagem do DNA por endonucleases diferentes daquelas induzidas na apoptose⁶⁹. No entanto, outros pesquisadores sugerem que possa haver ligação entre a peroxidação lipídica causada pelas espécies reativas de oxigênio, o aumento de cálcio intracelular e a apoptose, o que será discutido no próximo tópico.

Em nosso laboratório, realizamos experimentos com células de túbulos proximal (LLC-PK1) e distal (MDCK) na presença de cisplatina, assim como vários outros agentes que conhecidamente induzem apoptose (glicocorticóide, ausência de soro, radiação, estaursporina, TNF). Observamos nas duas linhagens de células que a cisplatina em alta dose induziu apoptose em menor tempo (100 μM /6 horas e 24 horas) e em baixa dose em maior tempo (1 μM /4 dias), assim como observado anteriormente. A radiação e a estaursporina também induziram apoptose em ambas e o TNF, por sua vez, não induziu em nenhuma das duas. A ausência de soro induziu apoptose nas células MDCK, mas não nas LLC-PK1.

Concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{++}]_i$)

Enquanto a concentração do íon cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]$) no espaço extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) se aproxima de 1 mM (50% ionizado), a concentração do cálcio intracelular total ($[\text{Ca}^{2+}]$) tem metade desse valor, estando grande parte ou seqüestrada no retículo endoplasmático rugoso e nas mitocôndrias ou ligada a proteínas. Por sua vez, a concentração de cálcio livre no citosol ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), que é aproximadamente apenas 100 nM, aumenta consideravelmente em resposta a vários sinais de ativação celular, tais como quando da síntese de autácóides⁷⁰ e de hormônios do crescimento⁷¹.

Esse aumento da concentração de cálcio intracelular ($[\text{Ca}^{++}]_i$) pode ser devido a influxo de cálcio do meio extracelular, ou liberação de estoques intracelulares. Pode se dar por ação de agonistas que se ligam a receptores e ou canais de cálcio na membrana, ou por mudanças no potencial de membrana, ativando canais de cálcio sensíveis a mudanças de voltagem. Os canais de cálcio sensíveis a mudanças de voltagem (VOC, voltage-dependent calcium), como o próprio nome diz, são ativados por mudanças no potencial de membrana e possibilitam o influxo do íon do meio extra para o meio intracelular. Estes podem ser classificados conforme a corrente, porque são ativados e segundo suas características farmacológicas. Eles são de 4 tipos L, T, N e P. Os tipos L, N e P são ativados por altas voltagens (HVA, high voltage activated), mas diferem farmacologicamente. O tipo L, o mais comum, é sensível a compostos 1, 4-diidropiridinas, é bloqueado por verapamil, diltiazem, nifedipina, mas é insensível a toxina ω -conotoxina. O tipo N é resistente a diidropiridinas e sensível a ω -conotoxina, e o tipo P é resistente a ambos. O tipo T é ativado por baixas mudanças de voltagem (LVA, low voltage activated), é resistente a análogos da diidropiridina e sensível ao níquel, amilorida e octanol⁷².

Outro mecanismo muito importante de aumento de influxo de cálcio, tanto do meio extra como mobilização de estoques do meio intracelular, é pela ativação de receptores por agonistas e formação de segundos mensageiros. Esses receptores são acoplados às proteínas G localizadas na parte interna da membrana, ativando diferentes "segundos-mensageiros". Quando a proteína G ativa uma proteína chamada adenilato ciclase, o segundo mensageiro será o AMP cíclico. Quando ela ativar uma fosfolipase C, esta enzima quebra um fosfolípido de membrana, o fosfatidil inositol bifosfato (PIP2), dando origem a dois compostos, o fosfatidil inositol (IP3), que se liga a receptores no retículo endoplasmático (IP3r) e libera cálcio ionizado para o citoplasma, e o diacilglicerol (DAG) que ativa a proteína quinase C⁷³.

Ainda há um outro tipo de canal de cálcio, os chamados canais ativados por liberação de cálcio (CRAC, calcium release activated channel). Ele não requer ocupação de receptor, pode ser ativado por substâncias que depletam os estoques intracelulares de cálcio, são resistentes a inibidores dos canais sensíveis a mudanças de voltagem, são inibidos por lantânio e cádmio⁷⁴.

S. M. R. Camargo / N. Schor - Mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina

Modificações na concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) resultam em alterações de um grande número de atividades bioquímicas. O aumento da $[Ca^{2+}]_i$ ativa uma proteína chamada calmodulina que funciona como um receptor intracelular para o cálcio e modula a maioria dos processos que o envolve. Tem sido demonstrado que esse sistema tem papel central não só na contração de todas as formas de músculo, secreção hormonal e ação de drogas como também, entre outros, na liberação e síntese de citocinas, na ativação linfocitária, na regulação da atividade enzimática, na proliferação celular, na formação de espécies reativas de oxigênio, na necrose e apoptose⁷⁵.

Estudos sobre o mecanismo biológico de agentes citotóxicos que geram espécies reativas de oxigênio indicam que os sistemas de transporte de cálcio localizados na mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana plasmática podem ser danificados pelos radicais livres de oxigênio. Isso diminui a saída de cálcio, quebrando a homeóstase intracelular com manutenção de altos níveis de cálcio. O estresse oxidativo pode estar relacionado com apoptose e o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ com ambos. Uma boa evidência disso é que a apoptose induzida por glicocorticóides leva a aumento da $[Ca^{2+}]_i$ e é inibida pelo uso de antioxidantes. Adicionalmente, inúmeras enzimas envolvidas na apoptose são ativadas diretamente pelo cálcio. A calpaína, uma endonuclease neutra dependente de cálcio, está ativada na apoptose induzida por diversos estímulos. Essa enzima tem como substrato proteínas do citoesqueleto, foldrina e vimetina. O papel dessas proteínas na apoptose ainda não está muito bem-definido, mas parece estar envolvido com a redução de tamanho e vacuolização da membrana e outras alterações estruturais. Também há a clivagem de uma proteína de matriz nuclear chamada laminina por uma protease dependente de cálcio, que pode vir a ser a caspase-3. O aumento da $[Ca^{++}]_i$ também pode ativar endonucleases, como a NCC18 dependente de Ca^{++}/Mg^{++} e a enzima DNase I, que está presente no retículo endoplasmático e que pode chegar ao núcleo após lesões na membrana do retículo e do próprio núcleo^{76, 77}.

Apesar de haver indícios de que a cisplatina induza apoptose e provoque peroxidação, o papel do aumento da $[Ca^{++}]_i$ no mecanismo de toxicidade induzido pela droga é bastante controverso e depende das células estudadas. Kasabdjii e cols.⁷⁸ trabalhando com cultura de células nervosas PC12, verificaram que cisplatina não induziu aumento de cálcio intracelular. Em outro

estudo⁵⁵ em que os pesquisadores utilizaram células de glioblastoma humano resistentes a terapia com várias drogas, e uma associação de cisplatina a diversos inibidores de canal de cálcio sensíveis a diidropiridina como a nicardipina, nimodipina e nifedipina, foi verificado aumento da citotoxicidade na associação de cisplatina e nifedipina. Segundo os autores, a nifedipina poderia reagir a alvos intracelulares que aumentariam o efeito antitumoral da cisplatina, independente de seu efeito nos canais de cálcio. Uma outra hipótese levantada por eles é que a nifedipina poderia induzir aumento da $[Ca^{2+}]_i$ por um mecanismo independente dos canais sensíveis a mudança de voltagem. Esse cálcio poderia ativar endonucleases Ca^{2+} dependentes e induzir apoptose. Yamamoto e cols.⁷⁹ sugerem que atoxicidade da cisplatina em células ciliadas da cóclea é decorrente da inibição dos canais de cálcio dependente de voltagem.

Quanto às células renais, DeWitt e cols.⁸⁰ observaram que ratos tratados com doses nefrotóxicas de cisplatina (10 mg/kg) avaliados 4 horas após o tratamento apresentavam aumento da $[Ca^{++}]_i$ por incrementar a liberação de cálcio do retículo endoplasmático quando avaliados isolados. O mesmo não foi observado com a transplatina, isômero sem efeito antineoplásico ou nefrotóxico. Kim e cols.⁸¹ confirmaram em estudos *in vitro* dados apresentados pelos pesquisadores acima citados, com aumento da $[Ca^{++}]_i$ de origem nos estoques intracelulares. Zhang & Lindup⁸² verificaram que esse aumento de cálcio pode não estar relacionado com a peroxidação lipídica e sim com a depleção de grupos SH. Esses fazem parte de inúmeros sítios ativos de proteínas e são inativados por se ligarem à cisplatina.

Haragsim & Zima⁸³, constataram que ratos que receberam dose única de cisplatina (3 mg/kg, i.p.) precedida por verapamil (0,1 mg/kg, i.p., 30 minutos) apresentaram menor nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, quando foi observada melhora da função renal, tanto por aumento da taxa de filtração glomerular (*clearance* de creatinina) como pela melhora da função tubular (diminuição da enzimúria).

Em nosso laboratório, trabalhando com células LLC-PK₁, MDCK e células mesangiais de camundongos imortalizada, observamos que a cisplatina não induziu aumento na $[Ca^{++}]_i$ dessas células. A nifedipina, utilizada em conjunto com o antineoplásico, não melhorou a viabilidade ou diminuiu a apoptose induzida pela cisplatina em células de túbulo proximal LLC-PK₁ (10^{-4} M/24 horas). Em alguns modelos de

S. M. R. Camargo / N. Schor - Mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina

apoptose, o aumento da $[Ca^{++}]_i$ parece estar envolvido com os mecanismos desse tipo de morte, evidenciadas por aumento da morte com a adição de ionóforos ou diminuídas com bloqueadores de canal de cálcio⁸⁴. O mesmo não acontece em nosso modelo. Esse resultado parece razoável quando se avalia os experimentos de determinação da $[Ca^{++}]_i$, em que a cisplatina não induziu aumento em nenhum tipo celular. Podemos sugerir então que o aumento da $[Ca^{++}]_i$ não está envolvido com o mecanismo inicial de lesão induzido pela droga nem com o tipo de morte induzida nas células proximais.

Peroxidação lipídica

Os intermediários reativos do oxigênio são formas químicas que podem ser formadas em várias situações fisiológicas, inclusive durante a respiração celular. De 1% a 5% do oxigênio molecular (O_2) sofre uma redução incompleta e forma o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), quando deveria, após uma redução tetravalente, ser reduzido à água. Como sistema de defesa contra esse ânion, o organismo utiliza a superóxido dismutase que é responsável pela sua metabolização em peróxido de hidrogênio, o qual, por sua vez, é reduzido à água pelas enzimas glutathione peroxidase ou catalase⁸⁵. Além desse sistema enzimático, as células utilizam outras substâncias para inativar os radicais livres, como a glutathione, ácido úrico, vitamina C e E, zinco, cobre e selênio⁸⁶. Em algumas situações em que há o aumento da produção desses intermediários ou uma diminuição do sistema de defesa, os ânions superóxido e peróxido de hidrogênio podem reagir na presença de íons férricos (reação de Haber-Weiss) produzindo uma espécie muito mais reativa, o radical hidroxil (OH^{\cdot}) que pode abstrair hidrogênios de lipídios, proteínas, DNA e desencadear uma reação em cadeia de propagação de radicais livres⁸⁷. Nas membranas, os ácidos graxos insaturados mudam sua configuração e desestruturam a bicamada lipídica, podendo levar a uma série de mudanças na célula até a morte⁸⁸.

A cisplatina induz peroxidação lipídica em células do córtex do rim de ratos *in vitro* como em rim total *in vivo*^{89,90}. Os estudos para verificar o envolvimento dos intermediários reativos do oxigênio (IRO) como agentes patogênicos empregam a detecção de produtos da lesão oxidativa no tecido ou avaliam o efeito protetor de inibidores metabólicos dos radicais de oxigênio⁹¹.

Em experimentos utilizando a cisplatina e células renais, verificou-se o envolvimento de diversas vias de produção de IRO, direta ou indiretamente. Sadzuka e cols.⁹² verificaram que no córtex do rim de ratos, após o tratamento com cisplatina (5 mg/kg), houve diminuição da atividade das enzimas superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (Cu-Zn SOD), glutathione peroxidase (GSH-px), glutathione-S-transferase (GST) e catalase, responsáveis pela eliminação dos ROS.

Ishikawa & Ali Osman⁹³ observaram que a cisplatina reage diretamente com a glutathione numa razão de duas moléculas de glutathione para uma de cisplatina. A glutathione (GSH), principal tiol não ligado à proteína do organismo, é um tripeptídeo (γ -glutamil-L-cisteinil-glicina). Ela é um potente nucleófilo que participa de uma variedade de reações de detoxificação, tanto por reação direta com radicais livres, como por reações de detoxificação enzimática. A glutathione entra como substrato em reações de redução de hidroperóxidos a alcoóis e água, catalisadas pelas enzimas glutathione peroxidases, na qual ela é oxidada para a forma de dissulfeto (GSSG). A glutathione oxidada (GSSG) retorna novamente a sua forma reduzida (GSH) por uma reação catalisada pela enzima glutathione reductase na presença de NADPH⁹⁴.

Em experimento *in vitro*, Zhang & Lindup⁹⁵, trabalhando com mitocôndrias de córtex de rim de ratos incubadas com cisplatina, verificaram que houve diminuição dos níveis de glutathione precocemente ao aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, método indireto de avaliação de peroxidação lipídica. A diminuição dos níveis de glutathione é um acontecimento que precede a peroxidação lipídica do tecido. Em experimentos *in vivo*, uma diminuição dos níveis de glutathione nos rins foi observada em ratos 24 horas após a administração de dose única (5 mg/kg) de cisplatina⁹⁶. Além disso, administração de ésteres de glutathione diminui os efeitos nefrotóxicos da cisplatina⁹⁷.

Notou-se também que a cisplatina *in vitro* diminui a atividade da enzima proteína quinase C na sua fração citosólica e mitocondrial. Como já foi mencionado anteriormente, a proteína quinase C é uma enzima acoplada à membrana que, após ativação pelo diacilglicerol, fosforila diversas proteínas ligadas à proliferação celular. Essa inibição é causada tanto pela diminuição dos grupos sulfidríla como pela peroxidação lipídica, pois foi inibida tanto por um redutor dos grupos sulfidríla como por um antioxidante⁹⁸. A

S. M. R. Camargo / N. Schor - Mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina

peroxidação lipídica é dissociada do aumento da $[Ca^{++}]_i$ e dependente de ferro, pois pode ser inibido pelo quelante de ferro desferoxamine⁸¹.

Conclusão

Assim, o conhecimento do(s) exato(s) mecanismo(s) de lesão renal induzida pela cisplatina possibilitaria a utilização de esquemas terapêuticos que pudessem evitar o desenvolvimento de insuficiência renal aguda ou crônica em alguns pacientes. Tornaria possível seu uso por pacientes que apresentam função renal alterada, bem como a utilização de doses maiores, o que se faz necessário em alguns tipos de neoplasias e em casos de resistência à droga. Sem dúvida, o enfoque nas recentes pesquisas, avaliando mecanismos básicos biológicos, referidos neste artigo, como $[Ca^{+2}]_i$, apoptose e peroxidação lipídica, é promissor e pode potencialmente modificar a evolução de muitas neoplasias por propiciar esquemas de tratamentos mais eficazes.

Summary

Cisplatin is an important antineoplastic drug, widely employed in tumor chemotherapy. It can enhance the survival or also remise the patient tumor. Nephrotoxicity has been observed as the most important side effect. The mechanism of such adverse reaction is unknown, but it can be related to apoptosis, necrosis, lipid peroxidation and/or intracellular calcium concentration increases. The present review to yearn for collaborate about understanding this mechanism, in order to adequate the therapeutics schedule and induce less renal injury without modifying the effect of this important drug.

Referências

- Rosenberg B, et al. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode. *Nature*. 1965; 205: 698-699.
- Hill KE, et al. The cDNA for rat selenoprotein P contains 10TGA codons in the open reading frame. *J Biol. Chem.* 1991; 266: 10050-10053.
- Lippard SJ. Chemistry and molecular biology of cisplatin anticancer drugs. *Pure & Appl Chem* 1987; 59: 731-742.
- Einhorn LH. Treatment of testicular cancer: a new improved model. *J Clin Oncol* 1990; 8: 1777-1781.
- Meyer KB, Madias NE. Cisplatin nephrotoxicity. *Miner Electrolyte Metab* 1994; 20: 201-213.
- Olivero OA, et al. Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA of chinese hamster ovary cells. *Mutation Res* 1995; 346: 221-230.
- Mymryk JS, Zaniewski E, Archer TK. Cisplatin inhibits chromatin remodeling, transcription factor binding, and transcription from mouse mammary tumor virus promoter in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 2076-2080.
- Yang D, Wang AH-J. Structural studies of interactions between anticancer platinum drugs and DNA. *Prog Biophys Molec Biol* 1996; 1: 81-111.
- Daley-Yates PT & McBrien DCH. The inhibition of renal ATPase by cisplatin and some biotransformation products. *Chem Biol Interact* 1982; 40: 325-334.
- Uozumi U & Litterest CL. The effect of cisplatin on renal ATPase activity *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol* 1985; 15: 93-96.
- Bitran JD, Desser RK, Billings AA, Kozloff MF, Shapiro CM. Acute Nephrotoxicity following cis dichlorodiammine-platinum. *Cancer* 1982; 49: 1784-1788.
- Edelweiss MIA. Modelo experimental de nefrotoxicidade da cis-diamminedichloroplatinum (II): estudo morfológico dos efeitos agudos e crônicos. São Paulo, 1991. 222p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Mavichak V, Coppin CML, Wong NLM, Dirks JH, Walker W, Sutton RAL. Renal magnesium wasting and hypocalciuria in chronic cisplatin nephropathy in man. *Clinical science* 1988; 75: 203-207.
- Satori S, Nielsen I, Tassinari D, Rigolin F, Arcudi D, Abbasciano V. Changes in intracellular magnesium concentrations during cisplatin chemotherapy. *Oncology* 1993; 50: 230-234.
- Barros EJG, Boim MA, Santos OPS, Schor N. Effect of cisplatin on glomerular hemodynamics Brazilian *J Med Biol Res* 1989; 22: 1295-1301.
- Offerman JJG, Meijer S, Sleijfer DTH. Acute effect of cisdiamminedichloroplatinum (CDDP) on renal function. *Cancer Chemother Pharmacol* 1984; 12: 36-38.
- Dubach UC, Le Hir M, Gandhi R. Use of urinary enzymes as markers of nephrotoxicity. *Toxicol Letter* 1988; 46: 193-6.
- Clifton GG, Pearce C, O'Neill WM, Wallin JD. Early polyuria in the rat following single-dose cis-diamminedichloroplatinum (II). *J Lab Clin Med* 1982; 100: 659-670.
- Gordon JA, Peterson LN, Anderson RJ. Water metabolism after cisplatin in the rat. *Am J Physiol* 1982; 243: F36-F43.

S. M. R. Camargo / N. Schor - Mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina

20. Seguro AC, Shimiru MHM, Kudo LH, Rocha AS. Renal Concentration defect induced by cisplatin (CP): the role of thick ascending limb and papillary collecting duct. 10th Int. Cong Nephrology, 335^A, Los Angeles, 1984.
21. Daugaard G, Abildgaard U, Holstein-Rathlou NJ, Leyssac PP. Acute effect of cisplatin on renal hemodynamics and tubular function in dog kidneys. *Renal Physiol* 1986; 3: 308-316.
22. Daugaard G. Cisplatin nephrotoxicity: experimental and clinical studies. *Danish Med Bull* 1990; 37: 1-12.
23. Laurent G, Yernaux V, Nonclercq D, Toubeau G, Maldague P, Tulkens PM, Heuson-Stiennon JA. Tissue injury and proliferative response induced in rat kidney by cis-diamminechloroplatinum (II). *Virchowa Archiv B Cell Pathol.* 1988; 55: 129-145.
24. Jacobs C, Kalman SM, Tretton M, Weiner W. Renal handling of cisplatin (II) *Cancer Treat Rep* 1980; 64: 1223-1226.
25. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Sur Pathol* 1997; 21: 88-101.
26. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aununs AD. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768-774.
27. Cerretti DP. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1992; 256: 97-100.
28. Black RA, Kronheim SR, Sleath PR. Activation of interleukin-1 beta by a co-induced protease. *FEBS Lett* 1989; 247: 386-390.
29. Kostura MJ, Tocci MJ, Linjico G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain, N.A.; Schimidt, J.A. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 5227-5231.
30. Munday NA, Vaillancourt JP, Ali A, Casano FJ, Miller DK, Molineaux SM, Yamin TT, Yu VL, Nicholson DW. Molecular cloning and pro-apoptotic activity of ICEReIII and ICEReIII, members of the ICE/CED-3 family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 1995; 270: 15870-15876.
31. Kamens J, Paskind M, Hugunin M, Talamian RV, Allen H, Bamach D, Bump N, Hackett M, Johnston CG, Li P. Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1beta-converting enzyme family of cysteine proteases. *J Biol Chem* 1995; 270: 15250-15256.
32. Faucheu C, Diu A, Chan AWE, Blanchet AM, Misse C, Herve F, Collard-Dutilleud V, Gu Y, Aldape RA, Lippke JA. A novel human protease similar to the interleukin-1 beta converting enzyme induces apoptosis in transfected cells. *EMBO J* 1995; 14: 1914-1922.
33. Faucheu C, Blanchet AM, Collard-Dutilleud V, Lalanne JL, Diu-Hercend A. Identification of a cysteine protease closely related to interleukin-1 beta-converting enzyme. *Eur J Biochem* 1996; 236: 207-213.
34. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 1994; 269: 30761-30764.
35. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *Cell* 1995; 81: 801-809.
36. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 1995; 376: 37-43.
37. Fernandes-Alnemri T, Takahashi A, Armstrong R, Krebs J, Fritz L, Tomaselli KJ, Wang L, Yu Z, Croce CM, Salvesen G. Mch2, a new member of the apoptotic Ced-3/Ice cysteine protease gene family. *Cancer Res* 1995; 55: 6045-6052.
38. Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, Wing JP, He W, Dixit VM. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1996; 271: 1621-1625.
39. Lippke JA, Gu Y, Sarnecki C, Caron PR, SU SS. Identification and characterization of CPP32/Mch2 homolog 1, a novel cysteine protease similar to CPP32. *J Biol Chem* 1996; 271: 1825-1828.
40. Fernandes-Alnemri T, Armstrong R, Krebs J, Srinivasula SM, Wang L, Bullrich F, Fritz LC, Trapani JA, Tomaselli KJ, Yu Z, Litwack G, Alnemri ES. In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 15, 7464-9.
41. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 14486-14491.
42. Harvey NL, Trapani JA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES, Kumar S. Processing of the Nedd2 precursor by ICE-like proteases and granzyme B. *Genes Cells* 1996; 1: 673-685.
43. Chinnaiyan AM, Orth K, O'Rourke K, Duan H, Poirier GG, Dixit VM. Molecular ordering of the cell death pathway. Bcl-2 and Bcl-xL function upstream of the CED-3-like apoptotic proteases. *J Biol Chem* 1996; 271: 4573-4576.
44. Xue D, Horvitz R. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 1995; 377: 248-251.
45. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *TIBS* 1997; 22: 422-430.
46. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326: 1-16.
47. Dietrich JB. Apoptose et gènes anti-apoptotiques de la famille bcl-2. *Arch Physiol Biochem* 1997; 105: 125-135.

48. Zanzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gómez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* 1996; 183: 1533-1544.
49. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: A switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 8: 1481-1486.
50. Kaufman SH. Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptotecin, and other cytotoxic anti-cancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 1989; 49: 5870-5878.
51. Eastman AN. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer cells* 1990; 2: 275-280.
52. Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 1993; 8: 307-318.
53. Yin D, Kondo S, Takeuchi J, Moimura T. Induction of apoptosis in murine ACTH-secreting pituitary adenoma cells by bromocriptine. *FEBS Lett* 1994; 339: 73-75.
54. Kondo S, Yin D, Moimura T, Takeuchi J. Combination therapy with cisplatin and nifedipine induces apoptosis in multi-drug resistant human glioblastoma cells. *J Neurosurg* 1995; 82: 469-474.
55. Kondo S, Yin D, Moimura T, Kubo H, Nakatsu S, Takeuchi J. Combination therapy with cisplatin and nifedipine induces apoptosis in cisplatin sensitive and cisplatin resistant human glioblastoma cells. *Br J Cancer* 1995; 71: 282-287.
56. Sorenson CM, Barry MA, Eastman A. Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 749-755.
57. Demarcq C, Bunch RT, Creswell D, Eastman A. The role of cell cycle progression in cisplatin-induced apoptosis in chinese hamster ovary cells. *Cell Growth Differ* 1994; 5: 983-993.
58. Donaldson KL, Goolsby GL, Wahl AF. Cytotoxicity of the anticancer agent cisplatin and taxol during cell proliferation and cell cycle. *Int J Cancer* 1994; 57: 847-855.
59. Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, Milas L. Kinetics of cisplatin-induced apoptosis in murine mammary and ovarian adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1995; 60: 725-729.
60. Kondo S, Barna BP, Morimura T, Takeuchi J, Yan J, Akbasak A, Barnett G. Interleukin-1b-converting enzyme mediates cisplatin-induced apoptosis in malignant glioma cells. *Cancer Res* 1995; 55: 6166-6171.
61. Canitrot Y, Frit P, Salles B. Deficient apoptotic process in cisplatin-resistant L1210 cells cannot account for the cellular response to various drug treatments. *Biochem Biophys Res Comm* 1997; 234: 573-577.
62. Gibb RK, Taylor DD, Wan T, O'Connor DM, Doering DL, Gerçel-Taylor Ç. Apoptosis as a measure of chemosensitivity to cisplatin and taxol therapy in ovarian cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 1997; 65: 13-22.
63. Köeberle B, Grimaldi KA, Sunter A, Hartley JA, Kelland R, Masters RW. DNA repair capacity and cisplatin sensitivity of human testis tumor cells. *Int J Cancer* 1997; 70: 551-555.
64. Segal-Berdirjian E, Jacquemin-Sablon A. résistance au cisplatin d'une lignée de leucémie murine associée à un défaut d'apoptose. *Bull Cancer* 1996; 83: 371-378.
65. Lieberthal W, Levine JS. Mechanism of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 1996; 271: F477-488.
66. Takeda M, Fukuoka K, Endou H. Cisplatin-induced apoptosis in mouse proximal tubular cell line. *Contrib Nephrol* 1996; 118: 24-28.
67. Lieberthal W, Triaca V, Levine JS. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. *Am J Physiol* 1996; 270: F700-F708.
68. Andreoli S, Mallett CP. Dissociation of oxidant-induced ATP depletion and DNA damage from early cytotoxicity in LLC-PK₁ cells. *Am J Physiol* 1997; 272: F729-735.
69. Hagar H, Norishi U, Shah H. Endonuclease induced DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK₁ cells. *Kidney Int* 1996; 49: 355-361.
70. Hassid A, Pidikiti N, Gamero D. Effects of vasoactive peptides on cytosolic calcium in cultured mesangial cells. *Am J Physiol* 1986; 251: F1018-28.
71. Cybusky AV, Bonventure JV. Calcium, phospholipids, and cell signaling. In: Goldfarb S & Ziyadeh FN, ed. *Hormones, Autacoids and the Kidney*. New York, Churchill Livingstone, 1991. p.27-53.
72. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Tips* 1991; 12: 349-354.
73. Ohara Y, Sayegh H, Yamin JJ, Harrison DG. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. *Hypertension* 1995; 25: 415-420.
74. Fasolata C, Innocenti B, Pozzan T. Receptor-activated Ca²⁺ influx: how many mechanisms for how many channels? *TIPS* 1994; 15: 77-83.
75. Rasmussen H. The calcium messenger system. *N Engl J Med* 1986; 314: 1094- 10101.
76. Trump B, Berezesky IK. The role of altered [Ca²⁺]_i regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1313: 173-178.
77. Edelstein CL, Ling H, Shrier RW. The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 1997; 51: 1341-1351.
78. Kasabdji D, Shanmugam V, Rathinavelu A. Effect of cisplatin of dopamine release from PC12 cells. *Life Sci* 1996; 59: 1793-1801.
79. Yamamoto T, Kakehata S, Saito T, Saito H, Akaike N. Cisplatin blocks voltage-dependent calcium in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *Brain Res* 1994; 648: 296-298.
80. DeWitt LM, Jones TW, Moore L. Stimulation of the renal endoplasmic reticulum calcium pump: a possible

S. M. R. Camargo / N. Schor - Mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina

- biomarker for platinate toxicity. *Toxicol App Pharmacol* 1988; 92: 157-169.
81. Kim YK, Jung JS, Lee SH, Kim YW. Effects of antioxidants and Ca^{2+} in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 146: 261-269.
82. Zhang JG, Lindup WE. Tiopronin protects against the nephrotoxicity of cisplatin in rat renal cortical slices *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996; 141: 425-433.
83. Haragsim L, Zima T. Protective effects of verapamil on cisplatin and carboplatin nephrotoxicity in dehydrated and normohydrated rats. *Biochem Inter* 1992; 28: 273-276.
84. Iseki R, Kudo Y, Iwata M. Early mobilization of Ca^{2+} is not required for glucocorticoid-induced apoptosis in thymocytes. *J Immunol* 1993; 151: 5198-5207.
85. Slater TFS. Free radicals fact or fiction? *Br J Cancer* 1987; 55: 5-10.
86. Slater AGF, Stefan C, Nobel I, Van den Dobbstein DJ, Orrenius S. Intracellular redox changes during apoptosis. *Cell Death Differ* 1996; 3: 2344-2351.
87. Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxidase in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 1995; 18: 775-794.
88. Jaeschke H. Mechanism of oxidant stress-induced acute tissue injury. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 209: 104-111.
89. Sugihara K, et al. Effects of cisplatin on *in vitro* production of lipid peroxides in rat kidney cortex. *Japan J Pharmacol* 1987; 44: 71-76.
90. Camargo SMR. Avaliação do efeito do selênio na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre, 1996.
91. Ichikawa I, et al. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. *Kidney Int* 1994; 45: 1-9.
92. Sadzuka Y, et al. Effects of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1872-1875.
93. Ishikawa T, Ali-Osman F. Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinun (II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. *J Biol Chem* 1993; 268: 20116-20125.
94. Shan X, et al. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* 1990; 47: 61-77.
95. Zhang JG, Lindup WE. Role of mitochondria in cisplatin-induced oxidative damage exhibited by rat renal cortical slices. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2215-2222.
96. Singh G. A possible cellular mechanism of capsulation-induced nephrotoxicity. *Toxicology* 1989; 58: 71-80.
97. Babu E, et al. Cisplatin induced nephrotoxicity and the modulating effect of glutathione ester. *Mol Cell Biochem* 1995; 144: 7-11.
98. Basu A, Cline JS. Oncogenic transformation alters cisplatin-induced apoptosis in rat embryo fibroblasts. *Int J Cancer* 1995; 63: 597-603.

Artigo recebido em 30 de junho de 1998 e aceito para publicação em 23 de novembro de 1998.
