

ESTELA BEATRIZ BEHLING

**EFEITO DE DOSES MÚLTIPLAS DE QUERCETINA NA REDUÇÃO
DA NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELA CISPLATINA EM RATOS**

Araraquara

2004

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ESTELA BEATRIZ BEHLING

EFEITO DE DOSES MÚLTIPLAS DE QUERCETINA NA REDUÇÃO DA NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELA CISPLATINA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição, área de concentração: Ciências Nutricionais.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria de L. Pires Bianchi

Araraquara

2004

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Behling, Estela Beatriz

B419e Efeito de doses múltiplas de quercetina na redução da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos. / Estela Beatriz Behling . – Araraquara, 2004.
115 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição

Orientador: Maria de Lourdes Pires Bianchi

1.Antioxidante. 2.Quercetina. 3.Nefrotoxicidade. 4.Cisplatina. I. Bianchi, Maria de Lourdes P. II. Título.

CDD: 641.1

CAPES: 50700006

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Maria de Lourdes Pires Bianchi

Profª Drª Jacqueline Pontes Monteiro

Prof. Dr. João Bosco Faria

Profª Drª Cecília Rodrigues Silva

Profª Drª Maria Jacira Silva Simões

Araraquara, _____ de _____ de 2004.

“É melhor atirar-se à vida em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que aqueles que não disputam, mas também não vencem. Que não conhecem a dor da derrota, mas que não têm a glória de ressurgir dos escombros.

Esses pobres de espírito, ao final da jornada aqui na terra, não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se diante Dele por haver passado simplesmente pela vida”

(Roosevelt)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **Aureo** e **Clarice**, sem seu carinho, dedicação e amor incondicional nada disso seria possível. Obrigada por tudo que fizeram por mim, sem que ao menos eu soubesse. Obrigada pelos momentos de perdão, pela confiança em mim depositada, por me acompanharem com carinho e estímulo, procurando amenizar minha ansiedade em cada telefonema, mantendo-me firme diante dos obstáculos, por me aceitarem como um ser humano diferente de vocês respeitando minhas escolhas e estando ao meu lado nas minhas decisões. Obrigada pelo apoio emocional e financeiro em mais esta etapa de minha formação profissional. Vocês são meu referencial e motivo pelo qual tudo vale realmente a pena.*

*Ao meu irmão **Estevan**, pelo apoio, carinho e incentivo, nunca esquecerei seus e-mails : “Força maninha, nós sabemos que você é capaz!”.*

Ao encerrar mais esta etapa na construção da minha carreira profissional sinto-me realizada com os feitos até aqui alcançados e propulsionada pelos novos desafios que surgem à medida que cresço.

Durante esse tempo no mestrado passei por várias etapas de crescimento pessoal e profissional. Essas etapas incluíram muitas lágrimas, horas de auto-análise, reconhecimento de erros e busca de caminhos corretos. Esse crescimento foi possível porque Deus colocou em meu caminho pessoas que me ensinaram muito, que me ajudaram e acrescentaram lições e histórias que me tornaram alguém melhor. Pessoas que deram e dão sentido aos momentos felizes e pessoas que muitas vezes sem saber foram conforto, força, resposta e alegria. Essas pessoas são colegas, amigos, familiares e mestres, a quem respeito e muito agradeço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

*À Prof^{ta} Dr^a **Maria de Lourdes Pires Bianchi**, minha orientadora, pela amizade, incentivo, competência e seriedade com que conduziu este trabalho.*

Ao laboratório de Bromatologia e Nutrição, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, onde foi desenvolvido este trabalho.

*Aos **Membros da Banca Examinadora**, por sua disposição e paciência em analisar esse trabalho e trazer contribuições preciosas para a sua finalização.*

*A todo o **corpo docente** do Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara – UNESP.*

*À minha amiga **Milena**, minha amiga por toda vida, por ter sido alegria, conforto e apoio nos bons e nem tão bons momentos desse período, obrigada pelo apoio e pela amizade tão sincera a mim dispensada.*

*Às amigas e colegas do curso, **Angélica, Camila e Renata**, por todos os momentos compartilhados. Sempre guardarei cada uma de vocês dentro do meu coração, como parte preciosa desse tempo tão maravilhoso de convívio.*

*Ao meu namorado, **Luiz Aleixo Da Silva Passos Junior**, por ser alguém tão importante na minha vida, por me amar o suficiente para tolerar minhas ausências e se submeter à distância.*

*Às minhas amigas **Fabi, Lica, Tati e Tchêia**, confidentes durante os momentos tão raros que voltamos ao lar, pela paciência em me ouvir sempre, pelo carinho, apoio e amizade tão carinhosamente dispensados a mim.*

*À amiga **Joana D'Arc**, pelo apoio técnico dentro do laboratório, pelos preciosos conselhos durante meus dias tristes, pela paciência, atenção e competência com que realiza suas tarefas.*

*Às todas amigas e amigos que conviveram comigo nesse período, em especial à **Helóisa e Lusânia** que colaboraram muito para a conclusão deste trabalho, com seus ensinamentos e opiniões sempre coerentes.*

*Às secretárias **Cláudia, Laura e Sônia**, da Pós Graduação, e **Luci e Karina**, os meus mais sinceros agradecimentos pelo prestativo atendimento.*

*Aos funcionários do biotério da FCFRP, **Aldo e Reinaldo**, pelos serviços prestados e dedicação.*

*À **todos os meus familiares** que me apoiaram e que sempre proporcionam a mim momentos tão alegres.*

Agradeço a todas as pessoas que trouxeram alegria a minha vida, que ajudaram-me e que se permitiram ser ajudadas por mim e àquelas que, mesmo tendo ido embora de minha vida jamais deixarão de Ter um lugar especial em meu coração.

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo suporte financeiro concedido, viabilizando a realização deste trabalho.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 Flavonóides	4
2.1.1 Estrutura química	5
2.1.2 Consumo e fontes alimentares	6
2.1.3 Metabolismo e biodisponibilidade	7
2.1.4 Mecanismo antioxidante	10
2.1.5 Flavonóides e Câncer	12
2.1.6 Quercetina e proteção da função renal	16
2.2 Cisplatina	17
2.2.1 Toxicidade e Nefrotoxicidade da Cisplatina	18
2.2.2 Influência das espécies reativas de oxigênio	22
2.2.3 Substâncias com ação protetora na lesão renal provocada pela cisplatina ..	24
3 OBJETIVOS	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Material	26
4.1.1 Ensaio Biológico	26
4.2 Métodos	30
4.2.1 Determinação da variação dos pesos dos animais	30
4.2.2 Determinação do volume urinário	30
4.2.3 Determinação do peso dos rins	30
4.2.4 Dosagens Bioquímicas	31
4.2.4.1 Dosagem de creatinina urinária e plasmática	31
4.2.4.2 “Clearance” de Creatinina	31
4.2.4.3 Osmolalidade Urinária	31
4.2.4.4 Níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) ..	32
4.2.4.5 Análise histológica dos rins	33
4.3 Análise Estatística	34
5 RESULTADOS	35

5.1 Avaliação da função renal	35
5.2 Creatinina Plasmática	36
5.3 Creatinina Urinária	38
5.4 “Clearance” da Creatinina	40
5.5 Fluxo Urinário	42
5.6 Osmolalidade Urinária	44
5.7 Evolução dos pesos dos animais	46
5.8 Relação peso dos rins/ peso do rato	48
5.9 Análise morfológica	50
5.10 Determinação dos níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)	54
6 DISCUSSÃO	56
7 CONCLUSÕES	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Creatinina plasmática (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina ou cisplatina.....	38
Figura 2 – Creatinina urinária (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a administração i.p. de salina ou cisplatina	40
Figura 3 – “Clearance” da creatinina (ml/min/100g peso do rato) dos animais sacrificados 5 dias após a administração i.p. de salina ou cisplatina.....	42
Figura 4 – Fluxo urinário (ml/ 24h) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração i.p. de salina ou cisplatina.....	44
Figura 5 – Osmolalidade urinária (mOsm/ kgH ₂ O) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração i.p. de salina ou cisplatina.....	46
Figura 6 – Evolução do peso dos animais durante todos os dias do experimento.....	48
Figura 7 – Peso relativo dos rins (% de peso dos rins com relação ao peso corpóreo) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração i.p.de salina ou cisplatina.....	50
Figura 8 – Corte histológico de rim de rato, mostrando a região medular externa (ME) 5 dias após a injeção de salina ou cisplatina.....	54
Figura 9 –Níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (nMol/ g proteína) dos animais sacrificados 48 horas após a administração i.p. de salina ou cisplatina.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Análise histológica dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina ou cisplatina.....	53
---	----

RESUMO

A quercetina (3,5,7,3',4'- pentahidroxi flavona), o flavonóide mais abundante comumente presente em várias frutas e vegetais é um potente antioxidante, devido às suas propriedades de seqüestrar radicais livres de oxigênio e inibir a peroxidação lipídica *in vitro*. A cisplatina (*cis*- diaminodicloroplatina II), um potente agente antineoplásico utilizado especialmente no tratamento de tumores sólidos, têm seu uso clínico limitado devido a seus efeitos colaterais como dano renal, toxicidade intestinal e supressão da medula óssea. Neste estudo foi avaliado o efeito de doses múltiplas do flavonóide quercetina sobre os danos oxidativos induzidos pela cisplatina em ratos machos Wistar, por meio da peroxidação lipídica. Para avaliar o efeito nefrotóxico induzido pela cisplatina foram determinados o volume e osmolalidade urinária, creatinina urinária e plasmática e "clearance" da creatinina. Os animais foram divididos em seis grupos de tratamento: *Grupo Controle* (água por gavagem e salina intraperitoneal), *Grupo Controle Propilenoglicol* (propilenoglicol por gavagem e salina intraperitoneal), *Grupo Controle Quercetina* (quercetina por gavagem e salina intraperitoneal), *Grupo Cisplatina* (água por gavagem e cisplatina intraperitoneal), *Grupo Propilenoglicol + Cisplatina* (propilenoglicol por gavagem e cisplatina intraperitoneal), *Grupo Quercetina + Cisplatina* (quercetina por gavagem e cisplatina intraperitoneal). A dose de cisplatina (5 mg/kg peso corpóreo) foi injetada intraperitonealmente 2, 5 e 20 dias antes do sacrifício dos animais. A quercetina (50 mg/kg peso corpóreo) foi administrada por gavagem diariamente. O pré-tratamento com a quercetina atenuou a lesão renal induzida pela cisplatina,

reduziu significativamente as alterações histológicas e bioquímicas e se revelou capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida 48 horas após a administração da cisplatina. Estes resultados sugerem que a quercetina pode ser um importante agente usado para redução da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina.

SUMMARY

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone), one of the most abundant flavonoid commonly present in most edible fruits and vegetables is a potent antioxidant having oxygen radical scavenging properties and inhibit lipid peroxidation *in vitro*. Cisplatin (*cis*- dichlorodiammine platinum II), a potent anticancer agent especially used in the treatment of solid tumor have its clinical use often limited by its adverse effects including renal impairment, intestinal toxicity and mielosuppression. In this study we evaluated the role of the flavonoid quercetin on cisplatin-induced oxidative damage in Wistar rats through lipid peroxidation. To evaluate the cisplatin-induced nephrotoxicity, urinary volume was measured and plasmatic creatinine and creatinine clearance were determined. The animals were divided into six groups: *Control Group* (water by gavage and saline intraperitoneally), *Quercetin Group* (quercetin by gavage and saline intraperitoneally), *Propilenoglicol Group* (propilenoglicol by gavage and saline intraperitoneally), *Cisplatin Group* (water by gavage and cisplatin intraperitoneally), *Quercetin + Cisplatin Group* (quercetin by gavage and cisplatin intraperitoneally), *Propilenoglicol + Cisplatin Group* (propilenoglicol by gavage and cisplatin intraperitoneally). The dose of cisplatin (5 mg kg^{-1} body weight) was injected i.p., 2, 5 and 20 days before the sacrifice the animals. The quercetin (50 mgkg^{-1} body weight) was given daily by gavage. The pre-treatment with quercetin reduced the histological and biochemical alterations and resulted in significant reduction in the lipid peroxidation 48 hours after cisplatin administration. The results suggest that quercetin may be used for reducing cisplatin-induced nephrotoxicity.

1 INTRODUÇÃO

Os flavonóides são compostos fenólicos que diferem entre si em sua estrutura química e características particulares (MORAND et al., 1998), são encontrados em frutas, vegetais, grãos, flores, chá e vinho (MIDDLETON, 1998). Mais de 4000 variedades de flavonóides já foram identificadas e muitas delas relacionadas com as cores atrativas das flores, frutas e folhas (DE GROOT e RAVEN, 1998). Embora geralmente não sejam considerados nutrientes são importantes componentes da dieta humana (PIETTA, 2000) e nos últimos anos tem-se observado que estes compostos podem agir em vários sistemas biológicos, apresentando ações antioxidantes, antiinflamatórias, antivirais, e anticancerígenas (MIDDLETON e TERAMURA, 1993; RICE-EVANS et al., 1997).

Os flavonóides são agentes antioxidantes devido às suas propriedades de seqüestrar radicais livres e quelar íons de metais (KANDSWAMI e MIDDLETON, 1994), protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica.

Os flavonóides estão presentes diariamente na dieta humana (HERTOG et al., 1993) e seu consumo pode variar entre 50-800 mg/dia, dependendo do consumo de vegetais e frutas, e de fontes específicas, como vinho tinto, chá e cerveja (LARSON, 1988). A quercetina representa cerca de 95% do total de flavonóides ingeridos (KNEKT et al., 1997), sendo particularmente abundante na cebola, maçã e brócolis (NIJEVELDT et al., 2001). Ela apresenta propriedades de quelar e estabilizar o ferro. A inibição da peroxidação lipídica é outra proteção já mensurada (SORATA et al., 1984).

A cisplatina (*cis*-diaminodicloroplatina II) é um complexo de coordenação inorgânica, com configuração plana cujo isômero *cis*, apresenta uma gama abrangente de atividades antineoplásicas (PRESTAYKO et al., 1979), tendo porém seu uso clínico limitado, devido a efeitos colaterais que apresenta, tais como nefrotoxicidade e supressão da medula óssea dentre outros (ROSENBERG, 1985; EDELWEISS et al., 1995; BOKEMEYER et al., 1996; DEHNE et al., 2001).

Após administração intravenosa, náuseas e vômitos constituem a principal toxicidade aguda desse fármaco. A cisplatina possui efeito relativamente reduzido sobre a medula óssea, porém pode provocar disfunção renal significativa e, em certos casos, disfunção do nervo acústico. A hidratação com infusão de solução salina, isoladamente ou com manitol e outros diuréticos, parece minimizar sua nefrotoxicidade (SALMON e SARTORELLI, 1998).

A eliminação da cisplatina se dá em três fases. Inicialmente há uma meia-vida de 20-30 minutos, seguida de outra de aproximadamente 60 minutos e uma final de cerca de 24 horas (REED e KOHN, 1990). As primeiras duas fases, durante as quais a droga livre é excretada, dependem da função renal, principalmente da filtração glomerular, mas também da secreção tubular (JACOBS et al, 1980).

A cisplatina acumula-se no fígado, baço e principalmente nos rins, onde concentrações substancialmente altas ultrapassam aquelas encontradas no plasma e em outros órgãos (SAFIRSTEIN et al., 1986). O acúmulo renal de cisplatina provavelmente envolve a função excretora do rim, pois a maior parte desse fármaco e/ou seus metabólitos são eliminados pela urina (LITTERST et al, 1976) já que quase nenhuma excreção ocorre pelas fezes (ROSENBERG, 1985).

No rim, a cisplatina tende a acumular-se na medula renal externa e no córtex interno (DAYE, 1991). Manifestações da nefrotoxicidade da cisplatina incluem redução da taxa de filtração glomerular (MADIA e HARRINGTON, 1978) e aparecimento de necroses não específicas nos túbulos proximais e ductos coletores, conforme observado em estudos histopatológicos (HARDAKER et al., 1974).

Considerando-se a importância do uso da cisplatina como fármaco antineoplásico efetivo e as limitações devidas à sua nefrotoxicidade, assim como o possível efeito protetor da quercetina, já salientado por vários pesquisadores (HOFFMANN et al., 1990; KUHLMANN et al., 1998; SHOSKES, 1998), consideramos oportuno e necessário realizar estudos visando comprovar a eficiência deste composto como coadjuvante da cisplatina no tratamento de cânceres.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Flavonóides

Os flavonóides pertencem a uma classe de compostos naturais que têm sido alvo de considerável interesse científico e terapêutico. Eles são um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável, encontrados em frutas, vegetais, raízes, grãos, nozes, flores, chás e vinho (NIJEVELD et al., 2001). Estão presentes somente nas células de plantas verdes e são formados a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina, pela combinação com unidades de acetato. Estas substâncias podem participar do processo fotossintético (MUKOHATA, 1978), entretanto, não há evidências, até o momento, que demonstrem participação direta deste composto no processo de fotossíntese (HAVSTEEN, 2002).

Estes compostos são qualitativa e quantitativamente um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos. Mais de 4000 variedades de flavonóides já foram identificadas e muitas delas relacionadas com as cores atrativas das flores, frutas e folhas. Como a maioria dos flavonóides são pigmentos, suas cores são associadas a algumas funções biológicas importantes. Todas as cores do espectro, incluindo a região UV, são representadas no espectro dos flavonóides (DE GROOT e RAVEN, 1998).

A quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) é o principal flavonóide presente na dieta humana e seu consumo diário estimado varia entre 50 e 500 mg (DESCHNER et al., 1991). A ingestão da população brasileira é estimada entre 60 a 106 mg/ dia (ARABBI et al., 2004). Nos alimentos, a quercetina está geralmente

presente na sua forma glicosilada, sendo absorvida pelo trato gastrointestinal e excretada pela bile e urina.

Várias propriedades terapêuticas dos flavonóides, particularmente da quercetina, têm sido estudadas nas últimas décadas, destacando-se o potencial antioxidante, anticarcinogênico e seus efeitos protetores nos sistemas renal, cardiovascular e hepático.

2.1.1 Estrutura química

O termo flavonóide é um nome coletivo dado para pigmentos de plantas derivados do benzo- γ -pirona (HAVSTEEN, 2002). Consistem de um esqueleto de difenil propano ($C_6C_3C_6$) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 1).

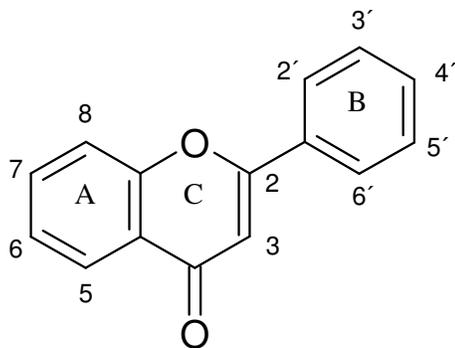


Figura 1 - Estrutura básica dos flavonóides. A quercetina possui substituintes -OH nas posições 3, 5, 7, 3', 4'.

Os flavonóides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos, ou como parte de outras estruturas que contenham flavonóides, como flavolignanas, porém frequentemente ocorrem como glicosídeos. Eles podem ser subdivididos em 13

classes, com mais de 5000 compostos descritos até 1990. As subclasses de flavonóides são: calconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas (apegenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandioli, antocianidina, isoflavonóides (genisteína, daizdeína), bioflavonóides e proantocianinas (BRAVO, 1998).

2.1.2 Consumo e fontes alimentares

Os flavonóides são importantes componentes da dieta humana, embora geralmente sejam considerados não nutrientes (substâncias sem valor nutritivo) (PIETTA, 2000). Participam da dieta humana, porém uma quantificação mais exata do total de flavonóides ingeridos é difícil devido à falta de tabelas com dados a respeito de sua distribuição nos alimentos (HOLLMAN e KATAN, 1999). O consumo total estimado varia de 26 mg a 1 g/dia (HERTOG et al., 1993; SESSO et al., 2003), de acordo com o consumo de suas fontes específicas, como vinho tinto, chá preto, cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis), grãos, nozes, sementes e especiarias. A quercetina, o mais abundante flavonóide da dieta humana, representa cerca de 95% do total de flavonóides ingeridos (KNEKT et al., 1997), sendo encontrado principalmente na cebola, maçã e brócolis (NIJEVELDT et al., 2001).

A distribuição da quantidade de flavonóides consumidos diariamente inclui: 44 mg de cereais; 79 mg de batatas, bulbos; 45 mg de grãos e nozes; 162 mg de vegetais e ervas. A maior parte do consumo de flavonóides vem do cacau, cola,

café, chá preto, cerveja e vinho (420 mg/ dia), com um adicional de 290 mg/ dia de frutas e sucos (PIERPOINT, 1986).

HERTOG et al. (1992), encontraram altas concentrações de quercetina em cebolas (284-486 mg/ kg), couve (100 mg/ kg), vagem (32-45 mg/ kg), brócolis (30 mg/ kg), repolho (14 mg/ kg) e tomate (8mg/ kg). Entre as frutas examinadas, a concentração média de quercetina foi em torno de 15 mg/ kg, sendo a maior, encontrada na maçã (21-72 mg/ kg). Em bebidas como cerveja, café, achocolatado e vinho branco é de aproximadamente 1 mg/ l, vinho tinto 4-16 mg/l, suco de limão 7 mg/ l, suco de tomate 3 mg/ l, demais sucos 5 mg/ l. Chá preto é a bebida que apresenta maior concentração de quercetina, em torno de 10-25 mg/ l.

2.1.3 Metabolismo e biodisponibilidade

O consumo dietético de polifenóis, incluindo os flavonóides, sua biodisponibilidade e os fatores que interferem nesta é um assunto que vem sendo amplamente estudado. A absorção intestinal e o metabolismo da quercetina dietética e de outros flavonóides não estão elucidados até o momento, assim os eventos do trato intestinal precisam ser esclarecidos em ordem, para compreender os efeitos potenciais desse componente dietético. A avaliação da extensão da absorção e do metabolismo intestinal da quercetina glicosídeo é essencial para analisar sua função fisiológica. É geralmente reconhecido que os flavonóides na forma glicosídica intactos são dificilmente absorvidos pelo intestino delgado porque a posição do grupamento açúcar eleva sua hidrofília. Acredita-se que a forma glicosídica de flavonóides passe pelo intestino delgado e entre no ceco e

cólon, ali são hidrolizados para forma aglicona pelas enterobactérias. Os flavonóides na forma aglicona podem ser absorvidos mais facilmente pelas células epiteliais no intestino grosso, porque sua lipofilia facilita a passagem pela camada fosfolipídica da membrana celular. Depois disso, eles entram na circulação e são submetidos a *o*-metilação, glucoronidação, e/ ou sulfatação no fígado. Uma parte substancial desse metabólito pode então ser excretado na bile e retornar para o lúmen intestinal. Outra vez, ele é hidrolizado, reabsorvido pelas células intestinais e excretado pelas fezes (MUROTA e TERAQ, 2003).

Muitos estudos relatam que os flavonóides em sua forma livre ou glicosilada são absorvidos pelo trato gastrintestinal e metabolizados a glucoronidato ou sulfato conjugado. Estes metabólitos circulam no sangue e são excretados pela bile e urina. A quercetina é completamente convertida a conjugados metilados no plasma após sua administração, tanto em ratos como em seres humanos (MANACH et al., 1995; SESINK et al., 2001).

Na microflora intestinal a quercetina é absorvida e excretada pela bile e urina como glucoronidato e sulfato conjugado dentro de 48 horas, depois disto ela é degradada pelas bactérias intestinais como ácido fenólico, ácido 3-hidroxifenilacético e ácido 3,4-dihidroxifenilacético dentro do anel B. Seres humanos absorvem quantidades apreciáveis de quercetina. Utilizando pacientes ileostomizados voluntários, HOLLMAN et al. (1995) demonstraram que a quercetina glicosilada de cebolas foi absorvida mais eficientemente do que na sua forma aglicona; eles sugerem que o transportador de glicose é responsável pela eficiência do transporte de quercetina glicosídeo pelas células epiteliais intestinais.

A absorção dos flavonóides em seres humanos é controversa. Ao contrário de HOLLMAN et al. (1995), CRESPIY et al. (1999), em estudo de perfusão *in situ* no intestino delgado de ratos, demonstraram que a rutina foi dificilmente absorvida comparada com a quercetina aglicona, uma vez que a rutina é preferivelmente digerida no intestino grosso pela microflora intestinal.

Recentemente foi demonstrado que uma quantidade significativa de quercetina é absorvida. Em seres humanos, após a ingestão periódica de quercetina glicosilada de cebolas os metabólitos conjugados acumulam-se no plasma (MANACH et al.,1998; MOON et al. 2000). O nível plasmático máximo de quercetina foi observado 8 horas após a administração da sua forma aglicona (SHIMOI et al. 2003).

A absorção da quercetina depende da solubilidade do veículo usado para administração, ela não é solúvel na água. PISKULA e TERAIO (1998) encontraram que a absorção mais rápida foi quando o propilenoglicol foi usado como veículo, sendo o nível plasmático máximo observado 30 minutos após a administração.

Ao contrário de outros órgãos extra hepáticos, como intestino e rins, o estômago é muitas vezes ignorado como órgão metabolizador, embora algumas vezes seja reconhecido como local de absorção de diferentes compostos. Em estudo com ratos, a quercetina glicosilada não foi hidrolizada e absorvida no estômago, ao contrário de sua forma aglicona que pode ser parcialmente absorvida por este tecido. Como a quercetina nos alimentos é mais abundante na forma glicosilada, a contribuição do estômago para absorção deste composto é limitada. Entretanto, alguns processos, como a fermentação de uvas do vinho que

liberam a forma aglicona e glicosilada podem levar a uma absorção eficaz da quercetina no estômago (CRESPY et al., 2002).

2.1.4 Mecanismo antioxidante

Os flavonóides são antioxidantes efetivos por suas propriedades de seqüestrar radicais livres e quelar íons de metais (KANDSWAMI e MIDDLETON, 1994), protegendo assim os tecidos destes radicais e da peroxidação lipídica. Sua propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Além destes efeitos importantes, eles têm propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (GALATI et al., 2002). Particularmente, a quercetina seqüestra radicais de oxigênio, como $\cdot\text{OH}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$, inibe a xantina oxidase e a peroxidação lipídica. O radical hidroxil e o ânion superóxido, estão envolvidos no dano tecidual pela iniciação da peroxidação lipídica e desrupção da matriz intersticial (KAHRAMAN et al., 2003 a). A quercetina é conhecida também pelas suas propriedades de quelar e estabilizar o ferro (SORATA et al., 1984).

Muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos e os flavonóides praticamente exercem todos eles. Esses mecanismos antioxidantes incluem: a) opressão da formação de espécies reativas ao oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (como ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase), ou por quelar íons de metais (os quais podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela Reação de Fenton ou Harber-Weis); b)

seqüestrando radicais; c) regulando positivamente ou protegendo as defesas antioxidantes por induzir a fase II de enzimas como glutathione transferase que aumenta a excreção de espécies oxidadas ou pela indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína (uma proteína queladora de metais, com propriedades antioxidantes) (MIDDLETON et al., 2000; PIETTA, 2000).

A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres em três estágios diferentes: na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos) (AFANAS'EV et al., 1989).

Embora as propriedades antioxidantes dos flavonóides apresentem um papel positivo na nutrição humana e prevenção de doenças, alguns estudos têm demonstrado a atividade pró-oxidante destes compostos *in vitro*. Extratos concentrados de plantas ricas em flavonóides, própolis, folhas de chá verde, isoflavonas da soja e semente de uva são amplamente difundidos como nutracêuticos para populações e indivíduos com doença cardiovascular, câncer e condições inflamatórias crônicas. Assim, relatos da mutagenicidade baseados no dano oxidativo mediado pelos flavonóides recebem grande interesse (HEIM et al., 2002).

Os fenóis, entre eles os flavonóides, podem atuar como pró-oxidantes por quelar metais de uma maneira que mantêm ou aumenta sua atividade catalítica ou por reduzir metais, aumentando sua capacidade de formar radicais livres de peróxidos. O pH dos tecidos biológicos também é um fator que pode influenciar a atividade antioxidante dos fenóis (DECKER, 1997).

A atividade pró-oxidante dos flavonóides é diretamente proporcional ao número total de grupos hidroxil (CAO et al., 1997). No trabalho de HANASAKI et al. (1994) uma série de mono e dihidroxiflavonóides demonstraram não possuir atividade pró-oxidante detectável, enquanto que múltiplos grupos hidroxil, especialmente no anel B, aumentaram significativamente a produção de radicais hidroxil no sistema de Fenton. Esse efeito pró-oxidante é responsável pelos efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos dos flavonóides isolados de várias ervas medicinais (UEDA et al., 2002). Essas informações sugerem que o mesmo atributo estrutural que melhora a capacidade antioxidante pode exacerbar o estresse oxidativo e o dano funcional e estrutural das moléculas celulares.

As evidências de que os flavonóides dietéticos são benéficos à saúde são muitas, entretanto, a relação entre sua bioatividade e suas propriedades antioxidantes requer mais estudos. O fato dos flavonóides poderem atuar como pró e antioxidantes indica que em certas condições e em certos tecidos, eles podem oferecer mais riscos oxidativos do que benefícios. Porém, as alterações metabólicas da estrutura podem atenuar essa reatividade *in vivo* (HEIM et al., 2002).

2.1.5 Flavonóides e Câncer

O câncer pode ser considerado uma doença genética causada pela aquisição seqüencial de mutações em genes implicados na proliferação e morte celular, aumentando o dano do DNA. Esse dano pode resultar em processos endógenos, como erros na duplicação do DNA, instabilidade química intrínseca de certas bases do DNA ou pelo ataque de radicais livres gerados durante o

metabolismo. O dano no DNA pode resultar de interações com agentes exógenos como radiação ionizante, radiação ultravioleta, carcinogênese química ou agentes biológicos tais como vírus (LÓPEZ-LÁZARO, 2002).

O câncer é uma síndrome que envolve várias etapas, em geral alinhadas em três estágios definidos como iniciação, promoção e progressão. Diversos trabalhos procuram estabelecer uma associação entre a ingestão e/ou níveis séricos de nutrientes específicos e o risco de câncer (KNEKT et al., 1997; FLAGG et al., 1995; ZIEGLER et al., 1996). Contudo, é difícil determinar até que ponto o consumo de um único nutriente pode interferir na quimioprevenção do câncer, pois o efeito observado pode ser resultante da ação ou interação de outros componentes dos alimentos (DOLL, 1996).

A terapia convencional do câncer é baseada na cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou na combinação delas. Geralmente, as duas primeiras são recomendadas para o tratamento de tumores localizados, enquanto a quimioterapia é utilizada em células cancerígenas espalhadas pelo corpo. A quimioterapia pode matar células cancerosas, bloqueando a síntese de DNA por meio da sua ligação com o DNA, ou inibindo a síntese de RNA, síntese de proteínas ou formação microtubular. Como os fármacos antineoplásicos não poupam as células normais de sua ação devastadora, diversos efeitos tóxicos importantes podem acometer os pacientes (LÓPEZ-LÁZARO, 2002).

Uma proposta de terapia complementar recomendada para pacientes oncológicos durante o tratamento neoplásico citoreduzidor é o uso de antioxidantes. É aceito que os antioxidantes podem ser úteis na redução dos efeitos colaterais da quimioterapia e radioterapia, por reduzir sua toxicidade. Contudo, há divergências

quanto ao seu uso, pois acredita-se que os antioxidantes poderiam reduzir a eficiência dos tratamentos radio ou quimioterápico sobre as células cancerosas (WEIJ et al., 1997). Há evidências de que os antioxidantes podem ser uma escolha para intervenção terapêutica junto com a quimioterapia, por demonstrar benefícios na redução do tamanho do tumor e um aumento na longevidade (DRISKO et al., 2003).

Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar radicais livres (DECKER, 1997).

Diferentes flavonóides podem atuar em vários níveis do processo de câncer. Se o dano no DNA causando a mutação dos genes implicados na morte e proliferação celular é considerado a causa do câncer, sua prevenção é possível quando a mutação é prevenida. Assim, os flavonóides podem inibir a carcinogenicidade induzida quimicamente, incluindo a geração de radicais livres durante o processo endógeno; pela radiação ultravioleta e de raio X; pela bactéria *Helicobacter pylori*, a qual causa úlcera de estômago e está associada com o desenvolvimento de câncer de estômago; ou alguns vírus causadores do câncer (LÓPEZ-LÁZARO, 2002).

Uma variedade de compostos polifenólicos originários da dieta são conhecidos por inibir o câncer. A atividade antioxidante dos polifenóis é reconhecida e pode ser responsável por vários benefícios à saúde (YANG et al., 2001).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma associação inversa entre consumo de frutas e verduras e risco de determinados cânceres, mas é muito improvável que apenas uma substância seja responsável por todas essas associações encontradas. A combinação de dois flavonóides, genisteína e quercetina, produziu uma ação sinérgica anticâncer em células de carcinoma de ovário (SHEN e WEBER, 1997).

A quercetina possui várias características que a tornam um potente composto antitumoral, incluindo: regulação do ciclo celular, interação com os locais de ligação do estrogênio tipo II, inversão da resistência à drogas e indução da apoptose de células tumorais. Adicionalmente, a quercetina inibe eficientemente a atividade da tirosina quinase (YOSHIDA et al., 1990; XIAO et al., 1998).

Os estágios de iniciação e promoção do câncer de pele foram bloqueados quando a quercetina foi administrada 30 minutos antes da aplicação do indutor 12-o-tetradecanoil forbol-13-acetato (TPA). Por bloquear a promoção do tumor de pele, a quercetina é considerada um efetivo agente preventivo do câncer de pele. Entretanto, é observado que baixas doses de quercetina podem bloquear a transformação de células da linhagem TPA/ metilcolanteno, enquanto que altas doses aumentam sua transformação. A atividade antitumoral da quercetina é relatada pela sua capacidade de favorecer a comunicação “gap” entre as células isoladas estimuladas pelos promotores do tumor. A ação antiproliferativa pode ser resultado da redução química dos receptores do ester de forbol (TPA) na pele do rato pela quercetina (FORMICA e REGELSON, 1995).

Usando linhagens celulares do tipo MDA-MB468 de tumor mamário humano, AVILA et al. (1994) encontraram que a quercetina inibiu a proliferação celular. Especificamente, no nível de tradução, a quercetina inibiu a atividade da proteína p53, resultando no aumento de células bloqueadas nas fases G₂-M do ciclo celular.

KNEKT et al. (1997) encontraram uma relação inversa entre consumo de flavonóides e incidência de câncer de pulmão, em homens e mulheres acima de 20 anos, sendo que a quercetina representava cerca de 95% do consumo de flavonóides neste estudo.

2.1.6 Quercetina e proteção da função renal

Como compostos naturais presentes abundantemente na nutrição humana, os flavonóides são uma classe interessante de substâncias com potencial de atividade nefroprotetora e que promovem a preservação do organismo. Estudo *in vitro* demonstrou que o pré tratamento com quercetina leva a um aumento significativo da sobrevivência celular quando há falência renal induzida, sendo o resultado dose dependente (AHLENSTIEL et al., 2003).

Os flavonóides são agentes com propriedades imunossupressoras e nefroprotetoras. Em um estudo experimental em ratos, o pré tratamento com quercetina resultou na preservação da integridade histológica renal com diminuição do dano tubular e inflamação intersticial (SHOSKES, 1998).

KUHLMANN et al. (1998) demonstraram que a quercetina protege as células epiteliais renais da toxicidade da cisplatina *in vitro*. Este estudo mostrou as propriedades citoprotetoras da quercetina contra o dano funcional e estrutural

causado pela cisplatina. Foi encontrada uma proteção dose dependente, sendo que níveis de quercetina entre 50 a 100 μ M foram os que apresentaram resultados mais eficazes.

KAHRAMAN et al. (2003 b) encontraram que o pré tratamento com quercetina (50 mg/kg) 60 minutos antes da indução da isquemia/ reperfusão renal, em ratos, provocou diminuição no nível das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, no fator α de necrose tumoral, na atividade da mieloperoxidase e no conteúdo de proteína carbonil. Promoveu ainda aumento dos níveis de glutathione e atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase em comparação com o grupo que sofreu a indução mas não recebeu o tratamento.

2.2 Cisplatina

A cisplatina (*cis*- diaminodicloroplatina II) é um complexo de platina efetivo na quimioterapia quando administrada por via intraperitoneal ou intravenosa (ROSENBERG, 1985). Foi introduzida na clínica em 1971, representando uma nova classe de potentes agentes antineoplásicos, os complexos coordenados de platina (DE CONTI et al., 1973).

Quimicamente, a cisplatina é um complexo coordenado neutro, quadrado planar com dois grupos cloretos e duas moléculas de amônia, relativamente inertes na configuração *cis*. A configuração *cis* e o fato do complexo ser neutro são critérios fundamentais para sua atividade antineoplásica (HALABE et al., 1991).

Este fármaco, cuja atividade biológica foi descoberta por Rosenberg et al. em 1965, tem apresentado potencial terapêutico em grande variedade de neoplasias humanas. É um dos agentes citoredutores mais eficazes no tratamento de vários tumores, sendo particularmente eficaz no tratamento dos tumores do testículo, ovário, cabeça, pescoço, melanomas malignos, carcinomas da bexiga e do pulmão (CARTEI et al., 1993; CONTE et al., 1996; AL-SARRAF et al., 1997). Contudo, seu uso clínico está limitado devido ao surgimento de efeitos colaterais peculiares, tais como a ototoxicidade e a nefrotoxicidade.

O primeiro trabalho mostrando a potente atividade anticâncer da cisplatina em seres humanos, foi apresentado em 1972. Nos anos seguintes, vários estudos demonstraram que a cisplatina tinha uma potente ação contra neoplasias malignas em pacientes considerados terminais e não responsivos às terapêuticas anteriormente utilizadas (HILL et al., 1975).

2.2.1 Toxicidade e Nefrotoxicidade da Cisplatina

A platina, como o mercúrio, chumbo, cádmio e urânio, pertence ao grupo dos metais pesados. Tendo em vista sua potencial sobrevida depois do tratamento com a cisplatina, os efeitos tóxicos deste agente merecem atenção especial. Os metais pesados, em geral, e a platina em particular, são nefrotóxicos, sendo seu uso, muitas vezes, acompanhado por lesão morfológica ou funcional nos rins.

É provável que a causa direta mais comum de Insuficiência Renal Aguda (IRA) em pacientes com câncer, seja a administração da cisplatina. Esta toxicidade orgânica é a que mais interfere com a vida normal dos pacientes, uma vez curados de sua neoplasia maligna (APPENROTH et al., 1990).

Os efeitos tóxicos da cisplatina foram observados primeiro em seres humanos e só depois estudados em modelos animais (ROSENBERG, 1985). Os principais efeitos colaterais são náuseas, vômitos, nefrotoxicidade, hipomagnesemia, neuropatia periférica, ototoxicidade e supressão da medula óssea. (MEYER e MADIAS, 1994).

A nefrotoxicidade causada pelo fármaco é, geralmente, o efeito colateral limitante de seu uso, podendo ser classificada em aguda ou crônica (DE CONTI, 1973). A nefrotoxicidade aguda causada pela cisplatina é caracterizada pela diminuição da função mitocondrial (GORDON e GATTONE, 1986), diminuição da atividade da ATPase (UOZOMI e LITTERST, 1985), alteração do conteúdo de cátion na célula, transporte alterado de soluto, persistente perda de sódio, magnésio, potássio, cálcio, água; diminuição do fluxo sangüíneo renal; diminuição da taxa de filtração glomerular, aumento da creatinina sérica e aumento do nitrogênio uréico do sangue (SEGURO et al., 1989; BARROS et al., 1989).

A circulação renal responde às modificações do volume extracelular e débito cardíaco. A queda no fluxo sangüíneo renal é algumas vezes associada a uma diminuição na filtração glomerular. A falta de sinais de retrodifusão e obstrução leva a crer que na fase inicial da IRA induzida por cisplatina, o primeiro evento, responsável pela perda da função renal, é um decréscimo da filtração glomerular. Esta hipótese é confirmada por estudos de micropunção tubular (BARROS et al., 1989).

A nefrotoxicidade induzida pela cisplatina é iniciada pelo impedimento da reabsorção do sódio pelos túbulos proximais (FIELD et al., 1989).

O mecanismo exato de nefrotoxicidade da cisplatina é no entanto, pouco conhecido. Esta toxicidade tem sido analisada em muitos análogos da cisplatina, em modelos experimentais, na tentativa de ampliar a ação antineoplásica do fármaco e reduzir seus efeitos colaterais. Em todos, o dano renal é sempre menor que o provocado pela cisplatina, porém apresentam outras toxicidades orgânicas importantes (EDELWEISS, 1991).

Depois de um tratamento convencional de uma neoplasia maligna com cisplatina, quatro fases podem ser reconhecidas no desenvolvimento da toxicidade renal (FLEMING et al., 1979). A primeira é a fase tóxica aguda, durante ou logo após a infusão da primeira dose de cisplatina. A segunda é o estado tóxico existente, após o regime de indução. A terceira fase acontece após o período de tratamento de manutenção com cisplatina. A quarta situação a ser observada é aquela que ocorre, algumas vezes, depois de uma terapia descontínua, ou com a toxicidade crônica persistente do indivíduo curado de sua neoplasia maligna.

Os ratos apresentam uma nefrotoxicidade à cisplatina dose dependente (LITTERST et al., 1985). A diminuição da taxa de filtração glomerular, caracterizada pelos aumentos da creatinina sérica e o nitrogênio uréico são detectados 3 ou 4 dias após a administração de cisplatina (DAUGAARD, 1990), com pico nos dias 5 e 7, não ficando claro neste estudo a reversibilidade destas alterações após alguns dias. A filtração glomerular e o fluxo plasmático renal efetivo diminuem, levando a concluir que, nestes casos a isquemia renal pode explicar a IRA. Nos animais, as alterações morfológicas consistem em degeneração e tumefação de células tubulares nos dias 1 e 2, seguidos por necrose tubular nos dias 2 e 4 e, regeneração das células, tanto proximais quanto

distais, nos dias 5 a 8. Não foram vistas anormalidades nos glomérulos tanto na microscopia óptica (MO) ou eletrônica (ME) (CHOIE et al., 1981).

Usando cisplatina em dose única intraperitoneal em ratos, foi verificado que ocorrem acentuadas alterações morfológicas, seletivamente no segmento S₃ (último segmento da parte reta) do túbulo proximal, situado na medula externa (McCLAY e HOWELL, 1990). Neste modelo, os glomérulos, túbulos distais e coletores, ou estão normais, ou levemente alterados. Esta lesão evidencia-se mais em torno de 3 dias do uso do fármaco. A perda de microvilosidades, tumefação celular e necrose são as alterações descritas nesta fase. A regeneração se inicia após 7 dias (JONES et al., 1985).

As manifestações mais precoces de lesão são melhores observadas pela microscopia eletrônica. Elas consistem em dilatação do retículo endoplasmático e perda de ribossomas, diminuição no glicogênio celular e edema mitocondrial, com acúmulo de cálcio. As figuras de mielina observadas, resultam de estruturas fosfolipídicas das membranas lesadas. Alterações nucleares incluem condensação do material cromatídico que se isola da membrana nuclear (GONZALEZ-VITALE et al., 1977; CHOIE et al., 1981; JONES et al., 1985).

O início da lesão induzida por cisplatina pode ocorrer dentro de um curto período de tempo após sua administração. As discretas lesões observadas em células tubulares, 6 horas após a administração são segregação nuclear e dispersão de ribossomas, descritas como sendo alterações precoces da toxicidade pela cisplatina (CHOIE et al., 1981; DOBYAN et al., 1986).

Em estudos clínicos, o efeito nefrotóxico da cisplatina tem sido demonstrado como indutor de necrose tubular de túbulos contorcidos distais e coletores (SEGURO et al., 1989).

Há relatos de um decréscimo de até 52% no fluxo sanguíneo renal, entre 2 e 3 dias do uso de cisplatina (SAFIRSTEIN, 1981, 1984), e de uma redução na filtração glomerular de 50%, após 4 dias do uso de cisplatina. Este fato é devido a uma maior resistência vascular renal, decorrente de vasoconstrição da arteríola aferente (BARROS et al., 1989).

Além da eliminação por filtração glomerular, a cisplatina pode também ser secretada no túbulo renal. Estudos farmacocinéticos, usando platina, correlacionaram a filtração desta com a de creatinina, e concluíram que a secreção pode ocorrer com a cisplatina, ou, mais provavelmente, com algum metabólito dessa (JACOBS et al., 1980). Ocorre que a porção S₃ do túbulo proximal é a mais relacionada com a secreção tubular, sendo esta a mais lesada pela cisplatina. Nestes mesmos estudos, observa-se que a maior concentração do fármaco, realizado por dosagens em espectrofotômetro de absorção atômica, ocorre na porção S₃ do túbulo proximal (GONZALEZ-VITALE et al., 1977).

2.2.2 Influência das espécies reativas de oxigênio

O mecanismo pelo qual os compostos de platina induzem danos nas células renais ainda não está completamente esclarecido (LEIBBRANDT e WOLFGANG, 1995). Entretanto, a produção de radicais livres de oxigênio nas células tubulares dos rins têm sido considerada um processo patológico

importante na nefrotoxicidade provocada pela cisplatina (HANNEMANN et al., 1988; ZHONG et al., 1990).

Evidências experimentais mostram que os radicais livres de oxigênio podem exercer um papel importante em várias doenças renais (SHAH, 1989). As principais formas reativas do oxigênio são: o superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estes radicais podem ser gerados no citoplasma, na mitocôndria ou no núcleo das células (ANDERSON, 1996). A concentração intracelular de radicais livres pode ser aumentada pela maior geração desses radicais ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1994).

A aceitação de que os radicais livres são responsáveis pela indução de várias doenças renais está apoiada em duas linhas de evidências experimentais, sendo pela detecção de produtos resultantes dos danos oxidativos nos tecidos renais e na urina, ou pela demonstração experimental dos efeitos protetores de agentes que inibem a geração de radicais livres no rim (ICHIKAWA et al., 1994).

Alguns autores têm sugerido que o estresse oxidativo induzido pela cisplatina nos rins está associado com a toxicidade desse fármaco e que a peroxidação dos lipídios é um dos mecanismos envolvidos na sua nefrotoxicidade (SUGIHARA et al., 1987; HANNEMANN e BAUMANN, 1988; ZHANG e LINDUP, 1993).

2.2.3 Substâncias com ação protetora na lesão renal provocada pela cisplatina

Muitas estratégias têm sido adotadas na tentativa de reduzir a toxicidade da cisplatina. A maioria delas visa a redução da nefrotoxicidade relacionada à dose administrada (WALKER e GALE, 1981). Um programa de hidratação intensiva e concomitante diurese forçada, reduz drasticamente este efeito tóxico, sem perda da atividade anticâncer (DOLL e WEISS, 1985). O aumento do tempo de administração do fármaco (STEWART et al., 1985), ou o fracionamento da dose (STARK e HOWELL, 1978) também exercem efeito protetor.

A utilização da diurese induzida por manitol ou furosemida, tem sido efetiva na proteção da função renal (PERA et al., 1979). Subseqüentemente, prolongada vasoconstrição ou a obstrução do túbulo, retrodifusão do ultrafiltrado, assim como um decréscimo na permeabilidade glomerular podem ocorrer. Nesta fase, a correção do fluxo sangüíneo renal diminuído não restaura a filtração glomerular, indicando que os fatores causais da IRA, com o uso de cisplatina, não são exclusivamente isquêmicos (BITRAN et al., 1982; HALABE et al., 1991).

A cisplatina interfere com o metabolismo da água, através da hipófise, dificultando a liberação do hormônio anti-diurético. Tal fato ocorre um dia após o seu uso. No entanto, no oitavo dia, existe uma diminuição da resposta a este hormônio nas células renais, tornando-as resistentes (LITTERST et al., 1985).

Muita atenção tem sido dada para o importante papel dos antioxidantes na toxicidade induzida pela cisplatina (ANTUNES et al., 1999, 2000, 2001; FRANCESCATO et al., 2001; SILVA et al., 2001; MORA et al., 2003).

3 OBJETIVOS

- Verificar os efeitos nefrotóxicos imediatos (5 dias) e tardios (20 dias) da administração de cisplatina (5mg/kg, dose única), em ratos machos Wistar comparativamente a um grupo controle;
- Determinar os níveis de creatinina plasmática e urinária, “clearance” de creatinina, volume e osmolalidade urinária e verificar sua relação com as alterações da função renal provocadas pela cisplatina;
- Avaliar o efeito da administração de cisplatina nos níveis de peroxidação lipídica nos rins, 48 horas após sua injeção e o possível efeito protetor, de doses diárias, do flavonóide quercetina, administradas por gavagem (50 mg/ kg, dia), nas alterações bioquímicas e morfológicas decorrentes da injeção do quimioterápico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Neste estudo foram utilizados ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, com peso aproximado de 200g, fornecidos pelo Biotério Central, do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, divididos em 18 grupos com no mínimo 6 animais, sendo 6 grupos sacrificados após 2 dias da administração da cisplatina (grupos 1a, 2a, 3a, 4a, 5a e 6a), 6 grupos sacrificados 5 dias após a administração (grupos 1b, 2b, 3b, 4b, 5b e 6b) e os 6 grupos restantes após 20 dias da administração (grupos 1c, 2c, 3c, 4c, 5c e 6c).

4.1.1 Ensaio Biológico

Os experimentos foram realizados no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, iniciando após um período de dois dias para a adaptação dos animais. Seus pesos foram determinados diariamente para o cálculo das doses de cisplatina e quercetina a serem administradas.

Os animais durante 2 dias (grupos 1a, 2a, 3a, 4a, 5a e 6a), 5 dias (grupos 1b, 2b, 3b, 4b, 5b e 6b) e 20 dias (grupos 1c, 2c, 3c, 4c, 5c e 6c), após o início do experimento, foram mantidos em caixas de polietileno (máximo 4 animais/caixa) em uma sala com temperatura e ciclo de luz controlado (24°C; ciclo claro/escuro de 12h), recebendo ração comercial e água destilada *ad libitum*.

Nas 24 horas anteriores ao sacrifício, os animais dos dezoito grupos abaixo relacionados, eram transferidos em condições semelhantes, para gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável, que permitiam a coleta da urina.

Nos três casos (2, 5 e 20 dias) os grupos (a, b e c, respectivamente) foram divididos em:

1. Grupo Controle (C)

Esse grupo recebeu água por gavagem (1 ml/ animal), em duas ocasiões: 24 horas e 1 hora antes da administração intraperitoneal do diluente da cisplatina (solução salina NaCl 0,9%) e depois diariamente até 24 horas antes do sacrifício dos animais.

2. Grupo Controle Propilenoglicol (P)

Esse grupo recebeu propilenoglicol (1 ml/animal) por gavagem, também 24 horas e 1 hora antes da injeção de solução salina (NaCl, 0,9%) e depois diariamente até 24 horas antes do sacrifício dos animais.

3. Grupo Controle Quercetina (Q)

Esse grupo recebeu uma solução de quercetina (50mg/kg), a qual foi diluída em propilenoglicol administrada por gavagem, 24 horas e 1 hora antes da injeção intraperitoneal da solução salina (NaCl, 0,9%) e depois diariamente até 24 horas antes do sacrifício dos animais.

4. Grupo Cisplatina (Cis)

Esse grupo recebeu água deionizada por gavagem 24 horas e 1 hora antes da injeção intraperitoneal de cisplatina, contendo 5,0 mg/kg de peso (MASON e EDWARDS, 1985). A água deionizada por gavagem também foi administrada diariamente até 24 horas antes do sacrifício dos animais.

5. Grupo Propilenoglicol + Cisplatina (P + Cis)

Este grupo recebeu administração de propilenoglicol por gavagem, 24 horas e 1 hora antes (1 ml/animal) da injeção intraperitoneal de cisplatina (5,0 mg/kg) e depois diariamente até 24 horas antes do sacrifício dos animais.

6. Grupo Quercetina + Cisplatina (Q+Cis)

Esse grupo recebeu uma solução de quercetina por gavagem, 24 horas e 1 hora antes da administração intraperitoneal de cisplatina (5,0 mg/kg) (MASON e EDWARDS, 1985). A solução de quercetina em propilenoglicol continuou sendo administrada diariamente por gavagem até 24 horas antes do sacrifício dos animais.

As administrações intraperitoneais de cisplatina foram realizadas em dose única, enquanto as gavagens foram diárias. Nos ensaios mencionados foram utilizados o medicamento Platiniil® - solução injetável (Cisplatina laboratório Quiral Química do Brasil), diluído em solução de cloreto de sódio 0,9% e a quercetina

adquirida da Sigma (St. Louis, Co) dissolvida em propilenoglicol, ambas preparadas imediatamente antes do uso.

Os animais foram sacrificados por decapitação, sua urina e sangue coletados e os rins retirados para análise morfológica, conforme descrito a seguir:

Urina

A urina foi coletada em provetas graduadas, utilizando-se gaiolas metabólicas que permitiram a separação da urina e fezes durante as 24 horas anteriores ao sacrifício dos animais, que ocorreram após 5 (grupo b) e 20 dias (grupo c) a administração intraperitoneal de cisplatina, e então utilizada para as determinações dos níveis de creatinina e osmolalidade.

Plasma

O sangue dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração de cisplatina era coletado com o auxílio de um funil em um tubo heparinizado e em seguida o plasma era separado por centrifugação para subsequente determinação dos níveis de creatinina plasmática.

Rins

Ao final do experimento os animais foram sacrificados por decapitação, 2 (grupo a), 5 (grupo b) ou 20 dias (grupo c), após a administração da cisplatina. Os rins foram retirados logo após o sacrifício para a realização do estudo morfológico (rim esquerdo) e para a determinação dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (rim direito).

No caso da determinação dos níveis renais das SRATB, somente foram utilizados os rins dos animais sacrificados 48 horas após a administração intraperitoneal da cisplatina.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da variação dos pesos dos animais

Os animais foram pesados diariamente em balança digital Micronal B 600.

4.2.2 Determinação do volume urinário

Nas 24 horas anteriores ao sacrifício, os animais eram colocados em gaiolas metabólicas individuais e a urina coletada em provetas graduadas onde seu volume era determinado. Na saída da gaiola metabólica foi utilizado papel de filtro para evitar eventual presença de resíduos sólidos na urina.

4.2.3 Determinação do peso dos rins

Imediatamente após o sacrifício dos animais era realizada a abertura da cavidade abdominal para retirada dos rins. Em seguida, foram devidamente pesados em balança Micronal B 600, embrulhados em papel alumínio e colocados em recipientes contendo gelo picado.

4.2.4 Dosagens Bioquímicas

4.2.4.1 Dosagem de creatinina urinária e plasmática

Para a análise de creatinina urinária e plasmática foi utilizado o kit Labetest[®] (Diagnóstica S.A.). As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 510 nm utilizando-se espectrofotômetro Micronal-digital modelo B342II e os resultados expressos em mg de creatinina por 100 ml de urina ou plasma.

4.2.4.2 “Clearance” de Creatinina

O “clearance” de creatinina foi calculado a partir dos dados de creatinina urinária, creatinina plasmática, volume da urina e peso dos ratos (RAO e RAO, 1998), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Cálculo} = \frac{C_u}{C_p} \times \frac{V_u}{t} \times \frac{100}{p}, \text{ onde:}$$

C_u = creatinina urinária (mg/dl)

C_p = creatinina plasmática (mg/dl)

V_u = volume de urina (ml)

t = tempo de coleta da urina (minutos)

p = peso do rato (gramas)

O resultado foi expresso em ml/min/100g de peso do animal.

4.2.4.3 Osmolalidade Urinária

A osmolalidade foi dosada na urina colhida dos animais durante as últimas 24 horas de vida. A dosagem foi realizada em aparelho Fiske Osmometer e os resultados expressos em mOsm/kg de água.

4.2.4.4 Níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)

O método para avaliação de peroxidação lipídica por determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) dentre elas, o malonaldeído (MDA) foi o preconizado por UCHIYAMA e MIHARA (1978). Nesse sentido, o rim direito extraído (mantido em gelo picado) foi cortado em pedaços pequenos e pesado cuidadosamente 0,25 g, aos quais eram então adicionados 5,0 ml de solução gelada de KCl 1,15%, para obtenção de um homogenato a 5,0%. Eram então pipetados 0,5 ml do homogenato em 3,0 ml de solução de ácido fosfórico 1% e 1,0 ml de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,6%. O TBA reage com as SRATB e com o malondialdeído (MDA) (numa proporção de duas moléculas de TBA para cada MDA), dando uma coloração rosa estável. A mistura era então aquecida por 45 minutos em banho de água fervente e após resfriamento da solução, eram adicionados 4 ml de *n*-butanol e centrifugado. As soluções padrão de 1,1',3,3'-tetrametoxipropano, foram utilizadas nas concentrações de 5,125; 10,250 e 20,500 nmol por ml. As medidas de absorvância da fase orgânica eram feitas em dois comprimentos de onda (520 e 535 nm) utilizando-se um espectrofotômetro digital modelo Genesis. A diferença entre as absorvâncias correspondia ao valor de TBA livre. Os resultados das concentrações de malonaldeído foram expressos em nmol de MDA/g de tecido úmido de rim.

4.2.4.5 Análise histológica dos rins

Após a decapitação, coleta do sangue e abertura da cavidade abdominal, o pedículo vascular renal foi dissecado e o rim esquerdo imediatamente retirado e seccionado transversalmente. Uma fatia de 5,0 mm era fixada em Bouin alcoólico por 12 horas e processada para inclusão em parafina. Secções histológicas de 3 µm de espessura eram coradas com hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson e impregnadas com prata (PAMS) antes de serem examinadas em microscópio de luz visível convencional.

A análise semiquantitativa das alterações nos diferentes compartimentos renais foi efetuada, considerando-se os compartimentos glomerular, tubular, intersticial e vascular do parênquima renal. No compartimento tubular foram analisadas a necrose do epitélio de revestimento, a presença de cilindros intratubulares, a dilatação do lúmen tubular e a presença de mitoses, tanto nos túbulos do córtex como nos das medulas externa e interna.

No compartimento glomerular foram considerados a hiperplasia endo e extracapilar, a deposição de matriz mesangial, a filtração celular, o espessamento e a irregularidade das alças capilares. No compartimento intersticial foram considerados: edema, infiltração leucocitária e fibrose, e no compartimento vascular o espessamento fibro-elástico da camada íntima, a hipertrofia da camada média e a deposição de substância hialina.

O estudo dessas lesões foi feito de acordo com critérios semiquantitativos, utilizando-se um número de código, de modo que o observador não saiba a qual

grupo pertence as lâminas e considerando-se: 0 = ausente, 1 = alterações em grau discreto, 2 = grau moderado e 3 = grau acentuado.

4.3 Análise Estatística

Os valores de volume urinário, osmolalidade urinária, creatinina plasmática e níveis renais das SRATB obtidos, foram analisados utilizando-se o método de Kruskal-Wallis, não paramétrico, com comparações múltiplas realizadas pelo teste de Dunn. Para as análises morfológicas foi aplicada análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da função renal

Os dados dos grupos tratados apenas com o veículo estão nas Tabelas 1 (creatinina plasmática no 5º dia), 2 (creatinina urinária no 5º dia), 3 (“clearance” de creatinina no 5º dia), 4 e 5 (fluxo urinário no 5º e 20º dias) e 6 e 7 (osmolalidade urinária) do apêndice. Apenas a administração do veículo (propilenoglicol) ou do veículo + quercetina por gavagem não alterou nenhum dos parâmetros de função renal estudados, quando os animais foram injetados com solução salina. A administração do veículo antes da injeção de cisplatina também não apresentou diferença em comparação com o grupo tratado apenas com cisplatina.

5.2 Creatinina Plasmática

O efeito da quercetina sobre o aumento da creatinina plasmática (mg/dl) causada pela cisplatina cinco dias após sua administração pode ser observado na Figura 1. No 5º dia após a injeção, observou-se um aumento dos valores de creatinina plasmática dos animais do *Grupo Cisplatina*, com diferença estatística em relação ao *Grupo Controle* ($p < 0,05$). Os animais tratados com gavagem de quercetina apresentaram níveis de creatinina plasmática próximos a normalidade, com diferença estatística em relação ao *Grupo Cisplatina* ($p < 0,05$).

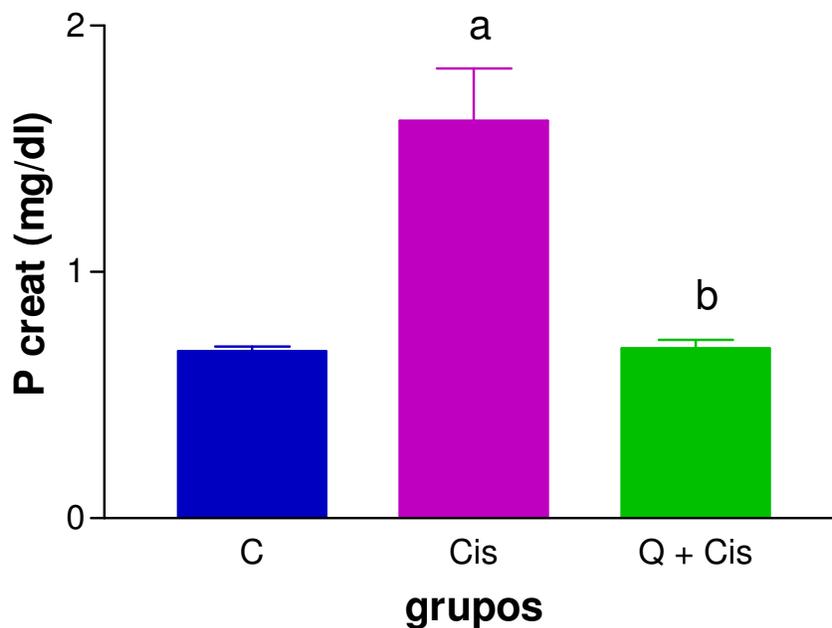


Figura 1 – Creatinina plasmática (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a administração intraperitoneal de salina (*Controle*) ou Cisplatina (*Cis*, *Q+Cis*). Cada valor corresponde à média \pm erro padrão. ^a $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Controle*, ^b $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo CP*. Kruskal- Wallis e pós teste de Dunn.

5.3 Creatinina Urinária

Os valores de creatinina urinária (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a injeção intraperitoneal estão apresentados na Figura 2. No 5º dia após a injeção observou-se um aumento dos valores de creatinina urinária dos animais do *Grupo Cisplatina*, com diferença estatística em relação ao *Grupo Controle* ($p < 0,05$). Os animais tratados com gavagem de quercetina apresentaram níveis de creatinina urinária próximos a normalidade, com diferença estatística em relação ao *Grupo Cisplatina* ($p < 0,05$).

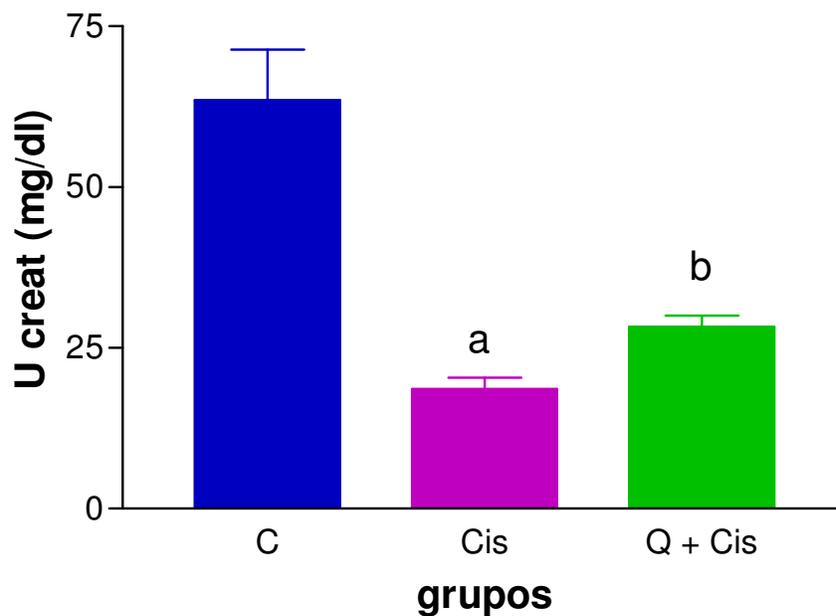


Figura 2 – Creatinina urinária (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a administração intraperitoneal de salina (*Controle*) ou Cisplatina (*Cis*, *Q+Cis*). Cada valor corresponde à média \pm erro padrão. ^a $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Controle*, ^b $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal- Wallis e pós teste de Dunn.

5.4 “Clearance” da Creatinina

Na Figura 3 observamos os valores do “clearance” da creatinina dos animais 5 dias após a administração da cisplatina.

Neste experimento para o grupo de ratos tratados apenas com cisplatina, foi observada uma redução no “clearance” da creatinina, comparado ao *Grupo Controle*. Nos animais que receberam o tratamento com doses múltiplas de quercetina e injeção de cisplatina, não foram observadas diferenças em relação ao *Grupo Controle*. Entretanto, a pequena inibição observada na redução do valor de “clearance” induzida pela cisplatina, não representou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao *Grupo Controle*.

Os valores individuais encontram-se na Tabela 3 do apêndice.

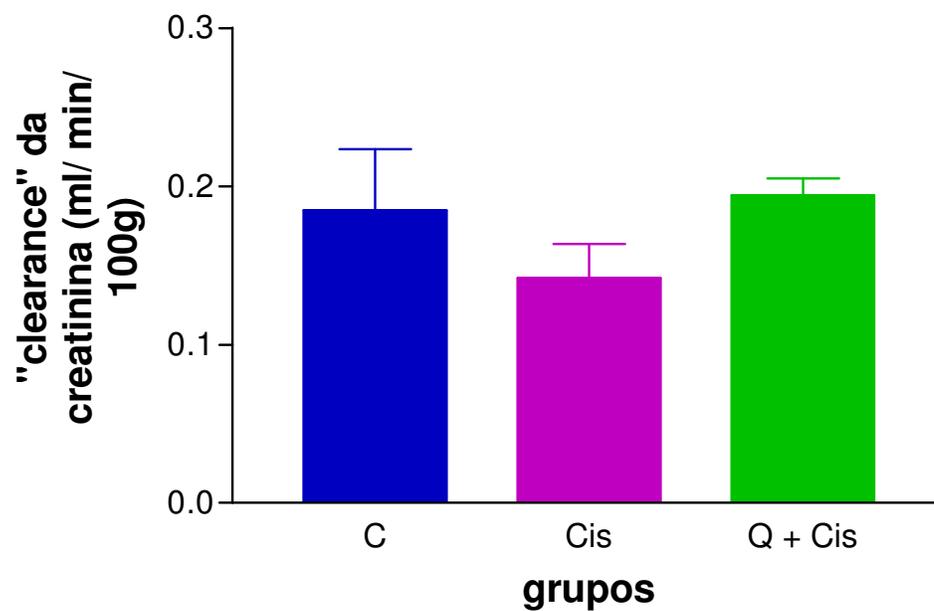


Figura 3 – “Clearance” da creatinina (ml/min/100g peso do rato) dos animais sacrificados 5 dias após a administração intraperitoneal de salina (*Controle*) ou Cisplatina (*Cis*, *Q + Cis*). Cada valor corresponde à média \pm erro padrão. Kruskal- Wallis e pós teste de Dunn.

5.5 Fluxo Urinário

Os fluxos urinários (ml/24h) dos animais sacrificados no 5º e 20º dia após a injeção intraperitoneal de salina ou cisplatina (5mg/kg) estão apresentados na Figura 4. Nesse caso, 5 dias após a injeção de cisplatina observou-se um aumento do fluxo urinário dos animais, que foi mantido elevado até o 20º dia, apresentando diferença estatística em comparação com o *Grupo Controle* ($p < 0,05$).

O fluxo urinário do *Grupo Quercetina + Cisplatina* também apresentou diferença significativa no 5º dia em comparação com o *Grupo Cisplatina* ($p < 0,05$), porém o mesmo não foi observado no grupo tratado por 20 dias.

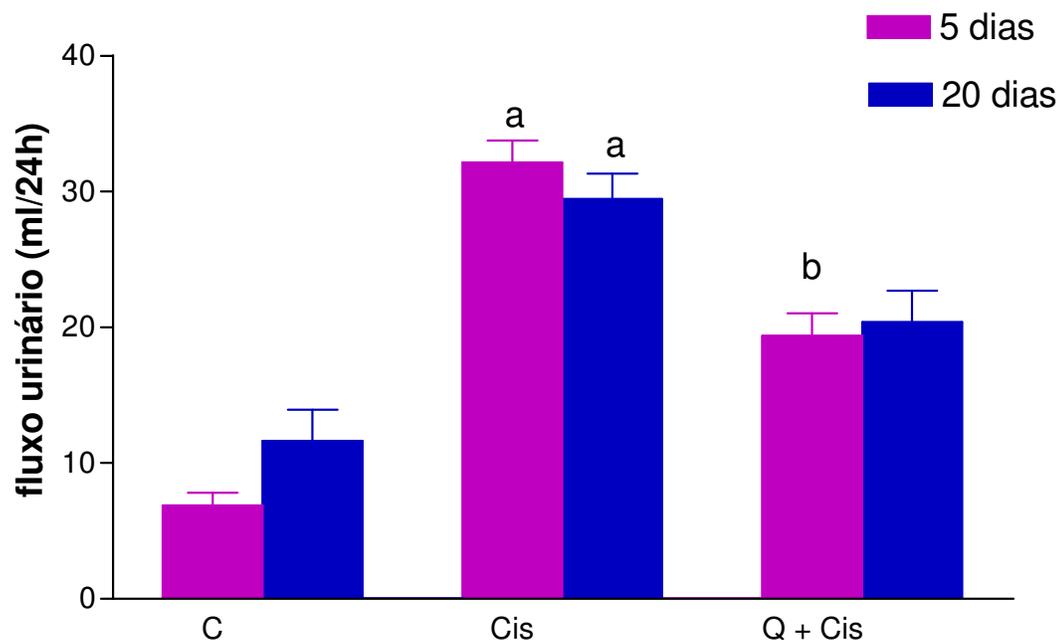


Figura 4 – Fluxo urinário (ml/ 24h) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração intraperitoneal de salina (*Controle*) ou Cisplatina (*Cis*, *Q+Cis*). Cada valor corresponde à média \pm erro padrão. ^a $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Controle*, ^b $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal- Wallis e pós teste de Dunn.

5.6 Osmolalidade Urinária

Os valores de osmolalidade urinária (mOsm/kg de H₂O) dos animais sacrificados no 5º e 20º dia após a injeção intraperitoneal de salina ou cisplatina (5mg/kg) estão apresentados na Figura 5. A injeção de cisplatina provocou uma diminuição significativa da osmolalidade urinária em comparação com o *Grupo Controle* ($p < 0,05$), apenas no 5º dia após a intraperitoneal.

No 5º dia após a intraperitoneal o *Grupo Quercetina + Cisplatina* apresentou um valor da osmolalidade significativamente mais alto que o da *Cisplatina*, porém não mostrou diferença significativa em relação ao *Grupo Controle* ($p > 0,05$).

Também não se observou diferença significativa entre o *Grupo Quercetina + Cisplatina* em comparação ao *Grupo Cisplatina* ($p > 0,05$) no 20º dia após a injeção.

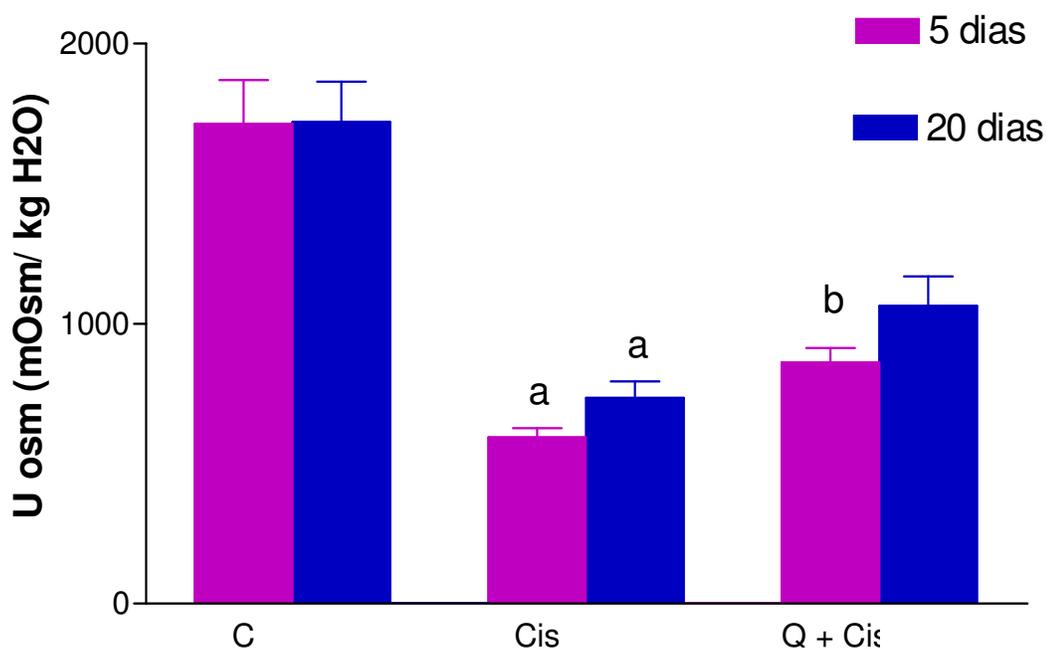


Figura 5 – Osmolalidade urinária (mOsm/ kgH₂O) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração intraperitoneal de salina (*Controle*) ou Cisplatina (*Cis*, *Q + Cis*). Cada valor corresponde à média ± erro padrão. ^a p < 0,05 em comparação com o *Grupo Controle*, ^b p < 0,05 em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal- Wallis e pós teste de Dunn.

5.7 Evolução dos pesos dos animais

A variação na evolução do peso dos animais durante o experimentos está apresentada na Figura 6. A Tabela 8, no apêndice, mostra a média dos resultados de peso dos ratos Wistar tratados com quercetina e submetidos à injeção intraperitoneal de cisplatina. Os resultados individuais estão nas Tabelas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 no apêndice. Os animais do *Grupo Cisplatina* e *Grupo Quercetina + Cisplatina* apresentaram uma pequena redução de peso 24 horas após a injeção intraperitoneal de cisplatina quando comparado ao *Grupo Controle*, com recuperação no 5º dia após o tratamento com cisplatina. Observando-se os resultados obtidos, pode-se verificar que os animais do *Grupo Controle* ganharam peso durante o período experimental.

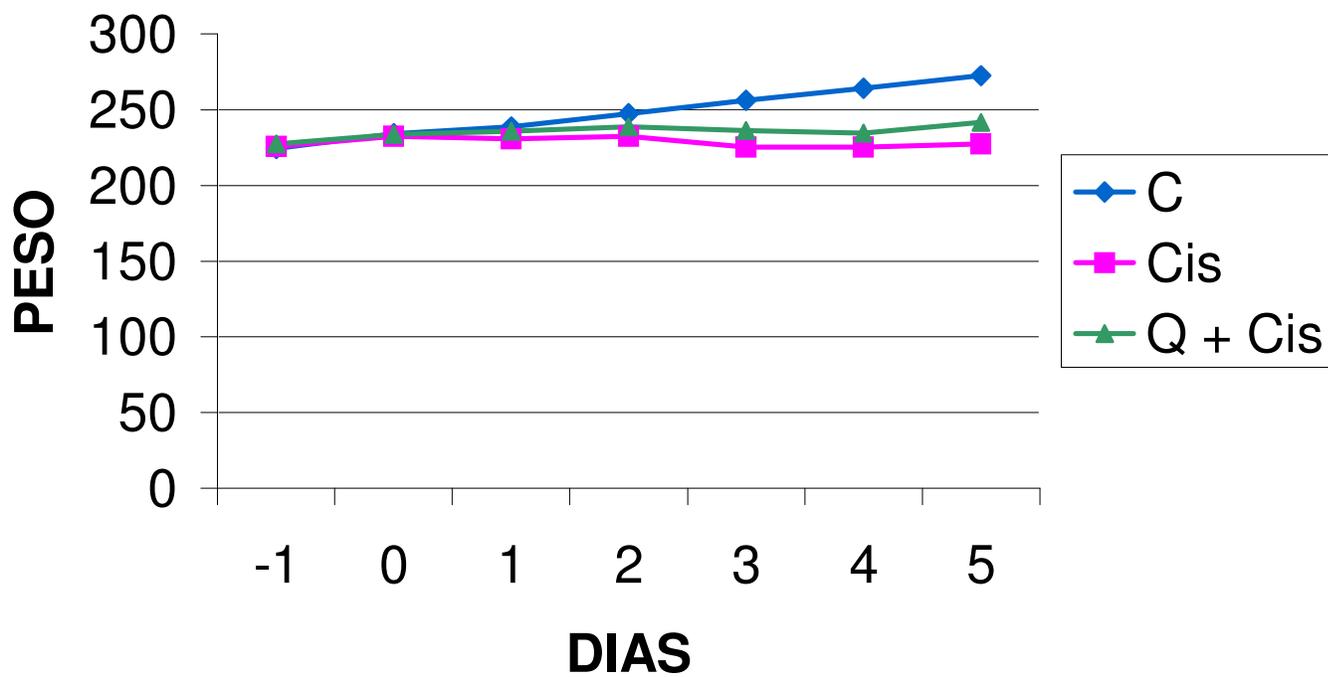


Figura 6 – Evolução do peso dos animais durante todos os dias do experimento.

Cada valor corresponde à média dos pesos corpóreos (g) dos animais.

5.8 Relação peso dos rins/ peso do rato

Na Figura 7 está apresentada a relação em porcentagem, do peso dos rins em relação ao peso corpóreo dos ratos sacrificados 5 e 20 dias após a injeção intraperitoneal. As Tabelas 16 e 17 (ver apêndice), apresentam os valores individuais. Observamos no 5º dia um aumento significativo ($p < 0,05$) entre o *Grupo Cisplatina* e o *Grupo Controle*. No 20º, embora tenha havido um aumento no *Grupo Cisplatina*, este não foi estatisticamente significativo em relação ao *Grupo Controle* ($p > 0,05$).

Foi observado também que os valores obtidos no *Grupo Quercetina + Cisplatina*, revelaram-se intermediários, isto é, diferentes do *Grupo Controle*, mas estatisticamente menores do que observados no *Grupo Cisplatina* ($p < 0,05$), evidenciando-se portanto uma proteção devida ao tratamento com doses múltiplas de quercetina.

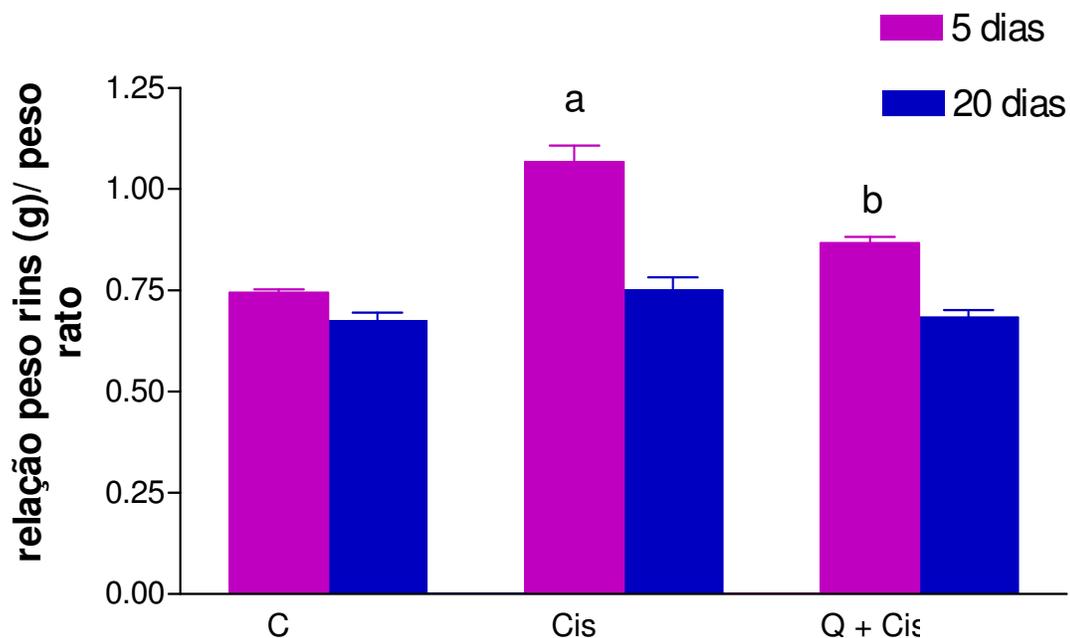


Figura 7 – Peso relativo dos rins (% de peso dos rins com relação ao peso corpóreo) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração intraperitoneal de salina (*Controle*) ou Cisplatina (*Cis*, *Q + Cis*). Cada valor corresponde à média \pm erro padrão. ^a $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Controle*, ^b $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal- Wallis e pós teste de Dunn.

5.9 Análise morfológica

Na Tabela 1 estão apresentados os escores histológicos dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a injeção intraperitoneal. Nos compartimentos vascular, intersticial e glomerular não foram observadas lesões em nenhum dos grupos. Com relação ao compartimento tubular foi observado que a região medular externa foi o local onde as lesões se apresentaram em maior grau. As alterações patológicas mais evidentes 5 dias após a injeção de cisplatina consistiram de perda da borda em escova das células tubulares dos túbulos proximais, presença de cilindros intratubulares, dilatação do lúmen, necrose com descamação do epitélio e mitose. Observou-se lesão de intensidade máxima (escore 4) nos animais do *Grupo Cisplatina*, com diferença significativa em comparação com o *Grupo Controle*, no 5º dia após a injeção ($p < 0,05$). As lesões foram menos intensas nos animais tratados com quercetina, que apresentaram diferenças significativas em comparação com os *Grupos Controle e Cisplatina* ($p < 0,05$). Foi verificada ainda a presença de mitose em quantidades moderadas, porém não quantificadas, nos animais tratados com cisplatina (Figura 8).

No 20º dia após a injeção observou-se uma diminuição dos graus de lesões provocadas pela administração de cisplatina. Entretanto, os animais injetados com cisplatina, apresentaram diferença estatística quando comparados com o *Grupo Controle* ($p < 0,05$). Adicionalmente, observou-se também que os animais injetados com cisplatina e sacrificados no 20º dia apresentaram discretos focos de fibrose intersticial. Também não se verificou diferença significativa entre os escores dos *Grupos Controle, Propilenoglicol e Quercetina*, em ambos períodos estudados

($p > 0,05$). Os dados acima mencionados encontram-se nas Tabelas 18 e 19 do apêndice.

Tabela 1 – Análise histológica dos rins dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (*Controle*) ou cisplatina (*Cis*, *Q + Cis*). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg).

	Controle	Cis	Q + Cis
5 dias	0 (n=6)	4,0 ^a (n=12)	2,71 (n=14)
20 dias	0 (n=8)	3,8 ^a (n=10)	2,16 (n=12)

Grupos: *Controle*; *Cis* = *Cisplatina*; *Q + Cis* = *Quercetina + Cisplatina*. ^a $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Controle*. ANOVA e pós teste de Tukey.

Figura 8 – (A) Corte histológico de rim de rato, mostrando a região medular externa (ME) com aspecto microscópico nos padrões da normalidade, 5 dias após a injeção de salina (escore 0). (B) Corte histológico de rim de rato injetado com cisplatina, mostrando a região ME com necrose tubular aguda (NTA), 5 dias após a injeção (escore 4). (C) Corte histológico de rim de rato pré-tratado com quercetina e injetado com cisplatina, mostrando a região ME com NTA, 5 dias após a injeção (escore 2). A NTA é caracterizada pela intensa dilatação tubular (*), descamação das células no lúmen tubular (seta) e desnudamento da membrana basal tubular (cabeça seta) (A: Tricromo de Masson; B e C: Hematoxilina-Eosina, X290).

5.10 Determinação dos níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB)

Na Figura 9 estão apresentados os valores dos níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) dos animais sacrificados 2 dias após a administração intraperitoneal. Os animais do *Grupo Cisplatina* apresentaram níveis renais das SRATB significativamente mais altos, em comparação com o *Grupo Controle* e com o *Grupo Quercetina + Cisplatina* ($p < 0,05$).

Não se observou diferença significativa entre os animais dos *Grupo Quercetina + Cisplatina* e do *Grupo Controle* ($p > 0,05$). Os resultados de todos os grupos estão apresentados na Tabela 20 do apêndice.

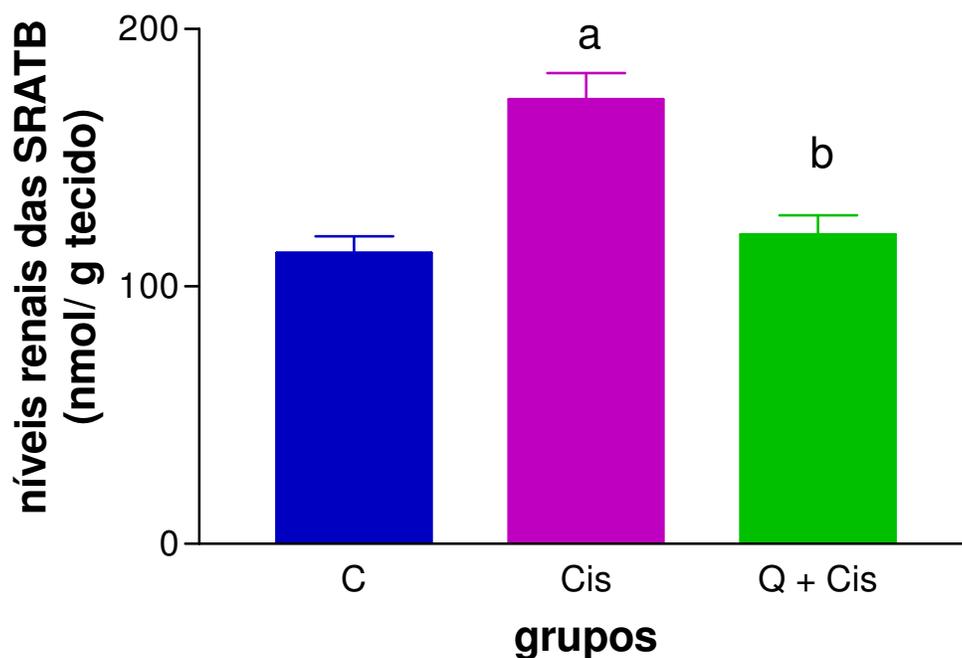


Figura 9 – Níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (nMol/ g proteína) dos animais sacrificados 48 horas após a administração intraperitoneal de salina (*Controle*) ou cisplatina (*Cis*, *Q+Cis*). Cada valor corresponde à média \pm erro padrão. ^a $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Controle*, ^b $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal- Wallis e pós teste de Dunn.

6 DISCUSSÃO

A cisplatina, um complexo de platina com grupos cloreto lábeis, é um agente quimioterápico usado na terapia de vários tipos de câncer. Porém, vários efeitos adversos limitam o uso deste antitumoral, destacando-se os efeitos gastrintestinais indesejáveis como náuseas, vômitos, irritação gástrica, anorexia, além de pronunciado efeito nefrotóxico (DOLL, 1996).

Várias substâncias antioxidantes têm sido estudadas como agentes quimioprotetores, como as vitaminas C e E, o óleo de oliva, a curcumina, a bixina, que exercem seu efeito “capturando” radicais livres formados após a exposição aos quimioterápicos (ANTUNES et al., 1998, 1999, 2000; SILVA et al., 2001).

A insuficiência renal causada pelo agente antitumoral cisplatina é atribuída às alterações das funções renais, especialmente na indução de lesões nos túbulos proximais (FIELD et al., 1989; BRADY et al., 1993). É conhecido que a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos resulta em aumento do volume urinário, aumento relativo do peso dos rins, aumento dos níveis de creatinina plasmática e mudanças no “clearance” de creatinina (ANTUNES et al., 2000, 2001; FRANCESCATO et al., 2001; SILVA et al., 2001).

Em trabalhos como o de SUGIHARA e GEMBA (1986) e APPENROTH et al. (1997) sugere-se que os efeitos tóxicos oriundos da cisplatina podem estar relacionados à danos causados pelas espécies reativas de oxigênio. Para combater estes efeitos tóxicos e a intensidade dos mesmos é comum associar com o fármaco dietas com quantidades substanciais de antioxidantes. Estas dietas

além de proteger os efeitos colaterais do tratamento com o antitumoral, também diminuem os efeitos colaterais nefrotóxicos (CONKLIN, 2000).

Para verificar os danos renais induzidos pela cisplatina, os animais foram tratados com dose única deste antitumoral (5 mg/ kg) que não provoca a morte dos animais e nem toxicidade caracterizada por ataxia, bradipneia, atividade reduzida (JONES et al., 1985; BALDEW et al., 1989). Apesar de ser uma dose freqüentemente usada em animais, de acordo com vários outros autores (ANTUNES et al., 2000, FRANCESCATO et al., 2001; SILVA et al., 2001; MORA et al., 2003), ela é aproximadamente quatro a cinco vezes maior do que a empregada em seres humanos (GONZALEZ-VITALE et al., 1977; JACOBS et al., 1980). Salienta-se que, em geral, os animais de laboratório são mais resistentes às drogas do que outras espécies, seja quando são realizados estudos funcionais ou de alterações morfológicas (THIEL et al., 1976). Com esta dose, obteve-se as alterações funcionais e morfológicas desejadas. A injeção intraperitoneal é a via de administração mais utilizada em experimentos devido à sua simplicidade e também porque possibilita maximizar a exposição de agentes.

A dose de quercetina de 50 mg/ kg peso corpóreo, usada nesse trabalho assim como a administração oral e o pré-tratamento, foram baseadas em dados da literatura, que mostraram efeito nefroprotetor da quercetina (KAHRAMAN et al., 2003 b; FRANCESCATO et al., 2004) com base em diferentes parâmetros investigados (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, fator α de necrose tumoral, atividade da mieloperoxidase, conteúdo de proteína carbonil, níveis de glutathione e atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase).

Neste estudo, a solução de quercetina foi administrada aos animais imediatamente após o seu preparo. O propilenoglicol foi usado como veículo, pois a quercetina não é solúvel na água, e este é o veículo que apresenta absorção mais rápida (PISKULA e TERAQ, 1998).

Segundo BALDEW et al. (1991), o pico de creatinina para ratos ocorre 5 dias após uma dose única de cisplatina (6mg/ kg). Em doenças renais, os valores de creatinina sérica não aumentam significativamente até que a função renal esteja consideravelmente comprometida (EDELWEISS, 1991).

A creatinina plasmática ou sérica é um índice bastante utilizado em experimentos com cisplatina para avaliar a sua nefrotoxicidade. O aumento dos níveis de creatinina plasmática e a diminuição do “clearance” da creatinina indicam que a cisplatina é nefrotóxica. Observou-se neste estudo, que os animais que receberam *Cisplatina* apresentaram valores de creatinina estatisticamente maiores comparados ao *Grupo Controle e Quercetina + Cisplatina* (Tabela 1, Figura 1). Os valores do “clearance” da creatinina nos ratos tratados com cisplatina apresentaram índices baixos em relação aos grupos não tratados (Figura 3, Tabela 3). Resultados semelhantes foram também observados por ANTUNES et al. (2000) e FRANCESCATO et al. (2001).

A diminuição na taxa de filtração glomerular verificada pelo aumento dos níveis de creatinina plasmática foi observado do terceiro ao sétimo dia após administração da cisplatina em ratos (SAFIRSTEIN et al., 1981) e resultados obtidos por NISHIKAWA et al. (2001) também evidenciam níveis de creatinina aumentados, com pico no 5º dia após a administração de cisplatina, sugerindo a ocorrência de dano renal severo. As lesões tubulares podem contribuir para a

diminuição da taxa de filtração glomerular, observada durante o tratamento com drogas nefrotóxicas. A diminuição da taxa de filtração, determinada pelo “clearance” da creatinina foi observada em ratos após a administração de 5 a 10 mg de cisplatina por kg de peso em ratos (SAFIRSTEIN et al., 1981; CHOPRA et al., 1983).

Portanto, o aumento dos níveis de creatinina plasmática e a diminuição do “clearance” da creatinina nos grupos tratados com cisplatina aqui observados indicam que o fármaco teve efeito nefrotóxico e que a quercetina apresentou ser eficiente para diminuir a nefrotoxicidade deste antitumoral.

O aumento do volume urinário observado em ratos tratados com cisplatina também foi observado em trabalhos anteriores (DAUGAARD, 1990), evidenciando a lesão renal provocada por este antitumoral. No presente estudo resultados mostram um aumento de volume urinário nos animais do *Grupo Cisplatina*, estatisticamente significativo em relação ao *Grupo Controle* nos 5º e 20º dias após a injeção intraperitoneal e significante também em relação ao *Grupo Quercetina + Cisplatina* no 5º dia. Observou-se também uma diminuição dos valores de osmolalidade urinária nos animais nos 5º e 20º dias após a injeção de cisplatina, estatisticamente diferente do *Grupo Controle*, e do *Grupo Quercetina + Cisplatina* no 5º dia. Nossos resultados estão de acordo com KISHORE et al. (2000) que observaram que os volumes urinários dos ratos tratados com cisplatina estavam significativamente aumentados, bem como os valores de osmolalidade urinária estavam significativamente diminuídos, cinco dias após administração de cisplatina. Neste trabalho, os autores sugerem que a causa da poliúria induzida por este fármaco pode estar associada com uma diminuição significativa na

expressão de canais de água do ducto coletor (aquaporinas 2 e 3) e da medula interna (aquaporina 1).

A perda de peso tem sido constantemente observada em animais tratados com cisplatina (ANTUNES et al., 2000, 2001; FRANCESCATO et al., 2001; SILVA et al., 2001). Neste estudo pode-se observar que a cisplatina causou perda significativa de peso dos ratos, comparados com os animais *Controle* e com os que receberam *Quercetina* (Figura. 6, Tabelas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15). A causa dessa perda de peso pode ser devida à toxicidade gastrointestinal do fármaco, à diminuição da ingestão de alimentos, ou à ambos efeitos (EDELWEISS, 1991). Observou-se também que houve discreta redução do peso médio dos animais, estatisticamente não significativa, 24 horas após a injeção intraperitoneal de cisplatina.

A administração de quercetina não influenciou o aumento de peso dos animais do *Grupo Quercetina*, visto que o peso dos animais que receberam quercetina por gavagem ficou próximo aos valores do *Controle* (Figura 6, Tabelas 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Com referência ao peso dos rins, o aumento observado foi maior no *Grupo Cisplatina*, como se pode ver na Figura 7 e nas Tabelas 16 e 17. Este aumento foi confirmado, histologicamente, pelo aumento generalizado das células que sofreram processo degenerativo hidrópico e edema intersticial, acrescido das alterações hemodinâmicas e de permeabilidade celular.

Do ponto de vista histológico e estrutural, alguns dados parecem ter significado com relação ao mecanismo de lesão tubular induzido pela cisplatina. As lesões precoces envolvem células do segmento S₃, seis horas após o uso do

fármaco, sugerindo uma rápida interação entre esse e as células tubulares proximais. Estudos farmacocinéticos tem mostrado que, mesmo após poucos minutos ou horas, a maioria da cisplatina injetada é ligada à proteínas (DOBYAN, 1985) e que o início da lesão induzida pela cisplatina pode ocorrer dentro de um curto período de tempo após a administração do fármaco (EDELWEISS, 1991).

Em estudos clínicos já realizados por outros pesquisadores, o efeito nefrotóxico da cisplatina tem sido demonstrado como indutor de necrose tubular de túbulos contorcidos distais e coletores (GONZALES-VITALE et al., 1978; SEGURO et al., 1989).

A seqüência de perda de função renal ocorre com o agravamento dos efeitos morfológicos, principalmente relacionados à dilatação tubular e a presença de núcleos atípicos, revestindo internamente as luzes tubulares e evidenciando hiperchromasia e multinucleação. Um fato curioso é que estas atipias ocorrem em ratos com mais freqüência nos túbulos proximais, e em seres humanos nos túbulos distais e coletores (EDELWEISS, 1991).

A persistência das lesões agudas nos rins observadas neste estudo até 20 dias após a administração de cisplatina está de acordo com a literatura. Segundo GONZALEZ-VITALE et al. (1977) que estudou pacientes submetidos à terapia com cisplatina, a persistência das alterações renais poderia estar relacionada ao fato da excreção renal do fármaco, extremamente lenta expor o epitélio tubular dos rins a um efeito deletério prolongado (DE CONTI et al., 1973).

A maioria dos trabalhos que examinaram alterações morfológicas renais resultantes da administração de cisplatina enfatizam a sensibilidade do segmento

S₃ do túbulo proximal localizado na porção mais externa da medula (CHOIE et al., 1981).

Estudos *in vitro* e *in vivo*, têm atribuído a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina como resultado da peroxidação lipídica no rim (HANNEMANN e BAUMANN, 1988; ZHONG et al., 1990).

Ao final da peroxidação lipídica há formação de várias substâncias por degradação dos lipídeos oxidados, dentre elas o malondialdeído que tem sido quantificado para avaliar a peroxidação lipídica. KIM et al. (1997) verificaram que o tratamento com cisplatina promove aumento da peroxidação lipídica *in vitro*. Vários estudos mostraram os efeitos dos agentes quimioprotetores sobre o aumento da peroxidação lipídica pela cisplatina (BALDEW et al., 1989; HANNEMANN et al., 1991; BRÄUNLICH et al., 1996). KNUDSEN et al.(1996) demonstraram redução nos níveis do malondialdeído renal seguidos de tratamento com múltiplos antioxidantes, indicando que a combinação de vitamina E, selênio e β-caroteno, pode reduzir a peroxidação lipídica mais efetivamente do que dietas contendo apenas um antioxidante.

No presente estudo, foi investigado em ratos machos Wistar, o efeito antioxidante de doses múltiplas do flavonóide quercetina, sobre os danos oxidativos induzidos pela cisplatina, 48 horas após a administração do antitumoral, por meio da avaliação do índice de peroxidação lipídica, pelo aumento do malondialdeído renal, verificado por meio da dosagem bioquímica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (UCHIYAMA e MIHARA, 1978). Nesse sentido, os animais receberam o tratamento com quercetina (50 mg/ kg de peso corpóreo) 24

horas e 1 hora antes da injeção intraperitoneal de cisplatina (5 mg/ kg de peso corpóreo), e 24 horas após a administração, e foram sacrificados 48 horas após a injeção intraperitoneal. Os resultados obtidos mostraram haver um aumento dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) nos animais sacrificados 48 horas após a injeção da cisplatina, estatisticamente significativo em relação aos *Grupo Controle e Quercetina + Cisplatina*.

Esse resultado confirma outros estudos que utilizaram a mesma dose de cisplatina ou próxima a empregada no presente trabalho (YAMADA, 1995; BRÄUNLICH et al., 1996; ANTUNES et al., 2000). YAMADA (1995), realizou um estudo sobre os mecanismos envolvidos nos danos renais induzidos em ratos por seis diferentes compostos nefrotóxicos e dentre eles a cisplatina. O aumento do malondialdeído renal como índice de peroxidação lipídica foi observado no sétimo dia após a administração de 4 a 8 mg/ kg de cisplatina. No entanto, neste período o autor verificou que a peroxidação lipídica não desempenhou um papel significativo nos danos renais induzidos pela cisplatina. Outras investigações também observaram aumento da peroxidação lipídica renal entre 3 e 7 dias após a administração de cisplatina (BRÄULINCH et al., 1996; ANTUNES et al, 2000) e no presente trabalho verificou-se um aumento significativo dos níveis de peroxidação lipídica, 48 horas após a administração de cisplatina.

MATSUSHIMA et al. (1998) interessados em estudar os efeitos dos radicais livres de oxigênio gerados pela cisplatina na falência renal aguda em ratos, utilizaram a mesma dose do antitumoral aqui utilizada e analisaram os resultados 6 horas após a administração do quimioterápico. Os resultados também mostraram aumento nos valores de malondialdeído.

ANTUNES et al. (2001) utilizando doses de 5 mg/ kg peso corpóreo de cisplatina em ratos machos Wistar, avaliaram os efeitos dos antioxidantes curcumina e selênio sobre a nefrotoxicidade deste antitumoral. Os animais foram sacrificados três dias após a injeção de cisplatina e os resultados obtidos mostraram haver indução de peroxidação lipídica pelo agente antineoplásico.

FRANCESCATO et al. (2001) utilizaram a mesma dose do quimioterápico para investigar o efeito do selênio na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina. Os ratos nesse caso foram sacrificados sete dias após a administração intraperitoneal da cisplatina e também foi observado aumento da peroxidação lipídica.

Os pesquisadores acima relacionados (ANTUNES et al. 2000; FRANCESCATO et al. 2001), utilizaram a mesma metodologia também empregada no presente estudo (UCHIYAMA e MIHARA 1978) que segundo OHTAKE et al. (1997) vem sendo extensivamente utilizado como índice confiável de indução de peroxidação lipídica.

Embora os mecanismos responsáveis pela peroxidação lipídica induzida pela cisplatina sejam desconhecidos, muitas sugestões e observações têm sido relatadas. Algumas publicações ressaltam que estudos *in vivo* demonstraram ter a cisplatina causado diminuição da atividade das enzimas antioxidantes endógenas superóxido dismutase, catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione transferase (ZHANG e LINDUP, 1993). Outros pesquisadores verificaram que tal efeito foi responsável pelo aumento da peroxidação lipídica (BOMPART et al., 1990; SADZUKA et al., 1992 a, b). Entretanto, contraditoriamente, também existem evidências de que a administração desse

antitumoral aumentou a atividade da superóxido dismutase renal (BOOGAARD et al., 1991).

KAHRAMAN et al. (2003 b) verificaram que o pré tratamento com quercetina (50 mg/kg), em ratos, provocou diminuição nos níveis renais das SRATB.

Em estudo realizado por KRUIDERING et al. (1997), foi demonstrado que a toxicidade celular induzida pela cisplatina não foi prevenida pelos antioxidantes e esses autores sugerem que a formação de espécies reativas de oxigênio pode ser causa direta da toxicidade induzida pela cisplatina. Porém, o uso de antioxidantes pode diminuir consideravelmente a nefrotoxicidade, reduzindo reações inflamatórias das células e a quantidade de liberação de espécies reativas de oxigênio pelas células danificadas.

WEIJ et al. (1997), investigando os efeitos da cisplatina combinada com substâncias antioxidantes, em dezesseis pacientes com osteosarcoma ou carcinoma testicular, verificaram diminuição dos níveis plasmáticos de vitamina C, ceruloplasmina e ácido úrico. Os valores de bilirrubina, albumina e a proporção vitamina E/ colesterol e triglicerídeos também foram reduzidos significativamente. Os autores concluíram que essa diminuição de substâncias antioxidantes plasmáticas, poderia refletir uma falência do mecanismo de defesa antioxidante contra danos oxidativos induzidos por fármacos antineoplásicos e sugeriram ainda que tal ocorrência provavelmente resultou do baixo consumo de antioxidantes causado pelo estresse oxidativo induzido pela quimioterapia.

O efeito protetor de compostos antioxidantes presentes em alimentos de origem vegetal está relacionado principalmente com a presença de flavonóides e

de outros compostos fenólicos (BROWNSON et al. 2002). O estudo dos constituintes vegetais, bem como de estruturas químicas relacionadas, têm sido mais recentemente alvo de muitas pesquisas (CINTRA e MANCINI FILHO, 1998).

Sabe-se que os flavonóides atuam como antioxidantes, inibindo a peroxidação lipídica, seqüestrando radicais de oxigênio e quelando íons de metais (KANDASWAMI e MIDDLETON, 1994). A quercetina já mostrou ter efeito protetor contra a toxicidade renal da cisplatina *in vitro*, protegendo as células epiteliais tubulares de danos funcionais e estruturais induzidos pela cisplatina (KUHLMAN et al., 1998).

7 CONCLUSÕES

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

- ✓ A cisplatina, injetada intraperitonealmente na dose única de 5 mg/ kg, causou alterações morfológicas renais agudas e crônicas;
- ✓ A cisplatina promoveu aumento do fluxo urinário, aumento do peso relativo dos rins, aumento da creatinina plasmática e diminuição do “clearance” da creatinina, sendo portanto considerada nefrotóxica;
- ✓ A nefrotoxicidade da cisplatina pode ser explicada, em parte pelo aumento das espécies reativas de oxigênio, observado pelos níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, aumentados nos animais que foram tratados com este quimioterápico;
- ✓ A quercetina possui propriedades antioxidantes, como evidenciado pela diminuição dos níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, observadas 48 horas após o tratamento com a cisplatina, e;
- ✓ O tratamento com doses múltiplas de quercetina atenuou a lesão renal produzida pela cisplatina, reduzindo significativamente as alterações histológicas e bioquímicas desse órgão.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO A.I.; BRODSKII. A.V.; KOSTYUK, V.A.; POTAPOVITCH, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, n. 1, p. 1763-1769, 1989.

AHLENSTIEL, T.; BURKHARDT, G.; KÖHLER, H.; KUHLMANN, M.K. Bioflavonoids attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. **Kidney Int.**, v. 63, p. 554-563, 2003.

AL-SARRAF, M.; PAJAK, T.F.; BYHARDT, R.W.; BEITLER, J.J.; SALTER, M.M.; COOPER, J.S. Postoperative radiotherapy with concurrent cisplatin appears to improve locoregional control of advanced, resectable head and neck cancer. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 37, p. 777-782, 1997.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Res.**, v. 350, p. 103-108, 1996.

ANTUNES, L.M.G.; TAKAHASHI, C.S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mut. Res.**, v. 419, p. 137-143, 1998.

ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. L. P. Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin *in vivo*. **Genet. Mol. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 415-417, 1999.

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

ANTUNES, L. M. G.; DARIN, J. D. C.; BIANCHI, M. L. P. Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 43, n. 2, p. 145-150, 2001.

APPENROTH, D.; GAMBARYAN, S.; GERHARDT, S.; KERSTEN, L.; BRAUNLICH, H. Age dependent differences in the functional and morphological impairment of kidney following cisplatin administration. **Exp. Pathol.**, v. 38, p. 231-239, 1990.

APPENROTH, D.; GAMBARYAN, S.; GERHARDT, S.; KERSTEN, L.. Protective effects of vitamins E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. **Arch. Toxicol.**, v. 71, p. 677-683, 1997.

ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p. 1124-1131, 2004.

AVILA, M.A.; VELASCO, J.A.; CANSADO, J.; NOTARIO, V. Quercetin mediates the down regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. **Cancer Res.**, v.54, p. 2424-2428, 1994.

BALDEW, G.S.; VAN DEN HAMER, C.J.A.; LOS, G.; VERMEULEN, N.P.E.; GOEIJ, J.J.M.; McVIE, J.G. Selenium-induced protection against cis-diamminedichloroplatinum (II) nephrotoxicity in mice and rats. **Cancer Res.**, v. 49, p. 3020-3023, 1989.

BALDEW, G.S.; VAN DEN HAMER, C.J.A.; LOS, G.; VERMEULEN, N.P.E.; GOEIJ, J.J.M.; McVIE, J.G. The mechanism of interaction between cisplatin and selenite. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, n. 10, p. 1429-1437, 1991.

BARROS, E.J.G.; BOIM, M.A.; SANTOS, O.F.P.; SCHOR, N. Effect of cisplatin on glomerular hemodynamics. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, p. 1295-1301, 1989.

BITRAN, J.D.; DESSER, R.K.; BILLNES, A.A.; KORLOFF, M.F.; SHAPIRO, C.M. Acute nephrotocicity following *cis*-dichlorodiammineplatinum. **Cancer**, v. 49, p. 1784-1788, 1982.

BOKEMEYER, C.; FELS, L.M.; DUNN, T.; VOIGT, W.; GAEDEKE, J.; SCHOMOLL, H.J.; STOLTE, H.; LENTZEN, H. Silibin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin or ifosfamide antitumor activity. **Br. J. Cancer**, v. 74, p. 2036-2041, 1996.

BOMPART, G. Cisplatin-induced changes in cytochrome p-450, lipid peroxidation and drug-metabolizing enzyme activities in rat kidney cortex. **Toxicol. Lett.**, v. 48, p. 193-199, 1989.

BOMPART, G.; PREVOT, D.S.; BASCANDS, J.L. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase, and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. **Clin. Biochem.**, v. 23, p. 501-504, 1990.

BOOGAARD, P.J.; SLIKKERVEER, A.; NAGELKERKE, J.F.; MULDER, G.J. The role of metallothionein in the reduction of cisplatin-induced nephrotoxicity by Bi^{3+} -pretreatment in the rat *in vivo* and *in vitro*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 41, n.3, p. 369-375, 1991.

BRADY, H.R.; ZIEDEL, M.L.; KONE, B.C.; GIELBISCH, G.; GULLANS, S.R. Differential actions of cisplatin on renal proximal tubule and inner medullary collecting duct cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 265, p. 1421-1428, 1993.

BRÄUNLICH, H.; APPENROTH, D.; FLECK, C. Protective effects of methimazole against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J. Appl. Toxicol.**, v. 17, n. 1, p. 41-45, 1996.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism and Nutritional Significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROWNSON, D.M.; AZIOS, N.G.; FUQUA B.K.; DHARMAWARDHANE S.F.; MABRY, T.J. Flavonoid effect relevant to cancer. **J. Nutr.**, v. 132, p. 3482S-3489S, 2002.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 22, p. 749-760, 1997.

CARTEI, G.; CARTEI, F.; CANTONE, A.; CAUSARANO, D.; GENCO, G.; TOBALDIN, A.; INTERLANDI, G.; GIRALDI, T. Cisplatin-cyclophosphamide-mitomycin combination chemotherapy with supportive care versus supportive care alone for treatment of metastatic non-small-cell lung cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 85, p. 794-799, 1993.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v. 344, p. 862-863, 1994.

CHOIE, D.D.; LONGNECKER, D.S.; DEL CAMPO, A.A. Acute and chronic cisplatin nephropathy in rats. **Lab. Invest.**, v.44, n.5, p. 397-402, 1981.

CHOPRA, S.; KAUFMAN, J.; FLAMENBAUM, W. Cis-diaminedichloroplatinum (DDP) induced acute renal failure. **Clin. Exper. Dialysis Apheresis**, v. 7, p. 25-35, 1983.

CINTRAR.M.G.C.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais presentes nos alimentos e a prevenção de doenças cardiovasculares. **Bol. Soc. Bras. Tecnol. Alim.**, v. 32, n. 1, p. 72-79, 1998.

CONKLIN, K.A. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. **Nutr. Cancer**, v. 37, n.1, p. 1-18, 2000.

CONTE, P.F.; BRUZZONE, M.; CARNINO, F.; GRADDUCCI, A.; ALGERI, R.; BELLINI, A.; BOCCARDO, F.; BRUNETTI, I.; GALLO, L.; ROSSO, R.; RUBABAGOTTI, A. High-dose versus low-dose cisplatin in combination with cyclophosphamide and epidoxorubicin in suboptimal ovarian cancer: a randomized study of the group oncologic Nord-Ovest. **J. Clin. Oncol.**, v. 14, p. 351-356, 1996.

CRESPY, V.; MORAND, C.; MANACH, C.; BESSON, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. **Am. J. Physiol.**, v. 277, p. 120- 126, 1999.

CRESPY, V.; MORAND, C.; BESSON, C.; MANACH, C.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Quercetin, but not its glycosides, is absorbed from the rat stomach. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 618-621, 2002.

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

DAYE, M. Renal excretion distribution and metabolism of ¹⁴C-ethylenediaminedichloroplatinum (CDEP) in rats. **Kidney Int.**, v. 19, p. 198-203, 1991.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutr Rev.**, v. 55, p. 396-398, 1997.

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

DE GROOT, H.; RAVEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundam. Clin. Pharm.**, v. 12, p.249-255, 1998.

DEHNE, N.; LAUTERMANN, J.; TEPTAT, F.; RAUEN, U.; DE GROOT, H. Cisplatin ototoxicity: involvement of iron and enhanced formation of superoxide anion radicals. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 174, p. 27-34, 2001.

DESCHNER, E.E.; RUPERTO, J.F.; WONG, G.Y.; NEWMARK, H.L. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 1193-1196, 1991.

DOBYAN, D.C. Long-term consequences of *cis*-platinum-induced renal injury: a structural and functional study. **Anat. Rec.**, v. 212, p. 239-245, 1985.

DOBYAN, D.C.; BULL, J.M.; STREBEL, F.R.; SUNDERLAND, B.A.; BULGER, R.E. Protective effects of θ -(beta-hydroxyethyl)-rutinoside on *cis*-platinum-induced acute renal failure in the rat. **Lab. Invest.**, v. 55, p. 557-563, 1986.

DOLL, D.C.; WEISS, R.B. Hemolytic anemia associated with antineoplastic agents. **Cancer Treat. Rep.**, v. 69, p. 777-782, 1985.

DOLL, R. Nature and nurture: possibilities for cancer control. **Carcinogenesis**, v.17, n.2, p.177-184, 1996.

DRISKO, J.A.; CHAPMAN, J.; HUNTER, V.J. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. **Gynecol. Oncol.**, v.88, p. 434-439, 2003.

EDELWEISS, M.I.A. **Modelo experimental de nefrotoxicidade da cis-diamminedichloroplatinum (II): estudo morfológico dos efeitos agudos e crônicos.** 1991. 222f. Tese(Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

EDELWEISS, M.I.; TRACHTENBERG, A.; PINHEIRO, E. X.; DA SILVA, J.; RIEGEL, M.; LIZARDO-DAUDT, H.M.; MATTEVI, M.S. Clastogenic effect of

cisplatin on Wistar rat bone marrow cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, n.6, p. 679-683, 1995.

FIELD, M.J. et al. Acute cisplatin nephrotoxicity in the rat: evidence for impaired entry of sodium into proximal tubule cells. **Pflugers Arch.**, v.414, p.647-650, 1989.

FLAGG, E.W., COATES, R.J., GREENBERG, R. S. Epidemiologic studies of antioxidants and cancer in humans. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.14, n.5, p.419-427, 1995.

FLEMING, J.J.; COLLIS, C.; PECKHAM, M.J. Renal damage after cis-platinum. **Lancet**, v.2, p. 960, 1979.

FORMICA, J.V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food Chem. Toxicol.**, v.33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

FRANCESCATO, H.D.C. COSTA, R.S.; CAMARGO, S.M.R.; ZANETTI, M.A.; LAVRADOR, M. A.; BIANCHI, M.L.P. Effect of oral selenium administration on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharm. Res.**, v. 43, n. 1, p. 77-82, 2001.

FRANCESCATO, H.D.C.; COIMBRA, T.M.; COSTA, R.S.; BIANCHI, M.D.P. Protective Effect of Quercetin on the Evolution of Cisplatin-Induced Acute Tubular Necrosis. **Kidney Blood. Press. Res.**, v. 27, n. 3, p. 148-158, 2004

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J.X.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, p.91-104, 2002.

GONZALES-VITALE, J.C.; HAYES, D.M.; CVITKOVIC, E. ; STERNBERG, S.S. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. **Cancer Chemother. Rep.**, v.39, p. 1362-1371, 1977.

GONZALES-VITALE, J.C.; HAYES, D.M.; CVITKOVIC, E. ; STERNBERG, S.S. Acute renal failure after cis-dichlorodiammeneplatinum (II) and gentamicin-cephalothin therapies. **Cancer Treat. Rep.**, v. 62, p. 693-698, 1978.

GORDON, J.A.; GATTONE, V.H. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. **Am. J. Physiol.**, v. 250, p. 991-998, 1986.

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

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 845-850, 1994.

HANNEMANN, J.; BAUMANN, K. Cisplatin-induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex: different effects of antioxidant and radical scavengers. **Toxicol.**, v.51, p. 118-132, 1988.

HANNEMANN, J.; DUWE, J.; BAUMANN, K. Iron and ascorbic acid induced lipid peroxidation in renal microsomes isolated from rats treated with platinum compounds. **Cancer Chemoter. Pharmacol.**, v.28, p. 427-433, 1991.

HARDAKER Jr.; W.T.; STONE, R.A.; McCOY, R. Platinum nephrotoxicity. **Cancer**, v. 34, p. 307-314, 1974.

HAVSTEEN, B.N. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Therapeut.**, v.96, p.67-202, 2002.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, p. 572-584, 2002.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **J. Agr. Food Chem.**, v. 40, p. 2379-2883, 1992.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B.; KROMHOUT, D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. **Nutr. Cancer**, v.20, n.1, p.21-29, 1993.

HILL, J.M.; LOEB, E.; MacLELLAN, A.; HILL, N.O.; KHAN, A.; KING, J.J. Clinical studies of platinum coordination compounds in the treatment of various malignant disease. **Cancer Chemother. Rep.**, v. 59, p. 647-659, 1975.

HOFFMANN, J.; FIEBIG, H.H.; WINTERHALTER, B.R.; BERGER, D.P.; GRÜNICK, H.H. Enhancement of the antiproliferative activity of cis-diamminedichloroplatinum (II) by quercetin. **Int. J. Cancer**, v. 45, p. 536-539, 1990.

HOLLMAN, P.C.H.; DE VRIES, J.H.M.; VAN LEEUWEN, S.D.; MENGELERS, M.J.B.; KATAN, M.B. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 62, p. 1276-1282, 1995.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Health effects and bioavailability of dietary flavonols. **Free Radic. Res.**, v. 31, p. 75-80S, 1999.

ICHIKAWA, I.; KIYAMA, S.; YOSHIOKA, T. Renal antioxidant enzymes: their regulation and function. **Kidney Int.**, v. 45, p. 1-9, 1994.

JACOBS, C.; KALMAN, S.M.; TRETTON, M.; WEINER, M.W. Renal handling of *cis*-diamminedichloroplatinum (II). **Cancer Treat. Rep.**, v. 64, p. 1223-1226, 1980.

JONES, T.W.; CHOPRA, S.; KAUFMANN, J.S.; FLAMENBAUM, W.; TRUMP, B.F. Cis-diamminedichloroplatinum (II)- induced acute renal failure in the rat. Correlation of structural and functional alterations. **Lab. Invest.**, v. 52, p. 363-374, 1985.

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; KÖKEN, T.; SERTESER M.; AKTEPE, F.; ERKASAP, S. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesion. **Toxicology**, v. 183, p. 133-142, 2003.

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; SERTESER M.; KÖKEN, T. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **J. Nephrol.**, v.16, n.2, p. 219-224, 2003.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 366, p. 351-376, 1994.

KIM, Y.K.; JUNG, J.S.; LEE, S.H.; KIM, Y.W. Effects of antioxidants and Ca^{2+} in cisplatin-induced cell injury in rabbit renal cortical slices. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 146, p. 261-269, 1997.

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

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, R.; HELIÖVAARA, M.; TEPPONEN, L.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and a other malignant neoplasms. **Am. J. Epidemiol.**, v. 146, p. 223-230, 1997.

KRUIDERING, M.; VAN DER WATER, B.; DE HEER, E.; MULDER, G.J.; NAGELKERKE, J.F. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 208, p. 638-649, 1997.

KUHLMANN, M.K.; HORSCH, E.; BURKHARDT, G.; WAGNER, M.; KÖHLER, H. Reduction of cisplatin toxicity in cultured renal tubular cells by the bioflavonoid quercetin. **Arch. Toxicol.**, v. 72, p. 536-540, 1998.

LARSON, R.A. The flavonoids. **Phytochemistry**, v.27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LEIBBRANDT, M.E.I.; WOLFGANG, G.H.I. Differential toxicity of cisplatin, carboplatin and CI-973 correlates with cellular platinum levels in rat renal cortical slices. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 132, p. 245-252, 1995.

LITTERST, C.L.; GRAM, T.E.; DEDRICK, R.L.; LEROY, A.F.; GUARINO, A.M. Distribution and disposition of platinum following intravenous administration of cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875) to dogs. **Cancer Res.**, v. 36, p. 2340-2344, 1976.

LITTERST, C.L.; SMITH, J.H.; SMITH, M.A.; UOZUMI, J.; COPLEY, M. Sensitivity of urinary enzymes as indicators of renal toxicity of the anticancer drug *cis*-platin. **Uremia Invest.**, v. 9, p. 111-117, 1985.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Flavonoids as anticancer agents: structure-activity relationship study. **Curr. Med. Chem.**, v.2, p. 691-714, 2002.

MADIA, N.E.; HARRINGTON, J.L. Platinum nephrotoxicity. **Am. J. Med.**, v. 65, p. 307-314, 1978.

MANACH, C.; MORAND, C.; TEXIER, O.; FAVIER, M.L.; AGULLO, G.; DEMIGNE, C.; REGERAT, F.; REMESY, C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. **J. Nutr.**, v. 125, p. 1911-1922, 1995.

MANACH, C.; MORAND, C.; TEXIER, O.; FAVIER, M.L.; AGULLO, G.; DEMIGNE, C.; REGERAT, F.; REMESY, C. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Lett.**, v. 426, p. 331-336, 1998.

MASON, R.W.; EDWARDS, I.R. Studies on the copper and zinc content of the rat kidney after treatment with cisplatin. **Toxicology**, v. 37, p. 267-274, 1985.

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

McCLAY, E.F.; HOWELL, S.B. Review: intraperitoneal cisplatin in the management of patients with ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 36, p. 1-6, 1990.

MEYER KB, MADIAS NE. Cisplatin nephrotoxicity. **Miner Electrolyte Metab.**, v.20, p. 201-213, 1994.

MIDDLETON, E.Jr.; TERAMURA, A.H. The role of flavonol glycosides and carotenoids in protecting soybean from ultraviolet-B damage. **Plant. Physiol.**, v.103, n.3, p.741-752, 1993.

MIDDLETON, E.Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.439, p175-182, 1998.

MIDDLETON, E Jr, KANDASWAMI C, THEOHARIDES TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MORAND, C.; CRESPIY, V.; MANACH, C.; BESSON, C.; DEMIGNÉ, C.; RÉMÉSY, C. Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. **Am. Physiol. Soc.**, p. 212-219, 1998.

MOON, J.H.; NAKATA, R.; OSHIMA, S.; INAKUMA, T.; TERAQ, J. Accumulation of quercetin conjugates in blood plasma after the short-term ingestion of onion by women. **Am. J. Physiol.**, v. 279, p. R461-467, 2000.

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

MUKOHATA, Y., NAKABAYASHI, S., HIGASHIDA, M. Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. **FESB Lett**, n. 85, p. 215-218, 1978.

MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implications of its intestinal absorption and metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 417, p. 12-17, 2003.

NIJVELDT, R.J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELENS, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 74, p. 418-425, 2001.

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

PERA, M.F.; ZOOK, B.C.; HARDER, H.C. Effects of mannitol or furosemide diuresis on the nephrotoxicity and physiological disposition of *cis*-dichlorodiammineplatinum (II) in rats. **Cancer Res.**, v.39, p. 1269-1278, 1979.

PIERPOINT, W.S. Flavonoids in the human diet. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 213, p. 125-140, 1986.

PIETTA, P.G. J. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v.63, p. 1035-1042, 2000.

PISKULA, M.; TERAQ, J. Quercetin's solubility affects its accumulation in rat plasma after oral administration. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 4313-4317, 1998.

PRESTYKO, A.W.; D' AOUST, J.C.; ISSEL, B.F; CROOKE, S.T. Cisplatin (*cis*-diam-menedichloroplatinum (II)). **Cancer Treat. Rev.**, p. 6-17, 1979.

RAO, M.; RAO, M.N.A. Protective effects of selenomethionine against cisplatin-induced renal toxicity in mice and rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 50, p. 687-691, 1998.

REED, E., KOHN, K.W. Platinum analogs. In: CHARBER, B.A. **Cancer Chemother.:** principles and practice. Philadelphia: Collins, 1990.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Treds. Plant. Sci.**, v. 2, p. 152-159, 1997.

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

SADZUKA, Y.; SHOJY, T.; TAKINO, Y. Effect of cisplatin on the activities of enzymes which protect against lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 43, p. 1872-1875, 1992a.

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

SAFIRSTEIN, R. Renal vesel and tubule pressure and flows in the initial phase of *cis*-diamminedichloroplatinum nephrotoxicity. **Kidney Int.**, v. 19, p.213, 1981.

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

SAFIRSTEIN, R.; WINSTON, J.; GOLDSTEIN, M.; MOEL, D.; DIKMAN, S.; GUTTENPLAN, J. Cisplatin nephrotoxicity. **Am. J. Kid. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 356-367, 1986.

SALMON, S.E.; SARTORELLI, A.C. Quimioterapia do Câncer. In: KATZUNG, B.G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 635-636.

SEGURO, A.C.; SHIMIZU, M.H.M.; KUDO, L.H.; ROCHA, A.S. Renal concentration defect induced by cisplatin. The role of thick ascending limb and papillary collecting duct. **Am. J. Nephrol.**, v. 9, n. 1, p. 59-65, 1989.

SESINK, A.L.A.; O'LEARY, K.A.; HOLLMAN, P.C.H. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. **J. Nutr.**, v. 131, p. 1938-1941, 2001.

SESSO, H.D.; GAZIANO, J.M.; LIU, S.; BURING, J.E. Flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 77, p. 1400-1408, 2003.

SHAH, S. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. **Kidney Int.**, v. 35, p. 1093-1106, 1989.

SHEN, F.; WEBER, G. Synergistic action of quercetin and genistein in human ovarian carcinoma cells. **Oncol. Res.**, v. 9, p. 597-602, 1997.

SHIMOI, K.; YOSHIZUMI, K.; KIDO, T.; USUI, Y.; YUMOTO, T. Absorption and urinary excretion of quercetin, rutin and α -G-rutin, a water soluble flavonoid, in rats.

J. Agric. Food Chem., v. 51, p. 2785-2789, 2003.

SHOSKES, D.A. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury. **Transplantation**, v. 66, n.2, p. 147-152, 1998.

SILVA, R. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats.

Pharmacol. Res., v. 43, n. 6, p. 561-566, 2001.

SORATA, Y.; TAKAHAMA, U.; KIMURA, M. Protective effect of quercetin and rutin on the photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 799, n. 3, p. 313-317, 1984.

STARK, J.J.; HOWELL, S.B. Nephrotoxicity of *cis*-platinum (II) dichlorodiammine. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.23, p. 461-466, 1978.

STEWART, D.J.; MIKHAEL, N.Z.; NANJI, A.A.; NAIR, R.C.; KACEW, S.; HOWARD, K.; HIRTE, W.; MAROUN, J.A. Renal and hepatic concentrations of platinum: relationship to cisplatin time, dose, and nephrotoxicity. **J. Clin.Oncol.**, v.3, p. 1251-1256, 1985.

SUGIHARA, K.; GEMBA, M. Modification of cisplatin toxicity by antioxidants **J. Pharmacol.**, v. 40, p. 353-355, 1986.

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

THIEL, G.; BRUNNER, F.; WUNDERLICH, P.; HUGENIN, M.; BIENKO, B.; TOR HORHORST, J.; PETERS-HAEFELI, L.; KIRCHERTZ, E.Z.; PETERS, G. Protection of rat kidneys against Hg C12- induced acute renal failure by induction of high urine flow without renin suppression. **Kidney Int.**, v. 10, p. 191-198, 1976.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.** v.86, p.271-278, 1978.

UEDA, S.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, T.; SASADA, A.; TAKABAYASHI, Y.; YAMAOKA, J.; YODOI, J. Bacalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 781-791, 2002.

UOZOMI, J.; LITTERST, C.L. The effect of cisplatin on renal ATPase activity *in vivo* and *in vitro*. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 15, p. 93-96, 1985.

WALKER, E.M.; GALE, G.R. Methods of reduction of cisplatin nephrotoxicity. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v.11, p. 397-410, 1981.

WEIJ, N.L.; CLETON, F.J., OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy induced toxicity. **Cancer Treat. Rev.**, v. 23, p. 209-240, 1998.

XIAO, D.; ZHU, S.P.; GU, Z.L. Quercetin induced apoptosis in human leukemia HL-60 cell. **Acta. Pharmacol. Sin.**, v. 18, p. 280-283, 1998.

YAMADA, J. Studies on the mechanisms of renal damages induced by nephrotoxic compounds. **Nippon Hoigaku Zasshi**, v. 49, n. 6, p. 447-457, 1995.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 21, p. 331-406, 2001.

YOSHIDA, M.; SAKAI, T.; HOSOKAWA, N.; MARUI, N.; MATSUMOTO, K.; FUJIOKA, A.; NISHINO, H.; AOIKE, A. The effect of quercetin of cell cycle progression and growth of human gastric cancer cells. **FEBS Lett.**, v. 260, p. 10-13, 1990.

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

ZIEGLER, R.G., MAYNE, S.T., SWANSON, C.A. Nutrition and lung cancer. **Cancer Causes Control**, v.7, n.1, p.157-177, 1996.

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

ESTELA BEATRIZ BEHLING

EFEITO DE DOSES MÚLTIPLAS DE QUERCETINA NA REDUÇÃO DA NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELA CISPLATINA EM RATOS

Araraquara

2004

ESTELA BEATRIZ BEHLING

EFEITO DE DOSES MÚLTIPLAS DE QUERCETINA NA REDUÇÃO DA NEFROTOXICIDADE INDUZIDA PELA CISPLATINA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Alimentos e Nutrição, área de concentração: Ciências Nutricionais.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria de L. Pires Bianchi

Araraquara

2004

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Maria de Lourdes Pires Bianchi

Profª Drª Jacqueline Pontes Monteiro

Prof. Dr. João Bosco Faria

Profª Drª Cecília Rodrigues Silva

Profª Drª Maria Jacira Silva Simões

Araraquara, _____ de _____ de 2004.

RESUMO

A quercetina (3,5,7,3',4'- pentahidroxi flavona), o flavonóide mais abundante comumente presente em várias frutas e vegetais é um potente antioxidante, devido às suas propriedades de seqüestrar radicais livres de oxigênio e inibir a

peroxidação lipídica *in vitro*. A cisplatina (*cis*- diaminodicloroplatina II), um potente agente antineoplásico utilizado especialmente no tratamento de tumores sólidos, têm seu uso clínico limitado devido a seus efeitos colaterais como dano renal, toxicidade intestinal e supressão da medula óssea. Neste estudo foi avaliado o efeito de doses múltiplas do flavonóide quercetina sobre os danos oxidativos induzidos pela cisplatina em ratos machos Wistar, por meio da peroxidação lipídica. Para avaliar o efeito nefrotóxico induzido pela cisplatina foram determinados o volume e osmolalidade urinária, creatinina urinária e plasmática e “clearance” da creatinina. Os animais foram divididos em seis grupos de tratamento: *Grupo Controle* (água por gavagem e salina intraperitoneal), *Grupo Controle Propilenoglicol* (propilenoglicol por gavagem e salina intraperitoneal), *Grupo Controle Quercetina* (quercetina por gavagem e salina intraperitoneal), *Grupo Cisplatina* (água por gavagem e cisplatina intraperitoneal), *Grupo Propilenoglicol + Cisplatina* (propilenoglicol por gavagem e cisplatina intraperitoneal), *Grupo Quercetina + Cisplatina* (quercetina por gavagem e cisplatina intraperitoneal). A dose de cisplatina (5 mg/kg peso corpóreo) foi injetada intraperitonealmente 2, 5 e 20 dias antes do sacrifício dos animais. A quercetina (50 mg/kg peso corpóreo) foi administrada por gavagem diariamente. O pré-tratamento com a quercetina atenuou a lesão renal induzida pela cisplatina, reduziu significativamente as alterações histológicas e bioquímicas e se revelou capaz de inibir a peroxidação lipídica induzida 48 horas após a administração da cisplatina. Estes resultados sugerem que a quercetina pode ser um importante agente usado para redução da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina.

SUMMARY

Quercetin (3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone), one of the most abundant flavonoid commonly present in most edible fruits and vegetables is a potent antioxidant having oxygen radical scavenging properties and inhibit lipid peroxidation *in vitro*. Cisplatin (*cis*- dichlorodiammine platinum II), a potent

anticancer agent especially used in the treatment of solid tumor have its clinical use often limited by its adverse effects including renal impairment, intestinal toxicity and mielosuppression. In this study we evaluated the role of the flavonoid quercetin on cisplatin-induced oxidative damage in Wistar rats through lipid peroxidation. To evaluate the cisplatin-induced nephrotoxicity, urinary volume was measured and plasmatic creatinine and creatinine clearance were determined. The animals were divided into six groups: *Control Group* (water by gavage and saline intraperitoneally), *Quercetin Group* (quercetin by gavage and saline intraperitoneally), *Propilenoglicol Group* (propilenoglicol by gavage and saline intraperitoneally), *Cisplatin Group* (water by gavage and cisplatin intraperitoneally), *Quercetin + Cisplatin Group* (quercetin by gavage and cisplatin intraperitoneally), *Propilenoglicol + Cisplatin Group* (propilenoglicol by gavage and cisplatin intraperitoneally). The dose of cisplatin (5 mg kg^{-1} body weight) was injected i.p., 2, 5 and 20 days before the sacrifice the animals. The quercetin (50 mgkg^{-1} body weight) was given daily by gavage. The pre-treatment with quercetin reduced the histological and biochemical alterations and resulted in significant reduction in the lipid peroxidation 48 hours after cisplatin administration. The results suggest that quercetin may be used for reducing cisplatin-induced nephrotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Creatinina plasmática (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina ou cisplatina.....	38
Figura 2 – Creatinina urinária (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a administração i.p. de salina ou cisplatina	40

Figura 3 – “Clearance” da creatinina (ml/min/100g peso do rato) dos animais sacrificados 5 dias após a administração i.p. de salina ou cisplatina.....	42
Figura 4 – Fluxo urinário (ml/ 24h) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração i.p. de salina ou cisplatina.....	44
Figura 5 – Osmolalidade urinária (mOsm/ kgH ₂ O) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração i.p. de salina ou cisplatina.....	46
Figura 6 – Evolução do peso dos animais durante todos os dias do experimento.....	48
Figura 7 – Peso relativo dos rins (% de peso dos rins com relação ao peso corpóreo) dos animais sacrificados 5 e 20 dias após a administração i.p.de salina ou cisplatina.....	50
Figura 8 – Corte histológico de rim de rato, mostrando a região medular externa (ME) 5 dias após a injeção de salina ou cisplatina.....	54
Figura 9 –Níveis renais das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) (nMol/ g proteína) dos animais sacrificados 48 horas após a administração i.p. de salina ou cisplatina.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise histológica dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina ou cisplatina.....	53
--	----

APÊNDICE

Tabela 1 – Níveis plasmáticos de creatinina (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (C, P, Q) ou cisplatina (Cis, P + Cis, Q + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	C	P	Q	Cis	P+Cis	Q+Cis
Ratos						
1	0,63	0,57	0,69	1,25	1,07	0,80
2	0,74	0,33	0,76	0,80	0,71	0,88
3	0,73	0,39	0,86	1,00	0,79	0,88
4	0,67	0,95	0,23	3,10	1,35	0,69
5	0,67	0,84	0,84	0,95	0,85	0,56
6	0,71	0,65	0,51	2,48	0,66	0,69
7	0,57	0,63	0,55	2,38	0,77	0,53
8	0,70			3,03	0,85	0,62
9				1,49		0,68
10				1,25		0,81
11				1,39		0,61
12				1,58		0,62
13				0,99		0,81
14				0,88		0,48
Média	0,6775	0,6229	0,6343	1,612 ^a	0,8813	0,69 ^b
± DP	0,05625	0,2228	0,2229	0,7986	0,2256	0,1289
± EPM	0,01989	0,8420	0,08426	0,2134	0,07976	0,03445

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Controle*, ^b $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 2 - Níveis urinários de creatinina (mg/dl) dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (C, P, Q) ou cisplatina (Cis, P + Cis, Q + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	C	P	Q	Cis	P+Cis	Q+Cis
Ratos						
1	83,96	42,24	35,94	29,35	16,39	40,95
2	84,64	72,66	46,62	16,72	15,52	22,18
3	64,06	53,29	24,49	13,71	16,97	22,42
4	19,13	54,66	39,44	9,70	24,49	20,07
5	61,22	70,00	43,33	26,70	15,99	31,49
6	44,90	37,98	42,86	12,46	17,65	23,66
7	75,68	99,65	41,46	10,24	60,33	34,49
8	74,59			13,89	20,21	24,02
9				20,95		37,71
10				25,70		27,93
11				14,53		23,18
12				19,27		24,30
13				20,11		35,75
14				27,09		27,37
Média	63,52	61,50	39,16	18,60 ^a	29,44	28,25 ^b
± DP	22,22	21,18	7,276	6,592	15,19	6,653
± EPM	7,857	8,004	2,75	1,762	5,371	1,778

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Controle*, ^b $p < 0,05$ em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 3 – “Clearance” de Creatinina dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (C, P, Q) ou cisplatina (CP, P + Cis, Q + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	C	P	Q	Cis	P+Cis	Q+Cis
Ratos						
1	0,23	0,28	0,14	0,19	0,15	0,19
2	0,25	0,26	0,12	0,17	0,17	0,13
3	0,12	0,46	0,03	0,16	0,19	0,23
4	0,01	0,10	0,46	0,03	0,14	0,18
5	0,16	0,08	0,12	0,29	0,20	0,24
6	0,09	0,10	0,17	0,05	0,29	0,15
7	0,32	0,04	0,06	0,05	0,13	0,15
8	0,30			0,05	0,20	0,16
9				0,14		0,19
10				0,18		0,24
11				0,14		0,20
12				0,10		0,22
13				0,17		0,26
14				0,27		0,18
Média	0,1850	0,1886	0,1571	0,1421	0,1838	0,1943
± DP	0,1084	0,1506	0,1417	0,08021	0,05069	0,03936
± EPM	0,03831	0,05705	0,05367	0,02144	0,01792	0,01052

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 4 – Fluxo urinário (ml/ 24 h) dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (C, P, Q) ou cisplatina (Cis, P + Cis, Q + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	C	P	Q	Cis	P+Cis	Q+Cis
Ratos						
1	7	16	10	24	34	11
2	8	5	8	29	28	21
3	5	14	3	35	30	30
4	2	6	11	30	24	14
5	7	4	10	36	38	24
6	6	5	8	30	35	22
7	9	1	3	30	6	10
8	11			34	32	24
9				32		10
10				30		22
11				50		26
12				30		20
13				28		17
14				32		20
Média	6,875	7,286	7,571	32,14 ^a	28,38	19,36 ^b
± DP	2,696	5,529	3,309	5,96	10,03	6,184
± EPM	0,9531	2,09	1,251	1,593	3,545	1,653

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a p < 0,05 em comparação com o *Grupo Controle*, ^b p < 0,05 em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 5 – Fluxo urinário (ml / 24 h) dos animais sacrificados 20 dias após a injeção i.p. de salina (C, P, Q) ou cisplatina (Cis, P + Cis, Q + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	C	P	Q	Cis	P+Cis	Q+Cis
Ratos						
1	10	10	11	32	20	18
2	3	19	29	30	40	29
3	12	13	13	31	21	30
4	20	10	13	26	25	26
5	6	12	12	24	28	12
6	8	12	20	34	22	19
7	12			40	30	26
8	22			22		26
9				26		8
10						20
11						10
Média	11,63	12,67	16,33	29,44 ^a	26,00	20,36
± DP	6,545	3,327	6,976	5,593	7,457	7,749
± EPM	2,314	1,358	2,848	1,864	3,044	2,337

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a p < 0,05 em comparação com o *Grupo Controle*. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 6 - Osmolalidade urinária (mOsm/ kg H₂O) dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (C, P, Q) ou cisplatina (Cis, P + Cis, Q + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	C	P	Q	Cis	P+Cis	Q+Cis
Ratos						
1	2343	1279	1405	672	607	1123
2	1953	2173	1775	609	667	664
3	1778	1705	1075	517	662	663
4	751	1889	1762	572	685	770
5	1670	2562	1768	614	754	739
6	1667	969	1644	543	576	754
7	1814		1895	537	2604	1328
8	1726			552	681	811
9				559		904
10				636		751
11				400		795
12				618		711
13				660		959
14				931		1079
Média	1713	1763	1618	601,4 ^a	904,5	858,6 ^b
± DP	447,0	581,5	284,5	117,4	688,8	197,0
± EPM	158,0	237,4	107,5	31,37	243,5	52,65

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a p < 0,05 em comparação com o *Grupo Controle*, ^b p < 0,05 em comparação com o *Grupo Cisplatina*. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 7 - Osmolalidade urinária (mOsm/kgH₂O) dos animais sacrificados 20 dias após a injeção i.p. de salina (C, P, Q) ou cisplatina (Cis, P + Cis, Q + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	C	P	Q	Cis	P+Cis	Q+Cis
Ratos						
1	1854	1636	1999	886	860	1227
2	1988	1371	1175	801	577	961
3	1520	1569	1603	728	1172	936
4	1429	1454	1543	987	705	662
5	2236	1621	1661	837	768	1393
6	2204	1605	1736	768	905	1029
7	1416			399	906	500
8	1110			660		886
9				546		1633
10						947
11						1523
Média	1720	1543	1620	734,7 ^a	841,9 ^a	1063
± DP	410,5	106,5	269,5	179,0	187,9	349,6
± EPM	145,1	43,5	110,0	59,68	71,01	105,4

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a p < 0,05 em comparação com o *Grupo Controle*. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 8 - Evolução do peso (g) dos ratos durante o experimento

	Peso (g)						
	-1	0	1	2	3	4	5
C	224,4	234,2	238,5	247,3	256,3	264,1	272,5
P	229,0	236,1	239,2	245,1	252,9	265,8	266,4
Q	220,7	230,4	229,9	246,2	251,8	263,2	267,2
Cis	225,9	232,4	230,8	232,2	225,5	225,5	227,5
P + Cis	222,6	228,8	231,2	232,9	230,9	232,3	239,9
Q + Cis	227,4	233,6	235,8	238,8	236,1	234,6	241,4

0 = dia da administração do diluente da cisplatina

Cada valor corresponde à média dos pesos corpóreos (g) dos animais.

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina.

Tabela 9 – Efeito do tratamento com doses múltiplas de quercetina (50 mg/ kg) sobre o peso dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (C, P, Q) ou cisplatina (Cis, P + Cis, Q + Cis).

Grupo	Peso corpóreo (g)	% Controle
C	272,5	100
P	266,4	97,76
Q	267,2	98,06
Cis	227,5	83,49
P + Cis	239,9	88,04
Q + Cis	241,4	88,59

Cada valor corresponde à média dos pesos corpóreos (g) dos animais.

Grupos: C = Controle; P = Propilenoglicol; Q = Quercetina; Cis = Cisplatina; P + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; Q + Cis = Quercetina + Cisplatina.

Tabela 16 - Peso relativo dos rins (% de peso dos rins com relação ao peso corpóreo) dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (GC, GP, GQ) ou cisplatina (GCis, GP + Cis, GQ + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	GC	GP	GQ	GCis	GP+Cis	GQ+Cis
Ratos						
1	0,75	0,79	0,78	0,94	1,01	0,91
2	0,74	0,80	0,80	0,91	0,99	0,94
3	0,80	0,75	0,78	1,00	1,04	0,93
4	0,74	0,83	0,70	1,17	1,19	0,92
5	0,72	0,83	0,87	1,03	1,02	0,80
6	0,73	0,76	0,69	1,36	0,90	0,85
7	0,73	0,73	0,78	1,41	0,78	0,86
8	0,74			1,11	0,95	0,81
9				1,13		0,80
10				0,97		0,91
11				0,98		0,91
12				0,99		0,76
13				0,96		0,87
14				0,96		0,84
Média	0,7438	0,7843	0,7714	1,066 ^a	0,985	0,865 ^b
± DP	0,02446	0,0391	0,06122	0,155	0,118	0,05708
± EPM	0,008647	0,01478	0,02314	0,04143	0,0417	0,01525

Grupos: GC = Controle; GP = Propilenoglicol; GQ = Quercetina; GCis = Cisplatina; GP + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; GQ + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a $p < 0,05$ em comparação com o GC, ^b $p < 0,05$ em comparação com o GCis. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 17 - Peso relativo dos rins (% de peso dos rins com relação ao peso corpóreo) dos animais sacrificados 20 dias após a injeção i.p. de salina (GC, GP, GQ) ou cisplatina (GCis, GP + Cis, GQ + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	GC	GP	GQ	GCis	GP+Cis	GQ+Cis
Ratos						
1	0,72	0,70	0,65	0,77	0,78	0,69
2	0,61	0,72	0,68	0,69	0,96	0,58
3	0,60	0,70	0,65	0,74	0,66	0,70
4	0,70	0,72	0,71	0,62	0,81	0,80
5	0,78	0,65	0,71	0,69	0,64	0,74
6	0,68	0,64	0,71	0,81	0,70	0,69
7	0,64			0,96		0,62
8	0,66			0,76		0,68
9				0,71		0,64
10						0,65
11						0,72
Média	0,6738	0,6883	0,685	0,75	0,7583	0,6827
+ - DP	0,05975	0,03488	0,0295	0,09618	0,1191	0,06018
± EPM	0,02112	0,01424	0,01204	0,03206	0,04861	0,01815

Grupos: GC = Controle; GP = Propilenoglicol; GQ = Quercetina; GCis = Cisplatina; GP + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; GQ + Cis = Quercetina + Cisplatina. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 18 - Análise histológica dos rins dos animais sacrificados 5 dias após a injeção i.p. de salina (GC, GP, GQ) ou cisplatina (GCis, GP + Cis, GQ + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	GC	GP	GQ	GCis	GP+Cis	GQ+Cis
Escores						
0	6	6	6			2
1						1
2						2
3						3
4				12	6	6
Média	0	0	0	4,0 ^{a, b, c}	4,0 ^{a, b, c}	2,71
± DP				0	0	1,49
± EPM				0	0	0,40

Grupos: GC = Controle; GP = Propilenoglicol; GQ = Quercetina; GCis = Cisplatina; GP + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; GQ + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a p < 0,05 em comparação com o GC, ^b p < 0,05 em comparação com o GP, ^c p < 0,05 em comparação com o GQ. ANOVA e pós teste de Tukey.

Tabela 19 - Análise histológica dos rins dos animais sacrificados 20 dias após a injeção i.p. de salina (GC, GP, GQ) ou cisplatina (GCis, GP + Cis, GQ + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	GC	GP	GQ	GCis	GP+Cis	GQ+Cis
Escores						
0	8	6	6			2
1						3
2					1	1
3				2	1	3
4				8	4	3
Média	0	0	0	3,8 ^{a, b, c}	3,5 ^{a, b, c}	2,16
± DP				10,09	6,25	4,06
± EPM				3,19	2,55	1,17

Grupos: GC = Controle; GP = Propilenoglicol; GQ = Quercetina; GCis = Cisplatina; GP + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; GQ + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a p < 0,05 em comparação com o GC, ^b p < 0,05 em comparação com o GP, ^c p < 0,05 em comparação com o GQ. ANOVA e pós teste de Tukey.

Tabela 20 - Níveis renais de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRATB) dos animais sacrificados 48 horas após a injeção i.p. de salina (GC, GP, GQ) ou cisplatina (GCis, GP + Cis, GQ + Cis). Doses múltiplas de quercetina (50 mg/kg)

Grupos	GC	GP	GQ	GCis	GP+Cis	GQ+Cis
Ratos						
1	123,78	106,07	121,57	143,09	180,21	94,21
2	105,75	131,07	136,28	204,77	141,85	125,37
3	87,63	123,15	115,99	195,99	155,58	134,23
4	133,06	119,56	108,36	181,48	182,35	144,10
5	111,93	120,88	97,24	131,18	139,96	129,86
6	116,25	135,75		182,16	125,29	119,92
7				170,58		93,88
Média	113,1	122,7	115,9	172,8 ^a	154,1	120,2 ^b
± DP	15,66	10,30	14,60	26,90	23,16	19,39
± EPM	6,394	4,204	6,529	10,17	9,454	7,33

Grupos: GC = Controle; GP = Propilenoglicol; GQ = Quercetina; GCis = Cisplatina; GP + Cis = Propilenoglicol + Cisplatina; GQ + Cis = Quercetina + Cisplatina. ^a p < 0,05 em comparação com o GC, ^b p < 0,05 em comparação com o GCis. Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn.

Tabela 21 – Composição da ração para roedores Formulação FZEA (USP)

Componentes	%
Fubá de milho	52,0
Farelo de soja	20,1
Farinha de carne	10,0
Farelo de trigo	7,0
Farinha de peixe	7,0
Caulim	2,0
Óleo vegetal	1,0
Sal comum	0,5
Farinha de osso	0,4
Mistura mineral e vitamínica	0,15

Tabela 22 – Composição percentual da ração para roedores

	%
Teor de umidade	11,50
Proteína bruta	23,10
Extrato etéreo	4,45
Matéria fibrosa	3,20
Cálcio	9,85
Matéria mineral	2,14
Fósforo	1,28
Sódio	0,36
Potássio	0,80
E.N.N.	47,90

Tabela 23 – Enriquecimento por quilograma de ração

Componente	
Vitamina A	3000 UI
Vitamina B ₁	750 mcg
Vitamina B ₂	1260 mcg
Vitamina B ₆	750 mcg
Vitamina B ₁₂	2 mcg
Vitamina B ₃	555 UI
Vitamina E	6300 mcg
Vitamina K	750 mcg
Ácido pantotênico	3750 mcg
Ácido fólico	120 mcg
Biotina	52,5 mcg
Colina	9000 mcg
Metionina	300 mcg
Manganês	12,6 mcg

Ferro	10,05 mcg
Zinco	9,0 mcg
Cobre	1,5 mcg
Iodo	0,105 mcg
Selênio	0,04 mcg

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)