



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

CLARICE DE ARAÚJO SALES

PADRONIZAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA INDUZIDA POR CISPLATINA
EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

FORTALEZA

2022

CLARICE DE ARAÚJO SALES

PADRONIZAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA INDUZIDA POR CISPLATINA
EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá

Coorientador: Me. Mikael Almeida Lima

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S155p Sales, Clarice de Araújo.
Padronização da doença renal crônica por cisplatina em modelo experimental in vivo /
Clarice de Araújo Sales. – 2022.
56 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará,
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá.
Coorientação: Prof. Me. Mikael Almeida Lima.

1. Doença renal crônica. 2. Agente antineoplásico. 3. Fármaco antitumoral. I. Título.

CDD 615

CLARICE DE ARAÚJO SALES

PADRONIZAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA INDUZIDA POR CISPLATINA
EM MODELO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

Monografia apresentada ao curso de Farmácia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Farmacêutico.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.^a Dra. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Dayara de Oliveira Silva
Universidade federal do Ceará (UFC)

A Jeová.

À minha mãe, Cláudia.

Aos meus irmãos, Kamila e Filipe.

À minha amiga, Luiza.

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus, pelos anos de amor e amizade, por ter me sustentado em todas as quedas e conferido a todos a benção que é a capacidade de aprender.

Aos camundongos cedidos para a realização desse trabalho (*in memoriam*), sequer consigo expressar em palavras a dificuldade que é depender de suas vidas para que outras vidas possam ser beneficiadas. Os sacrifícios jamais serão esquecidos.

À minha mãe, por todo o esforço e abnegação realizados para concretizar a realização desse sonho, por todos os leites quentes servidos em meio as noites acordadas e todo o amor demonstrado em uma vida. Pra senhora, todo o amor do mundo.

Aos meus irmãos, por todo o apoio e todos os “se precisar de mim é só chamar”. E por de fato terem estado. Se um cordão tríplice não pode ser rompido, que bom que nós somos três. Eu amo vocês.

À minha melhor amiga de vida Luiza, por ter confiado em mim, quando eu duvidei. Por todos os anos de dedicação e amizade, e praticamente ter feito o curso comigo porque eu precisava recitar tudo que aprendi pra fixar melhor. Te amo.

À LAAC, Igor, Isabelle, Livinha, Luana, Raíssa, Samyia, Stephanie e Thaís por todas as risadas e momentos compartilhados.

Ao meu orientador Alexandre, por ter me acolhido em seu laboratório, por todo o tempo dedicado para a realização não só desse projeto, mas os projetos de toda uma equipe. Seu amor a pesquisa, amizade e ótimo senso de humor torna o laboratório um lugar muito especial.

Ao meu coorientador Mika, por todo o carinho, orientação e tempo dedicado, que me ajudaram muito nessa reta final.

Aos meus amigos do laboratório, Dayara, Enock, Klingem, Marcus, Thiago e Vinícius, por toda a ajuda, amizade e compreensão. Foi uma honra ter dividido esse tempo com pessoas de um coração tão grande.

A todos os professores, farmacêuticos prescritores e outros profissionais que dividiram seus conhecimentos comigo, pra que eu pudesse estar tendo essa alegria agora, meu muito obrigada.

À banca examinadora, pelas considerações.

“Long story short, I survived.”
(Taylor Swift, 2020).

RESUMO

A cisplatina (CIS) é um antineoplásico bastante utilizado no tratamento do câncer de ovários, testículos, cérebro, bexiga, pulmão, mama e outros tumores sólidos. No entanto, sua utilização é limitada na prática clínica devido ao seu potencial de causar nefrotoxicidade. A doença renal crônica (DRC) é caracterizada como uma condição clínica irreversível de injúria renal em que a estrutura ou a função renal apresenta, de forma persistente, alterações que prejudicam o seu funcionamento. Mesmo quando restaurada a função renal após uma lesão renal aguda (LRA), esses pacientes se constituem um grupo de risco para DRC, sendo necessário estudos que avaliem os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da mesma e possíveis intervenções terapêuticas. O presente estudo buscou a padronização de um modelo de indução de DRC por cisplatina em camundongos fêmeas. Os animais foram separados em 4 grupos: controle (n=8) e cisplatina nas doses 3, 5 e 8 mg/kg (n=10). Os animais receberam a administração via intraperitoneal (IP) de solução salina 0,9%, no caso do grupo controle, e de cisplatina nas suas respectivas doses, uma vez por semana, durante quatro semanas. Ao final da quarta semana, os animais foram eutanasiados para coleta dos materiais biológicos sangue, urina e tecido renal. O modelo de lesão proposto conseguiu provocar alterações significativas em todos os parâmetros fisiológicos analisados. A creatinina plasmática se mostrou aumentada na dose de 5 e 8 mg/kg; mas a ureia, apenas na dose de 8 mg/kg. Parâmetros como o clearance de creatinina, proteinúria e avaliação da concentração da enzima gama glutamil transferase (Gama-GT) não apresentaram diferenças significantes com relação ao grupo controle. A expressão de genes para produção de colágeno tipo 1 alfa-2 (Col1A2), molécula de injúria renal 1 (KIM-1) e endotelina se mostraram significativamente elevadas em todos os grupos, enquanto não foi observado aumento na transcrição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Conclui-se a necessidade de aumento no tempo de indução de lesão, para que seja observado o estabelecimento efetivo de marcadores relacionados a DRC.

Palavras-chave: Doença Renal Crônica; Agente Antineoplásico; Fármaco Antitumoral.

ABSTRACT

Cisplatin is a widely used antineoplastic in the treatment of several cancers of the ovary, testicles, brain, bladder, lung, breast, and other solid tumors. However, its use is limited in clinical practice because of its potential to cause nephrotoxicity. Chronic kidney disease (CKD) is characterized as an irreversible clinical condition of kidney injury in which the kidney structure or function is persistently impaired. Even when renal function is restored after an acute kidney injury (AKI), these patients are at risk group for CKD, and this requires studies that evaluate the mechanisms involved in the development of CKD and possible therapeutic interventions. The present study aims to standardize a model of CKD induction by cisplatin in female mice. The animals were separated into 4 groups: control (n=8) and cisplatin at doses of 3, 5 and 8 mg/kg (n=10). The animals received 0,9% saline solution intraperitoneally in the case of the control group, and cisplatin at their respective doses once a week for four weeks. At the end of the fourth week, the animals were euthanized to collect blood, urine, and kidney tissue. The proposed lesion model was able to cause significant changes in all the physiological parameters analyzed. Plasma creatinine was increased in the 5 and 8 mg/kg dose, and urea was increased only in the 8 mg/kg dose. Parameters such as creatinine clearance, proteinuria and evaluation of gamma glutamyl transferase (Gamma-GT) enzyme concentration did not show significant differences in relation to the control group. The expression of genes for collagen type 1 alpha 2 (Col1A2), kidney injury molecule-1 (KIM-1) and endothelin production were significantly elevated in all groups, while no increase in tumor nuclear factor alpha (TNF- α) mRNA expression was observed. We conclude that it is necessary to increase the time of injury induction in order to observe the effective establishment of markers related to CKD.

Keywords: Chronic Kidney Disease; Antineoplastic Agents; Antitumoral Drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da cisplatina	19
Figura 2	Fisiopatologia da nefrotoxicidade por cisplatina	21
Figura 3	Mecanismos de lesão celular da cisplatina	22
Figura 4	Modelo esquemático do protocolo experimental	25
Figura 5	Avaliação do peso renal na lesão renal	31
Figura 6	Comparação da perda de massa corpórea	32
Figura 7	Avaliação do consumo de água	33
Figura 8	Avaliação do fluxo urinário	34
Figura 9	Análise dos níveis plasmáticos de creatinina	35
Figura 10	Análise dos níveis plasmáticos de ureia	36
Figura 11	Avaliação da taxa de filtração glomerular	37
Figura 12	Avaliação da concentração de proteína urinária	38
Figura 13	Avaliação da concentração urinária da enzima Gama-GT	39
Figura 14	Avaliação da transcrição gênica de Colágeno 1 A-2	40
Figura 15	Avaliação da transcrição gênica de Endotelina	41
Figura 16	Avaliação da transcrição gênica de TNF- α	42
Figura 17	Avaliação da transcrição gênica de KIM-1	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de risco por TFG e albuminúria	16
Tabela 2	Sequência de primers utilizados para qPCR	29
Tabela 3	Síntese dos resultados obtidos	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	Fator de Indução de Apoptose
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutada
CIS	Cisplatina
Col1A2	Colágeno tipo I alfa 2
COX-2	Ciclo-oxigenase – 2
CTR1	Transportador de Cobre Tipo 1
DRC	Doença Renal Crônica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FFR	Falência Funcional Renal
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GSH	Glutathiona Reduzida
Gama GT	Gama-Glutamil Transferase
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular 1
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 3
KDIGO	<i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
KIM-1	Molécula de Injúria Renal 1
LRA	Lesão Renal Aguda
MAPK	Via de sinalização da proteína quinase ativada por quinase
NF-KB	Fator Nuclear κ B
OCT2	Transportador de cátions orgânicos tipo 2
PIDD	Proteína induzida por p53 com domínio de morte
PUMA-α	Modulador de apoptose induzido por p53
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.1	Doença Renal Crônica.....	14
1.1.1	<i>Classificação da DRC.....</i>	15
1.1.2	<i>Lesão renal por medicamentos.....</i>	17
1.2	Cisplatina.....	18
1.2.1	<i>Mecanismo de ação da cisplatina</i>	19
1.2.2	<i>Nefrotoxicidade da cisplatina.....</i>	19
2.	JUSTIFICATIVA	22
3.	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo Geral	23
3.2	Objetivos Específicos	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1	Aquisição dos Animais	24
4.2	Compostos e substâncias	24
4.3	Grupos Experimentais.....	24
4.4	Desenho Experimental	25
4.5	Avaliação dos Parâmetros Fisiológicos	26
4.6	Avaliação dos parâmetros bioquímicos	26
4.6.1	<i>Avaliação da Função Renal: Clearance de Creatinina</i>	26
4.6.2	<i>Avaliação do Dano Tubular: Gama-GT urinária</i>	27
4.7	Análise da expressão gênica.....	27
4.7.1	<i>Extração de RNA</i>	27
4.7.2	<i>Síntese de cDNA.....</i>	28
4.7.3	<i>PCR quantitativo em tempo real (qPCR)</i>	28
4.8	Análise Estatística	29
5	RESULTADOS	31
5.1	Avaliação dos parâmetros fisiológicos	31
5.2	Avaliação dos parâmetros bioquímicos	35
5.3	Avaliação da função renal.....	37
5.4	Avaliação do proteinúria	38
5.5	Avaliação do dano tubular	39
5.6	Avaliação da expressão gênica.....	40

6	DISCUSSÃO	44
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença Renal Crônica

A doença renal crônica (DRC) é caracterizada como uma condição clínica irreversível em que a estrutura ou a função renal apresenta, de forma persistente, alterações que prejudicam o seu funcionamento (AMMIRATI, 2020). A cronicidade da doença é evidenciada a partir da duração de três meses ou mais de alterações nos principais parâmetros de avaliação de função renal, como a taxa de filtração glomerular (TFG), creatinina e ureia, ou em danos do parênquima renal, evidenciado pela albuminúria (LEVEY *et al.*, 2012; ROMAGNANI *et al.*, 2017).

Segundo dados da Sociedade Internacional de Nefrologia, estima-se que cerca de 10% da população mundial possui diagnóstico de DRC (INKER *et al.*, 2014). No Brasil, a Sociedade Brasileira de Nefrologia estima que cerca de dez milhões de pessoas sejam portadoras da doença, sendo que dentre estes, aproximadamente 144 mil estão em tratamento dialítico, manejo necessário nos estágios mais avançados da doença (NERBASS *et al.*, 2022).

A fisiopatologia da DRC está relacionada especialmente à ocorrência de processo de fibrose glomerular e/ou tubular. A perda de néfrons por qualquer circunstância lesiva aciona mecanismos compensatórios no próprio sistema renal, com a finalidade de manter o ritmo de filtração glomerular. Os néfrons restantes são estimulados a aumentar a sua atividade culminando no processo de hipertrofia glomerular, com acionamento do sistema renina-angiotensina para aumentar a TFG. A hipertensão glomerular provocada é responsável por desestruturar a organização dos podócitos, resultando em proteinúria (ROMAGNANI *et al.*, 2017). Logo, a exposição a circunstâncias que culminem na perda de néfrons; como por processos inflamatórios e hipertrofia de néfrons por excesso de filtração glomerular, são fatores que precedem a ocorrência da DRC (VIANNA *et al.*, 2011).

Os fatores de risco associados a ocorrência dessa enfermidade são variados e incluem a hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e diabetes mellitus, devido a elevação da taxa de filtração glomerular, ocasionando uma sobrecarga renal que culmina na ocorrência de lesão e fibrose do tecido renal (MORAIS *et al.*, 2022; ROMAGNANI *et al.*, 2017).

A idade também é um fator relevante, tendo em vista que paciente idosos apresentam natural predisposição de diminuição da taxa de filtração glomerular, e muitas vezes apresentam de forma concomitante as doenças crônicas mencionadas acima (BASTOS *et al.*, 2010). Destaca-se nesse grupo, além da ocorrência de doenças crônicas e processos infecciosos, a exposição prolongada à fármacos nefrotóxicos, sendo responsáveis por causar, através de variados mecanismos, lesão glomerular e tubular (ROMAGNANI *et al.*, 2017). Ademais, idosos apresentam maiores chances de internação e a lesão renal aguda (LRA), que possui elevada prevalência em pacientes hospitalizados, pode levar a ocorrência de DRC de forma silenciosa (BASTOS *et al.*, 2010).

As principais complicações envolvidas em lesões renais avançadas envolvem anemia, causada pela incapacidade dos rins de atuar na produção de eritropoetina, essencial para produção de hemácias (ROMAGNANI *et al.*, 2017). Alterações do metabolismo mineral com consequente alterações na estrutura óssea são frequentes em pacientes com DRC, tendo em vista a atuação dos rins no metabolismo do cálcio e fósforo, bem como sua influência na liberação do paratormônio e conversão do calcitriol. Outras complicações envolvem acidose metabólica, hipertensão arterial e dislipidemias. (VIEIRA *et al.*, 2001; DHONDUP; QIAN, 2017).

O diagnóstico da DRC muitas vezes é realizado através do acompanhamento de pacientes que possuam fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença. Os pacientes são acompanhados para dosagem da creatinina sérica (sCR) afim de estimar, através da utilização de fórmulas, a Taxa de Filtração Glomerular (TFG) (BASTOS *et al.*, 2010). A utilização de marcadores de lesão, como a proteinúria, também tem papel essencial no diagnóstico e, em associação com a TFG, auxiliam na determinação do estágio de progressão e risco da doença (AMMIRATI, 2020).

1.1.1 Classificação da DRC

De acordo com a classificação elaborada em 2012 pela organização *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO), a DRC pode ser classificada em cinco estágios de gravidade levando em consideração a TFG e albuminúria (INKER *et al.*, 2014). Detectar o estágio de progressão da DRC é importante na

prática clínica para definir o manejo farmacoterapêutico apropriado e retardar a progressão a níveis de maior gravidade.

Para fins diagnósticos, a DRC é estabelecida na constatação de lesão do parênquima renal, através de marcadores de lesão, como relação albumina/creatinina acima de 30 mg/g ou TFG abaixo de 60 ml/min/1,73 m² por um período igual ou superior a três meses (INKER *et al.*, 2014).

A falência funcional renal (FFR), ou último estágio da doença renal ocorre quando a TFG atinge valores inferiores a 15 ml/min/1,73 m², sendo necessário o manejo com terapias de substituição, como as diálises, peritoneal ou hemodiálise, realizadas nos estágios iniciais de falência renal, ou mais tardiamente, o transplante renal (CORESH *et al.*, 2014).

Classificações mais específicas de gravidade podem ser realizadas levando em consideração a associação entre a TFG e a albuminúria, como demonstrado na **Tabela 1**. A cor verde representa baixo risco, risco moderado é representado pela cor amarela, laranja alto risco e vermelho risco extremamente elevado. Observa-se que mesmo em estágios moderados de diminuição da TFG, a elevação da albuminúria é suficiente para estimar um risco de falência renal elevado.

Tabela 1. Classificação de risco por TFG e albuminúria (A).

Classificação TGF (ml/min/1,73m ²)			Albuminúria		
			A1 <30 mg/g	A2 30-300 mg/g	A3 >300 mg/g
G1	Lesão renal com TFG normal ou elevada	≥ 90			
G2	Lesão renal com TFG levemente diminuída	60 - 89			
G3a	Lesão renal com TFG leve a moderadamente diminuída	45 - 59			
G3b	Lesão renal com TFG moderada a severamente diminuída	30 - 44			
G4	Lesão renal com TFG severamente diminuída	15 - 29			
G5	FFR	< 15			

Fonte: Adaptado de AMMIRATI, 2020.

Detectar o estágio da DRC corretamente é um dos primeiros passos para o manejo adequado do quadro do paciente, pois quando realizado de forma precoce, auxilia na escolha do tratamento adequado a ser utilizado a cada paciente, e principalmente, a evitar a progressão da doença e aumento da mortalidade pela mesma.

1.1.2 Lesão renal por medicamentos

Os rins constantemente estão expostos a agentes com potencialidade nefrotóxica, tendo em vista seu envolvimento no processo de excreção na farmacocinética de fármacos e seus metabólitos por meio da filtração glomerular, reabsorção e secreção tubular. A toxicidade pode ocorrer de uma forma dose dependente, podendo ser elucidada através do ajuste da dose do fármaco e monitoramento, ou independente da dose, também chamada de idiossincrática (MODY *et al.*, 2020).

A literatura indica que cerca de 25% dos casos de LRA são provenientes de fármacos nefrotóxicos (WU; HUANG, 2018). Sendo assim, a identificação das classes de fármacos e possíveis associações medicamentosas que possuam capacidade de exercer danos ao tecido renal é essencial para prevenir, tratar ou retardar a piora da condição clínica do paciente, como a ocorrência de DRC e até mesma falência renal.

Os mecanismos associados à nefrotoxicidade são variados e podem ocorrer em diferentes compartimentos dos néfrons. Os medicamentos podem atuar alterando a hemodinâmica glomerular, como ocorre no caso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) inibidores seletivos pra COX-2, enzima responsável pela produção de prostaglandinas que atuam na regulação do fluxo sanguíneo renal. Estudos indicam que as reações adversas envolvidas em seu uso incluem a diminuição da TFG, provocando isquemia renal, hipertensão e proteinúria (WHELTON, 1999; DUN *et al.*, 1984).

Fármacos como os antibióticos e antineoplásicos atuam provocando toxicidade às células tubulares de forma direta. Aminoglicosídeos como a gentamicina e ampicacina são endocitados pelas células tubulares renais e induzem as células a entrar em processo de apoptose. Estimulam também a ocorrência de um processo inflamatório com produção de citocinas pró-inflamatórias. A produção

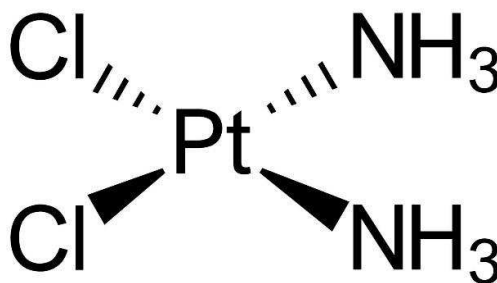
de espécies reativas de oxigênio (ERO), é outro mecanismo comum de lesão celular por fármacos, haja vista sua capacidade de provocar peroxidação lipídica e degradação de proteínas (WU; HUANG, 2018; MODY *et al.*, 2020).

Sendo assim, o estudo das características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de cada classe terapêutica junto à análise do quadro clínico do paciente se faz necessário para prevenir a ocorrência de nefrotoxicidade ou realizar o planejamento do manejo adequado em pacientes em condições de risco.

1.2 Cisplatina

A cisplatina (CIS), de nomenclatura química *cis*-diaminodicloroplatina (II), é um potente quimioterápico utilizado no tratamento de cânceres de ovários, testículos, cérebro, bexiga, pulmão, mama e outros tumores sólidos, cuja estrutura química está representada na **Figura 1** (GHOSH, 2019). Devido a sua vasta aplicabilidade e eficiente atividade terapêutica, é um componente indispensável em protocolos clínicos antineoplásicos.

Figura 1. Estrutura química da cisplatina.



Fonte: Adaptado de GHOSH, 2019.

No entanto, seu uso sofre algumas limitações devido a mecanismos de resistência ao fármaco e reações adversas graves em tecidos saudáveis, como a nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade, náuseas, vômitos e mielossupressão associada à sua ação de retardar a rápida proliferação celular da medula óssea. Por esses motivos, estratégias de associação da cisplatina com outros quimioterápicos e o desenvolvimento de outros derivados da platina, como a carboplatina e oxaliplatina são utilizadas para diminuir as chances de

desenvolvimento de resistência ao fármaco e minimizar a ocorrência de reações adversas, respectivamente (DASARI; TCHOUNWOU, 2014; YAO *et al.*, 2007).

Dentre as reações adversas, a nefrotoxicidade ocorre com elevada frequência, visto que cerca de 90% da excreção da cisplatina ocorre via eliminação renal, fato que justifica o elevado acúmulo de cisplatina nos rins (PERES; CUNHA, 2013). Estima-se que cerca de 30% dos pacientes em tratamento apresentaram episódios de LRA. O mecanismo da injúria renal está relacionado com a indução de processos inflamatórios, estresse oxidativo e apoptose (YAO *et al.*, 2007). Os danos ocorrem com maior intensidade nas células tubulares proximais, devido a concentração da cisplatina nessa região dos néfrons ser cerca de cinco vezes maior que a concentração sérica (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

1.2.1 Mecanismo de ação da cisplatina

A entrada da cisplatina nas células ocorre através de difusão passiva pela membrana plasmática, podendo ocorrer também através de transportadores de cobre (CTR1). Na circulação sanguínea o fármaco permanece em sua forma inalterada devido ao excesso de íons cloreto extracelulares, sendo boa parte da sua concentração ligada a proteínas plasmáticas, como a albumina. Logo, a concentração de fármaco livre para atividade terapêutica é reduzida (YAO *et al.*, 2007; PERES; CUNHA, 2013).

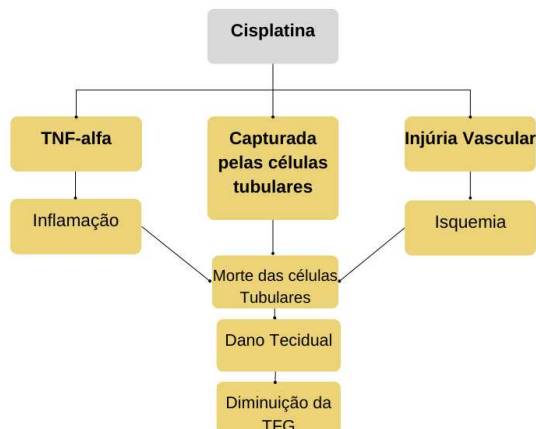
Ao entrar na célula, a cisplatina é convertida a sua forma hidrolisada, sendo um potente eletrófilo, capaz de atrair moléculas nucleofílicas, tais como grupos sulfidrilas de proteínas, e, relacionado ao seu principal mecanismo de ação, os ácidos nucleicos. A intercalação da cisplatina com as bases nitrogenadas provocam alterações significativas na estrutura dupla hélice do DNA, alterações essas reconhecidas por mecanismos celulares responsáveis pelo processamento de material genético, podendo levar a reparação ou ativação de mecanismos apoptóticos (KISS; ACKLIN, 2021).

1.2.2 Nefrotoxicidade da cisplatina

A nefrotoxicidade da cisplatina está relacionada aos mesmos mecanismos de ação responsáveis pela sua atividade terapêutica. A cisplatina tem como principal

via de eliminação a excreção renal, ocorrendo através de filtração glomerular e secreção tubular. Logo, não é de admirar que a nefrotoxicidade seja o principal evento adverso relacionado a terapia antineoplásica com o fármaco. Estudos indicam que as células tubulares proximais apresentam demasiada expressão de transportadores CTR1 e transportadores de cátions orgânicos (OCTs), responsáveis pelo transporte ativo da cisplatina pela membrana plasmática das células, resultando em aumento da concentração e toxicidade (NEVES; VARGAS, 2011; YAO *et al.*, 2007). Os principais mecanismos de nefrotoxicidade por cisplatina são ilustrados na **Figura 2**.

Figura 2. Fisiopatologia da nefrotoxicidade por CIS.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor. Adaptada de PABLA; DONG, 2008.

Dentre os mecanismos de controle celular, a via p53 é responsável pela supervisão da integridade do DNA. Logo, em situações de alterações do material genético ou produção de oncogenes, a via p53 regula processos de controle do ciclo celular e apoptose. A cisplatina ativa fatores capazes de ativar a via p53, como as proteínas quisases da via Ataxia Telangiectasia Mutada (ATM). Quando ativada, a p53 aciona vias de sinalização para apoptose como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), PIDD e a PUMA- α (OLA *et al.*, 2011).

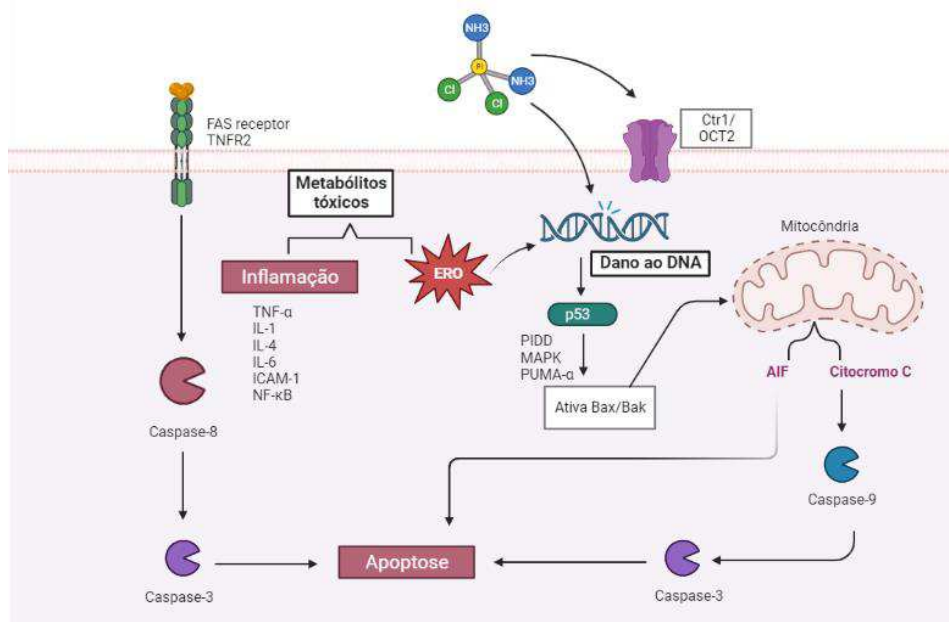
A cisplatina também exerce sua atividade citotóxica através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O estresse oxidativo gerado nas células causam danos em proteínas, lipídeos e DNA, sendo capaz de ativar vias de apoptose extrínsecas, como a via receptor Fas, com ativação de caspases 8, indutora de apoptose, e intrínsecas, como a via mitocondrial (HU; KAVANAGH,

2003; WILLIS *et al.*, 2003). A lesão da cisplatina às mitocôndrias através de estresse oxidativo, ativa proteínas pró-apoptóticas, como a Bax, provocando a ruptura da membrana da mitocôndria, com liberação do citocromo c, ativando a via das caspases que levam a apoptose, e o fator indutor de apoptose (AIF) independente de caspases (YAO *et al.*, 2007; PERES; CUNHA, 2013).

Intracelularmente, a cisplatina também é conjugada a metabólitos nefrotóxicos altamente reativos. A cisplatina é conjugada a glutatona reduzida (GSH), um potente antioxidante. O conjugado formado é clivado a um metabólito conjugado de cisteína, que é metabolizado a compostos tióis altamente reativos, capaz de se ligar a proteínas, exercendo assim ação nefrotóxica (WILMES *et al.*, 2014).

Por fim, uma intensa resposta inflamatória tecidual ocorre pelo estímulo da produção de citocinas e quimiocinas, como TNF- α , NF- κ B, e interleucinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-8, como ilustrado na **Figura 3**. A lesão tecidual causada contribui com a ocorrência de processos de restauração tecidual com células não específicas, através do processo de fibrose renal, culminando em uma DRC, em estágios avançados de lesão (PABLA; DONG, 2008; PERES; CUNHA, 2013).

Figura 3. Mecanismos de lesão celular da CIS.



Fonte: Elaborada pelo próprio autor em BioRender.

2. JUSTIFICATIVA

A nefrotoxicidade induzida pela cisplatina é um fator limitante na utilização do fármaco em terapias antineoplásicas. Estima-se que cerca de 30% dos pacientes em tratamento desenvolvem lesão renal aguda (LRA), sendo necessário a adoção de intervenções como a redução da dose do fármaco, ou até mesmo a utilização de outro quimioterápico. Apesar de haver casos em que o paciente consegue recuperar a função renal após um episódio de LRA, os danos causados podem resultar em processo de reparo não eficiente, tornando-o um forte candidato para o desenvolvimento de DRC (DASARI; TCHOUNWOU, 2014; YAO *et al.*, 2007).

Pacientes com LRA apresentam cerca de dez vezes mais chances de desenvolvimento de DRC, e poucos estudos avaliam a epidemiologia e estratégias terapêuticas para prevenir ou retardar a progressão dos mecanismos de lesão específicos da DRC, que se constitui basicamente da perda da função renal pela recuperação tecidual com processo de fibrose após uma inflamação crônica (SHI *et al.*, 2018).

Estudos que visam esclarecer os mecanismos e avaliação de alvos terapêuticos na nefrotoxicidade induzida por cisplatina baseiam-se fortemente na utilização de modelos animais afim de mimetizar as manifestações fisiológicas ocorridas no corpo humano. Logo, a elucidação de modelos de lesão em animais eficientes e com baixa mortalidade é o passo inicial na avaliação do desenvolvimento desses estudos.

Sendo assim, o presente estudo visa padronizar o modelo de desenvolvimento de DRC em camundongos *Swiss* fêmeas. Estudos em animais demonstraram que as fêmeas possuem uma maior susceptibilidade de desenvolverem nefrotoxicidade por cisplatina, devido aos níveis de estrógeno estarem relacionado com o aumento do estresse oxidativo (BARADARAN *et al.*, 2016). A elucidação desse modelo é um fator contribuinte para posteriores estudos de utilização de terapias eficazes no tratamento da DRC induzida por cisplatina.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Padronizar o modelo de DRC induzida por cisplatina em modelo experimental *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar as alterações em parâmetros fisiológicos causadas pela cisplatina com o intuito de selecionar a melhor dose capaz de provocar a DRC;
- Analisar as alterações em parâmetros bioquímicos de função renal nos camundongos tratados em comparação com o grupo controle;
- Avaliar o perfil da expressão gênica associada à DRC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aquisição dos Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas, pesando de 25 - 30 gramas, provenientes do biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura entre $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro escuro (12/12h), com acesso livre a água e alimento.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), sob o número de protocolo 9544230921.

4.2 Compostos e substâncias

A cisplatina foi adquirida através de doação pelo Hospital Universitário. Os demais produtos químicos e outras drogas aqui mencionadas foram adquiridas das empresas Sigma-Aldrich® EUA, Vetec® Brasil, Labtest® Brasil, Bioclin® Brasil e Venco® Brasil.

4.3 Grupos Experimentais

Os animais receberam administração de cisplatina via intraperitoneal (IP) uma vez por semana, durante quatro semanas. O modelo escolhido foi baseado levando em consideração modelos de lesão por DRC apresentados na literatura (SHARP *et al.*, 2016; KATAGARI *et al.*, 2016).

Os animais foram selecionados levando em consideração o critério peso, dando prioridade aos animais de maior peso para grupos expostos a maiores doses de CIS, para conferir resistência e assegurar a sobrevivência dos animais. Os grupos são apresentados a seguir:

- Grupo Controle: Os animais $n = 8$ receberam 200 μl de solução salina 0,9% via IP, uma vez por semana, durante quatro semanas consecutivas.

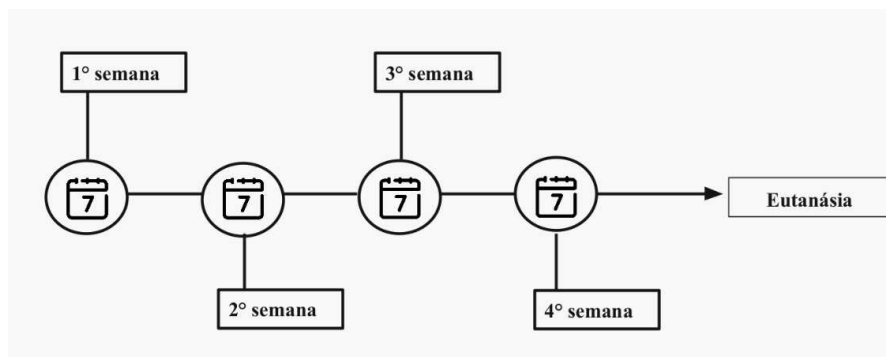
- Grupos Cisplatina 3 mg/kg: Os animais $n = 10$ receberam cisplatina na dose de 3 mg/kg via IP, uma vez por semana, durante quatro semanas consecutivas.
- Grupos Cisplatina 5 mg/kg: Os animais $n = 10$ receberam cisplatina na dose de 5 mg/kg via IP, uma vez por semana, durante quatro semanas consecutivas.
- Grupos Cisplatina 8 mg/kg: Os animais $n = 10$ receberam cisplatina na dose de 8 mg/kg via IP, uma vez por semana, durante quatro semanas consecutivas.

4.4 Desenho Experimental

Durante as quatro semanas do período experimental, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, sendo manuseados apenas nos dias de administração, uma vez por semana e em dias de trocas de ambientação relativas a maravalha, água e ração duas vezes na semana.

Na quarta semana os animais foram colocados em gaiolas metabólicas durante três horas diárias, para adaptação ao estresse causado no último dia do período experimental. Nas últimas 24h, os animais ficaram alocados nas gaiolas metabólicas que permitiam a coleta da urina para posterior avaliação do fluxo urinário e avaliação do consumo de água pelos animais. Ao final do último dia, os animais foram anestesiados com xilazina na dose de 10 mg/kg e cetamina 100 mg/kg via IP. O modelo esquemático é ilustrado conforme a **Figura 4**.

Figura 4. Modelo esquemático do protocolo experimental.



Fonte: Elaborada pelo autor.

A coleta de sangue ocorreu por cardiocentese, logo, a eutanásia dos animais ocorreu por hipovolemia. O sangue foi coletado com seringas previamente ambientadas com heparina 10% para evitar a coagulação sanguínea, e armazenado em microtubos. Após a coleta de sangue, foi realizada uma incisão na cavidade abdominal do animal para coleta dos rins, direcionando o rim esquerdo em microtubos estéreis e armazenados em freezer -80°C para as análises moleculares. O rim direito foi armazenado em recipientes contendo formol 10% para análise histológica, resultado que não possível apresentar neste estudo e será apresentado futuramente. As amostras de urina das últimas 24h foram coletadas e mensuradas a partir das gaiolas metabólicas. As amostras de sangue e urina foram centrifugadas a 4500 rpm, separado o sobrenadante e armazenados em microtubos em freezer -80°C para análises bioquímicas.

4.5 Avaliação dos Parâmetros Fisiológicos

Os parâmetros fisiológicos também são importantes indicadores para observação dos efeitos advindos do estabelecimento de uma lesão renal. Os parâmetros observados são a perda de massa corpórea, peso renal, consumo de água e fluxo urinário.

4.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Foram realizadas dosagens de ureia e creatinina nas amostras de plasma de todos os grupos. Os kits utilizados foram Ureia UV Liquiform e Creatinina-K, advindos da fabricante Labtest®. As amostras de urina foram utilizadas para determinação da proteinúria e creatinina urinária, utilizando os kits SensiProt e Creatinina-K. Os testes foram realizados de acordo com as orientações dos fabricantes e resultados expressos em mg/dl. Os resultados foram normalizados pelo peso corporal dos animais.

4.6.1 Avaliação da Função Renal: Clearance de Creatinina

A determinação da creatinina plasmática e urinária foi feita através do método de Jaffé modificado, que consiste na reação da creatinina com o ácido

pícrico, gerando um composto de coloração determinado por espectrofotometria (BOTTINI *et al.*, 2005). Após a determinação da creatinina urinária e plasmática, foi possível estimar a TFG através do clearance de creatinina (ml/min/kg) de acordo com Yamabe *et al.* (2007) pela seguinte fórmula:

$$CICr = [CrU \times VU/CrP] \times [1000/Peso] \times [1/1440]$$

Sendo:

CICr: Clearance de Creatinina (ml/min/kg)

CrU: Creatinina Urinária (mg/dl)

VU: Volume Urinário (ml)

CrP: Creatinina Plasmática (mg/dl)

Peso: Peso do animal em gramas.

4.6.2 Avaliação do Dano Tubular: Gama-GT urinária

O dano tubular foi avaliado através da determinação da atividade da enzima Gama Glutamil Transferase na urina dos animais. Foi utilizado o kit comercial Gama GT Liquiform da fabricante Labtest®. Foram seguidas as recomendações do fabricante em relação aos protocolos, e os resultados foram expressos em U/mg de creatinina. Estudos anteriores indicam que essa relação permite retirar a interferência do fluxo urinário, ocasionando o erro na leitura da atividade da enzima (CARVALHO *et al.*, 2014). Os resultados foram normalizados pelo peso corporal dos animais.

4.7 Análise da expressão gênica

4.7.1 Extração de RNA

Para análise da expressão gênica de marcadores relacionados a DRC, foi utilizado o tecido renal previamente armazenado em freezer -80°C. Um homogenato composto pelo tecido renal e solução de trizol (Sigma Aldrich® Brasil) foram macerados com o auxílio de esferas metálicas estéreis e o aparelho TissueLyzer LT® (Qiagen EUA). A suspensão resultante foi centrifugada a 4 °C por 15 minutos na velocidade de 12000 x g. Após a centrifugação foi coletado o sobrenadante e, a este

adicionado 200µl da solução de clorofórmio P.A. (Vetec®, Brasil). Após a centrifugação, o sobrenadante transparente contendo o RNA foi coletado e adicionado a um novo microtubo, sendo a ele adicionado 500µ de isopropanol, seguido de vortexação e centrifugação a 4°C, na velocidade de 12000 x g por 20 minutos. O precipitado advindo da centrifugação se trata do RNA. Em seguida, esse precipitado passará por sucessivas lavagens com 1 ml de álcool etílico 75%, vortexado por 15 segundos e centrifugado em temperatura de 4 °C na velocidade de 7500 x g por cinco minutos. Após a finalização do processo de extração, 1 µl de RNA total de cada amostra foi dosado pelo Nanodrop® (Thermo Fisher Scientific, EUA) e no Fluorímetro Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA) afim de verificar a qualidade das amostras e ajustá-las a uma concentração que permita a transcrição reversa do RNA à DNA complementar (cDNA).

4.7.2 Síntese de cDNA

O RNA total isolado foi utilizado para síntese de cDNA por meio do GoScript cDNA Synthesis Kit (PROMEGA®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O protocolo da reação incluiu 2,0 µl da enzima Transcriptase Reversa, 4µl de GoScript Reaction Buffer, 1000ng de RNA extraído das amostras e água livre de nucleotídeos totais até atingir o volume final de 20µl. O protocolo do termociclador Veriti Applied Biosystems® (Thermo Fisher Scientific, EUA) segue o processo de 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20 °C para posterior etapa de amplificação por qPCR.

4.7.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Foram utilizados primers específicos para dois genes de referência: cadeia 18S do DNA ribossomal e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), e os genes investigados colágeno tipo I alfa-2 (Col1A2), molécula de injúria renal-1 (KIM-1), endotelina-1 e fator de necrose tumoral-α (TNF-α). A **Tabela 2** mostra as sequências de primers utilizados retirados da National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabela 2. Sequência de primers utilizados para qPCR.

Genes	Sequência de Iniciadores		Nº de pares de bases
	Senso 5' - 3'	Senso 3' - 5'	
18S	CGGACAGGATTGACAGATTG	CAAATCGCTCCACCAACTAA	83
GAPDH	TGGCCTTCCGTGTTCTCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA	178
KIM-1	TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT	TCAGCTCGGGAATGCACAA	67
Endotelina 1	GCCACAGACCAGGCAGTTAG	CGAAAAGATGCCTTGATGCTATT	239
Col1A2	CCCCGGGACTCCTGGACTT	GCTCCGACACGCCCTCTCTC	180
TNF- α	GCCGATGGGTTGTACCTTGT	CGGCAGAGAGGAGGTTGACT	133

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Para a reação foram utilizados 7,5 μ L de GoTaq® qPCRMaster Mix (PROMEGA, EUA), 2,4 μ L de primers senso e anti-senso (0,8 nM) e 1,0 μ L de cDNA (50 ng/ μ L) das amostras, completando com água livre de nuclease até um volume final de 15 μ L. Os ciclos de amplificação foram precedidos dos passos da desnaturação a 95°C por dois minutos, seguidos de 45 ciclos compreendidos dos passos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por um minuto, utilizando Applied Biosystem QuantStudio™3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, EUA). A curva de melting foi realizada para avaliar a especificidade dos primers. Os valores do ciclo quantitativo (Cq ou Ct) para os genes testados foram exportados para o Microsoft Excel (Microsoft®, Estados Unidos) e direcionados para análise estatística.

4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism®, versão 6.0. Para o primeiro bloco experimental foi realizado estatística descritiva (média $\pm$ erro padrão) seguido de teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para análises que se confirmou a normalidade dos grupos amostrais, seguiu-se para o teste de comparações múltiplas por meio da análise de variância (One way ANOVA) e pós-teste de Dunett. Para análises em que os grupos amostrais não confirmaram normalidade, seguiu-se para o teste de Kruskal Wallis e pós-teste de Dunn. As análises moleculares foram realizadas por meio do teste de Mann Whitney utilizando

os valores de mediana (min-máx). Os resultados são considerados estatisticamente significativos para $p < 0,05$.

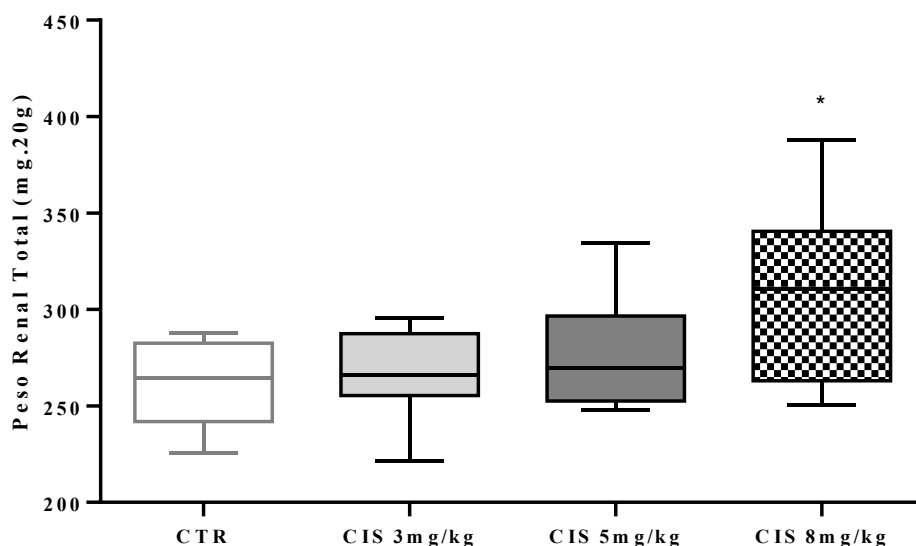
5 RESULTADOS

Os resultados a seguir apresentam os dados encontrados e justificam a escolha futura da dose de cisplatina que melhor desenvolva uma lesão renal com indícios de cronicidade e, assim, ser utilizado em pesquisas posteriores envolvendo tratamento com substâncias naturais.

5.1 Avaliação dos parâmetros fisiológicos

A **Figura 5** apresenta os valores de peso renal mensurados após o período de lesão renal por cisplatina nas doses analisadas. O grupo CIS 8 mg/kg ($308,50 \pm 19,80$ mg) aumentou significativamente o peso renal quando comparado aos valores do grupo controle ($262,20 \pm 7,99$ mg). Não foram observadas diferenças significativas no peso renal dos grupos CIS 3 mg/kg ($267,70 \pm 7,62$ mg) e CIS 5 mg/kg ($275,70 \pm 10,51$ mg) em relação ao grupo controle. Os rins direito e esquerdo foram pesados juntos e os resultados expressos em mg.

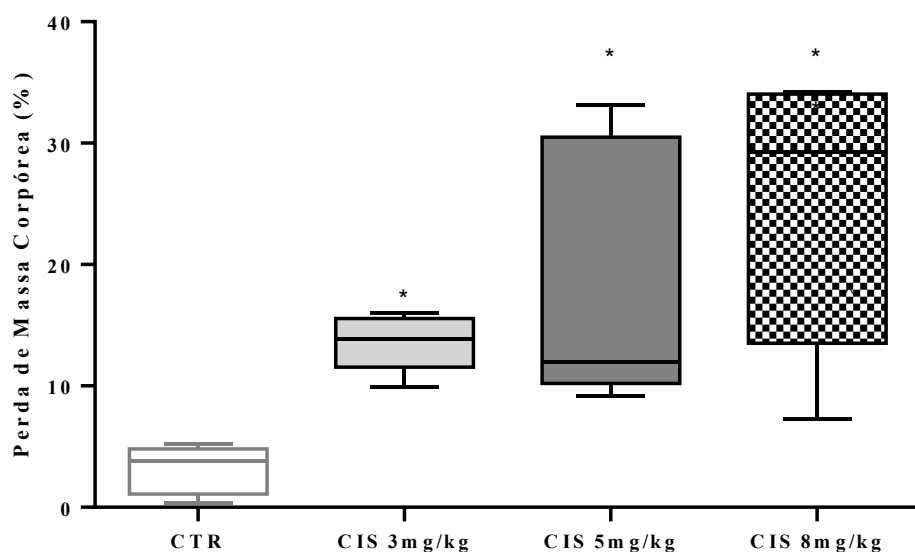
Figura 5 — Avaliação do peso renal.



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão no peso renal após lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste de Dunn.

A **Figura 6** apresenta a perda de massa corpórea ponderal dos animais após o período de lesão renal por cisplatina nas doses analisadas. Foram observadas diferenças significativas dos grupos CIS 3 mg/kg ($13,53 \pm 0,95\%$), CIS 5 mg/kg ($17,19 \pm 3,83\%$) e CIS 8 mg/kg ($24,93 \pm 4,49\%$) em relação ao grupo controle ($3,05 \pm 0,71\%$).

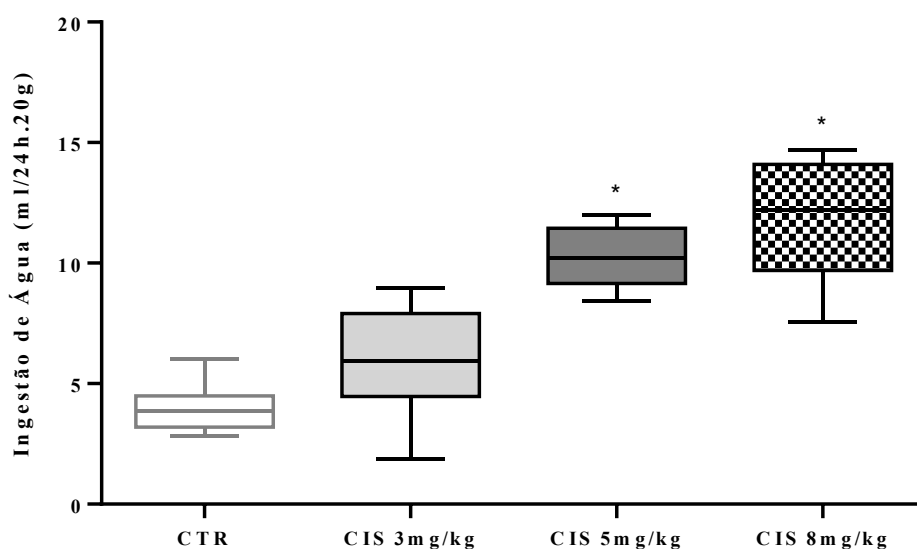
Figura 6 — Comparação da perda de massa corpórea.



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão na perda de massa corpórea após lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste de Dunett.

A **Figura 7** apresenta os volumes de água ingerida (presente nos frascos de água das gaiolas metabólicas) pelos animais durante as últimas 24h de lesão renal induzida por cisplatina nas doses selecionadas. Não foi observada diferença significativa no volume de água ingerida do grupo CIS 3 mg/kg ($5,94 \pm 0,84$ ml) em relação ao grupo controle ($4,02 \pm 0,39$ ml). No entanto, houve aumento significativo do volume de água ingerida pelos animais lesionados dos grupos CIS 5 mg/kg ($10,23 \pm 0,43$ ml) e 8 mg/kg ($11,96 \pm 1,21$ ml) relacionados ao grupo controle.

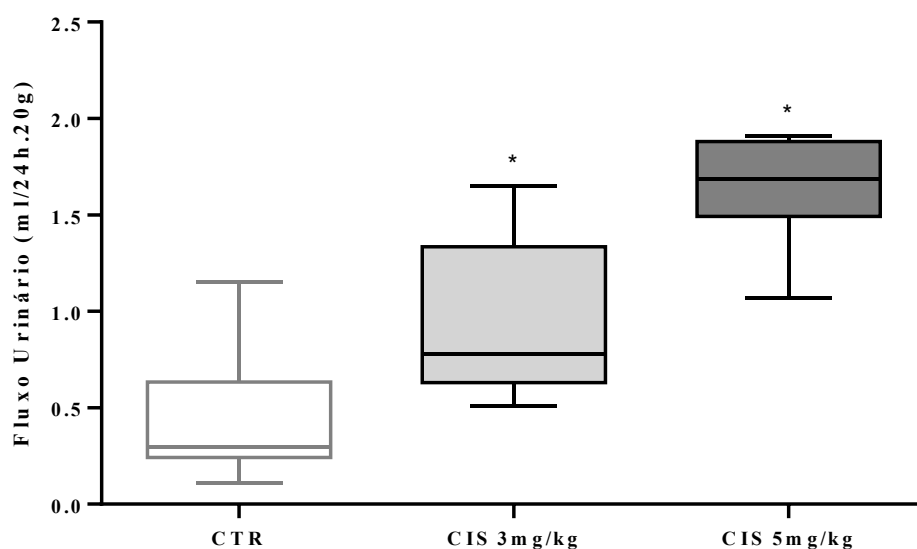
Figura 7 — Avaliação do consumo de água.



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão do consumo de água no modelo de lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste de Dunett.

A **Figura 8** apresenta os volumes de urina excretada, presente nos tubos coletores das gaiolas metabólicas durante as últimas 24h de lesão renal induzida por cisplatina nas doses selecionadas. Foram observadas diferenças significativas no volume de urina excretado dos grupos CIS 3 mg/kg ($0,93 \pm 0,14$ ml) e CIS 5 mg/kg ($1,63 \pm 0,10$ ml) em relação ao grupo controle ($0,43 \pm 0,11$ ml). Os animais do grupo CIS 8 mg/kg apresentaram excreção de urina insuficiente para realização de análise estatística.

Figura 8 — Avaliação do fluxo urinário.

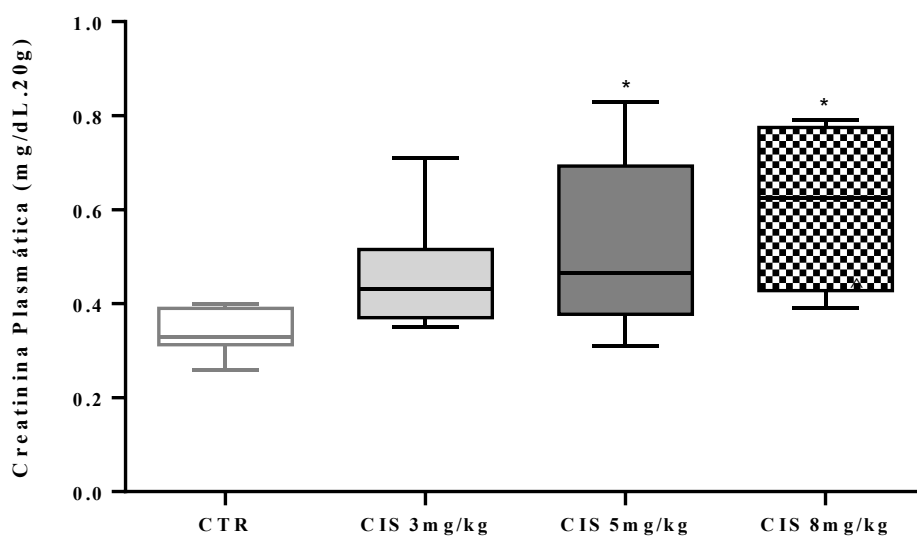


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão do fluxo urinário no modelo de lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste de Dunett.

5.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

A **Figura 9** apresenta as concentrações de creatinina plasmática após as doses aplicadas. Não foi observada diferença significativa para a creatinina plasmática no grupo CIS 3 mg/kg ($0,46 \pm 0,03$ mg/dL) em relação ao grupo controle ($0,34 \pm 0,01$ mg/dL). Entretanto, houve aumento significativo nas concentrações de creatinina plasmática dos grupos CIS 5 mg/kg ($0,51 \pm 0,06$ mg/dL) e CIS 8 mg/kg ($0,60 \pm 0,07$ mg/dL) quando comparados ao controle.

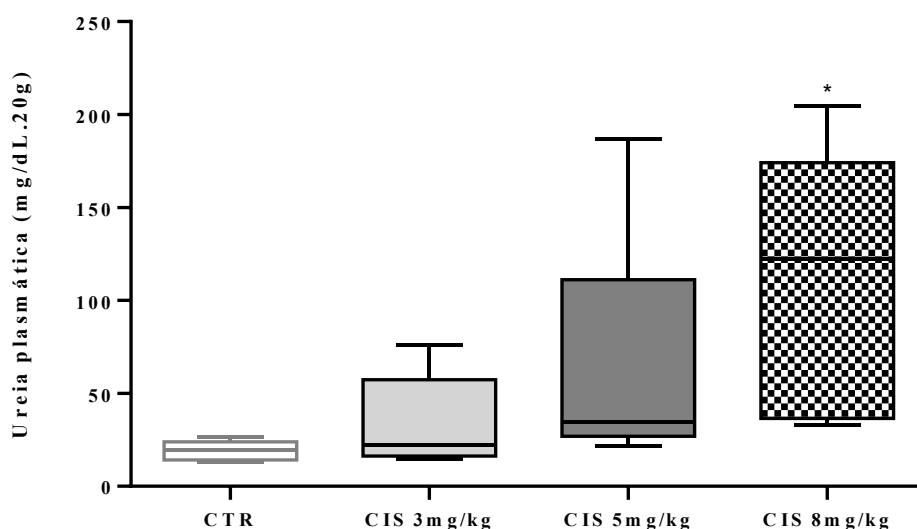
Figura 9 — Análise dos níveis plasmáticos de creatinina.



Os valores representam a média $\pm$ erro padrão dos níveis plasmáticos de creatinina no modelo de lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste de Dunett.

A **Figura 10** apresenta as concentrações de ureia plasmática após o período de lesão renal induzido por cisplatina. Não foram observadas diferenças significativas para a ureia plasmática entre os grupos CIS 3 mg/kg ($34,79 \pm 7,95$ mg/dL) e 5 mg/kg ($63,31 \pm 22,02$ mg/dL) em relação ao grupo controle ($19,47 \pm 1,75$ mg/dL). Porém, houve aumento significativo nos valores do grupo CIS 8 mg/kg ($113,90 \pm 28,58$ mg/dL) quando comparados ao controle.

Figura 10 — Análise dos níveis plasmáticos de ureia.

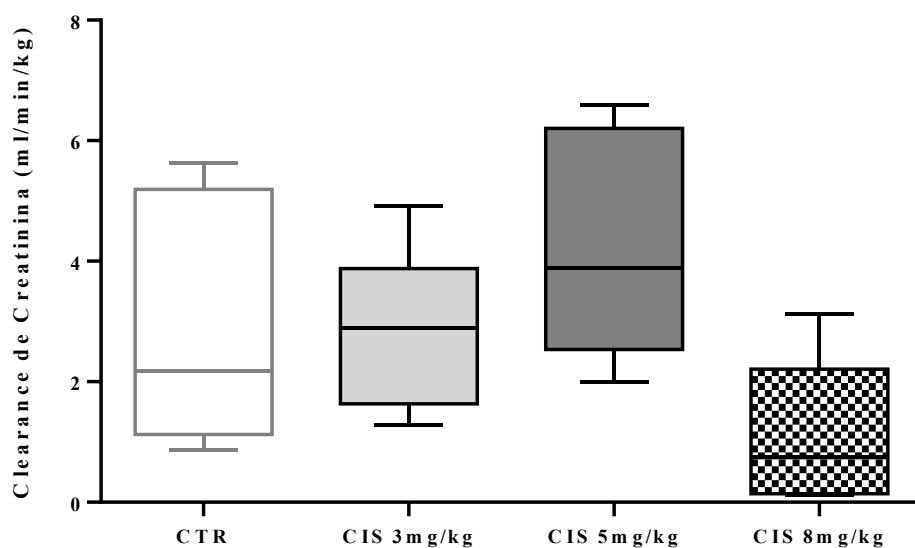


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão dos níveis plasmáticos de creatinina no modelo de lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste 1wayANOVA seguido por pós-teste de Dunett.

5.3 Avaliação da função renal

A taxa de filtração glomerular foi analisada por meio do *clearance* de creatinina. Como podemos notar na **Figura 11**, não houve diferença significativa dos grupos CIS 3 mg/kg ($2,86 \pm 0,45$ ml/min/kg), CIS 5 mg/kg ($4,17 \pm 0,64$ ml/min/kg) e CIS 8 mg/kg ($1,08 \pm 0,55$ ml/min/kg) quando comparados ao grupo controle ($2,86 \pm 0,69$ ml/min/kg). Alguns animais do grupo CIS 8 mg/kg não apresentaram excreção de urina nos tubos coletores das gaiolas metabólicas, reduzindo o n amostral desse grupo quanto a uma análise estatística.

Figura 11 — Avaliação da taxa de filtração glomerular.

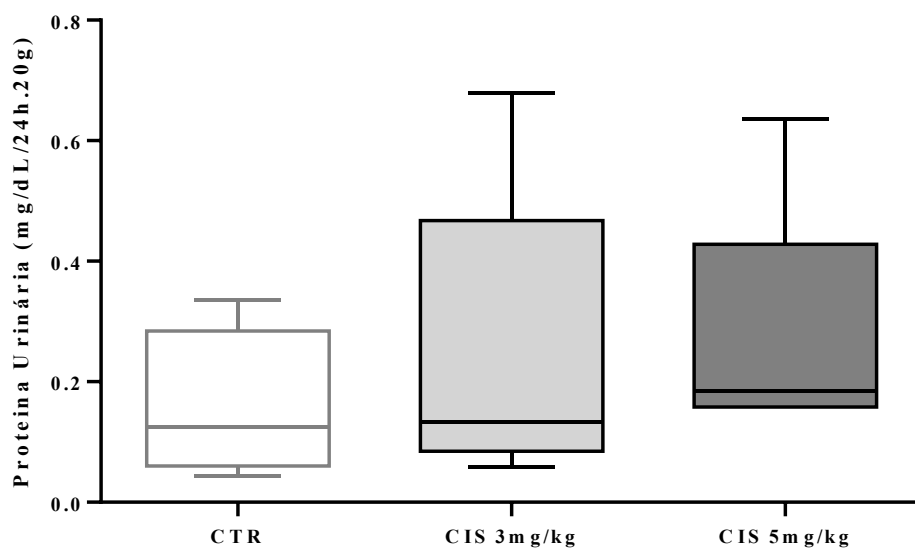


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão do clearance de creatinina no modelo de lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg).

5.4 Avaliação do proteinúria

Avaliamos também as concentrações de proteína urinária. Como podemos observar na **Figura 12**, não houve aumento da excreção de proteína na urina dos animais dos grupos CIS 3 mg/kg ($0,25 \pm 0,08$ mg/dL) e CIS 5 mg/kg ($0,29 \pm 0,06$ mg/dL) quando comparados ao grupo controle ($0,15 \pm 0,04$ mg/dL). Os animais do grupo CIS 8 mg/kg não apresentaram excreção de urina nos tubos coletores das gaiolas metabólicas, não sendo possível dessa forma realizar análise de proteína urinária nesse grupo.

Figura 12 — Avaliação da concentração de proteína urinária.

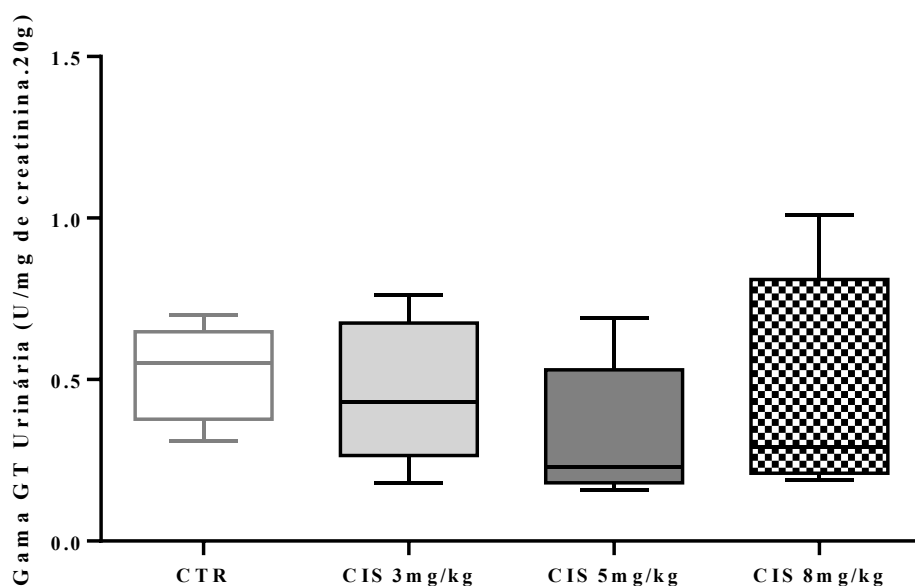


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da concentração de proteína urinária no modelo de lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg).

5.5 Avaliação do dano tubular

O dano tubular foi analisado pela excreção/atividade da enzima gama glutamil transferase (Gama-GT) na urina. Como demonstrado na **Figura 13**, não houve diferença nos valores urinários dos animais dos grupos CIS 3 mg/kg 72h ($0,46 \pm 0,07$ U/mg de creat.), CIS 5 mg/kg ($0,33 \pm 0,07$ U/mg de creat.) e CIS 8 mg/kg ($0,46 \pm 0,15$ U/mg de creat.) quando comparados aos valores do grupo controle ($0,52 \pm 0,05$ U/mg de creat.). Alguns animais do grupo CIS 8 mg/kg não apresentaram excreção de urina nos tubos coletores das gaiolas metabólicas, reduzindo o n amostral desse grupo quanto a uma análise estatística.

Figura 13 — Avaliação da concentração urinária da enzima Gama-GT.

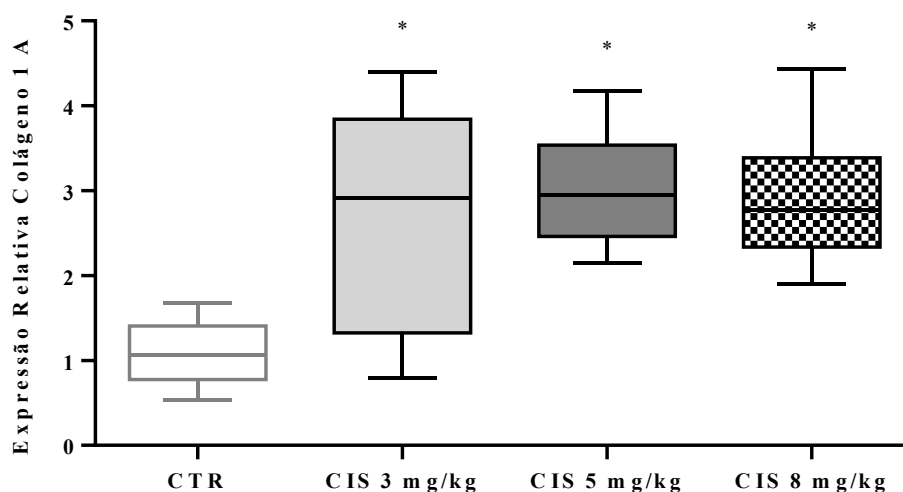


Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da concentração de Gama GT urinária no modelo de lesão renal induzida por cisplatina (3, 5, 8 mg/kg).

5.6 Avaliação da expressão gênica

A avaliação da expressão gênica foi realizada nos genes Colágeno 1 A-2, Endotelina, TNF- α e KIM-1. Os dados a seguir representam os resultados obtidos. A **Figura 14** mostra que a expressão gênica de Colágeno 1 A-2 foi aumentada nos grupos CIS 3 mg/kg (2,91; 0,80-4,40), CIS 5mg/kg (2,95; 2,15-4,17) e CIS 8 mg/kg (2,77; 1,90-4,43) em relação aos animais do grupo controle (1,06; 0,53-1,68).

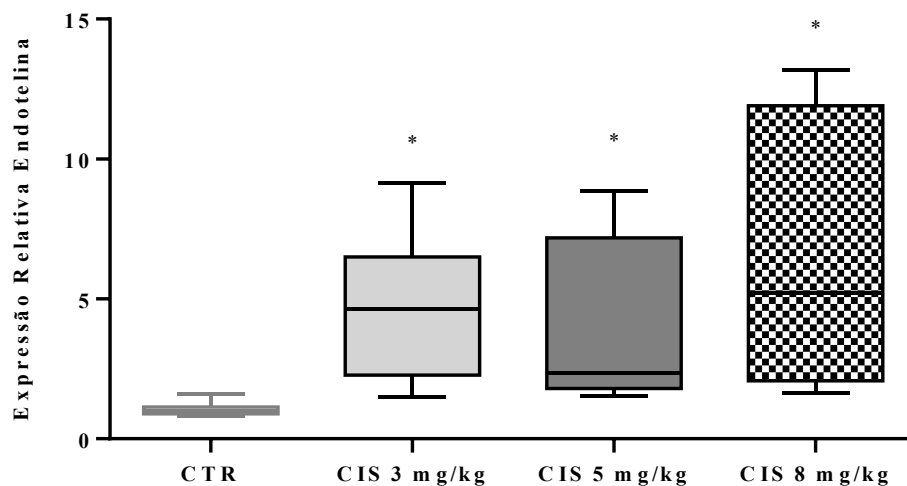
Figura 14 — Avaliação da transcrição gênica de Colágeno 1 A-2.



Os valores representam a transcrição gênica de Col1A2 em camundongos após a indução de lesão renal por cisplatina nas doses 3, 5 e 8 mg/kg. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

A **Figura 15** mostra que a expressão gênica de Endotelina foi aumentada nos grupos CIS 3 mg/kg (4,63; 1,48-9,12), CIS 5mg/kg (2,36; 1,53-8,85) e CIS 8 mg/kg (5,23; 1,64-13,19) em relação aos animais do grupo controle (1,00; 0,80-1,59).

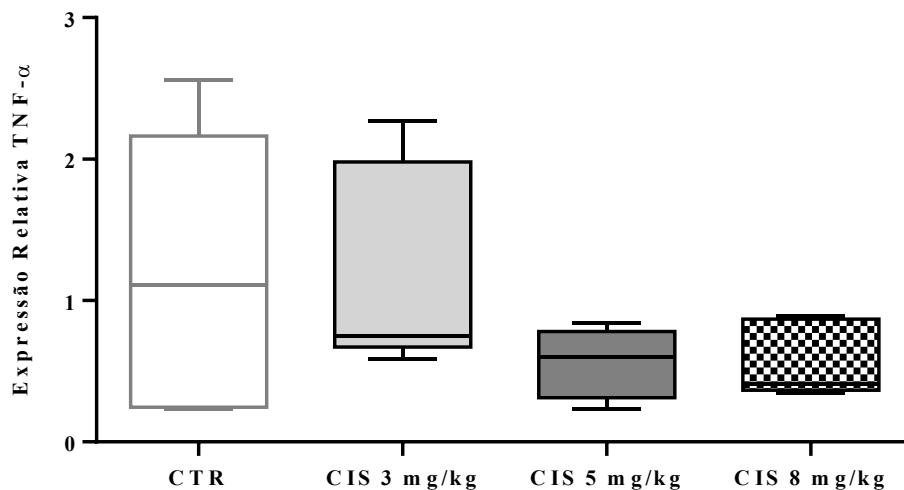
Figura 15 — Avaliação da transcrição gênica de Endotelina.



Os valores representam a transcrição gênica de Endotelina em camundongos após a indução de lesão renal por cisplatina nas doses 3, 5 e 8 mg/kg. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

A **Figura 16** mostra que a expressão gênica de Fator de Necrose Tumoral α não apresentou diferença significativa nos grupos CIS 3 mg/kg (0,75; 0,59-2,27), CIS 5mg/kg (0,60; 0,23-0,84) e CIS 8 mg/kg (0,41; 0,35-0,89) em relação aos animais do grupo controle (1,11; 0,23-2,56).

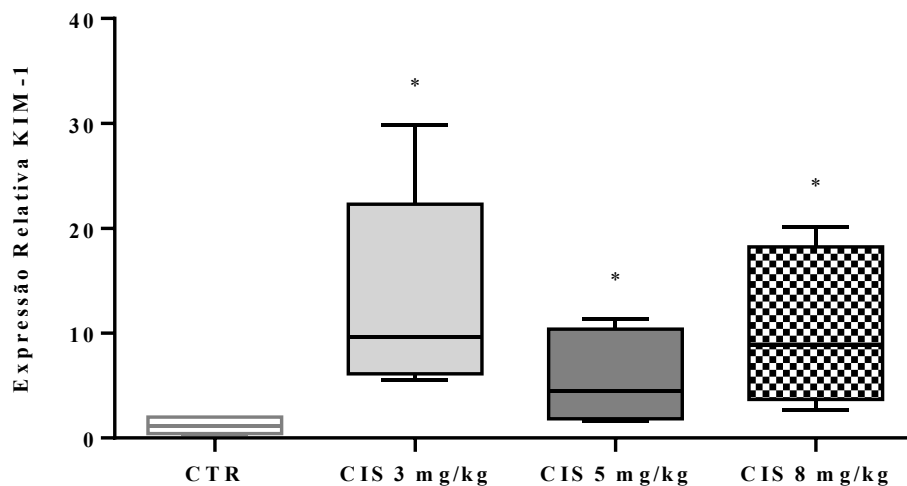
Figura 16 — Avaliação da transcrição gênica de TNF- α .



Os valores representam a transcrição gênica de TNF- α em camundongos após a indução de lesão renal por cisplatina nas doses 3, 5 e 8 mg/kg. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx).

A **Figura 17** mostra que a expressão gênica de KIM-1 apresentou significância estatística nos grupos CIS 3 mg/kg (9,61; 5,57-29,80), CIS 5mg/kg (4,48; 1,58-11,38) e CIS 8 mg/kg (8,83; 2,67-20,10) em relação aos animais do grupo controle (1,09; 0,34-2,00).

Figura 17 — Avaliação da transcrição gênica de KIM-1.



Os valores representam a transcrição gênica de KIM-1 em camundongos após a indução de lesão renal por cisplatina nas doses 3, 5 e 8 mg/kg. Os resultados foram reportados pelas medianas (min-máx). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. A análise foi realizada pelo teste Mann-Whitney.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho buscou a padronização de um modelo de lesão crônica induzido por cisplatina em camundongos. A cisplatina é um fármaco antineoplásico com ação reconhecidamente nefrotóxica, possuindo vários estudos voltados a episódios de LRA e terapias propostas para prevenção e proteção renal. Modelos de LRA induzida por cisplatina em animais baseiam-se na administração de uma única elevada dose (15 mg/kg) de cisplatina (SHARP *et al.*, 2016; SILVA, 2021). Apesar de se constituir um modelo de LRA eficaz, esse regime não reflete com precisão a realidade da terapia clínica, onde os pacientes são expostos a sucessivas doses do fármaco.

Pacientes expostos a episódios de LRA, mesmo com completa recuperação da função renal, apresentam mais chances para desenvolvimento de DRC e FFR, especialmente em grupos mais frágeis, como crianças e idosos (ROMAGNANI *et al.*, 2017). Sendo assim, é necessário a realização de estudos que reflitam os efeitos da administração prolongada da cisplatina e suas implicações na lesão renal a longo prazo. Após levantamento da literatura, foi observado que modelos que refletiam com precisão os parâmetros da DRC se baseavam na administração repetida de doses baixas do fármaco (SHARP *et al.*, 2016; KATAGARI *et al.*, 2016; BUDU *et al.*, 2021). Após esse levantamento, para o presente estudo, foi selecionado um modelo de indução com duração de quatro semanas, uma administração a cada semana, nas doses de 3, 5 e 8 mg/kg.

Foram utilizados camundongos fêmeas pela indicação da literatura de que o esse grupo tem maior propensão para desenvolvimento de injúria renal após administração de cisplatina (KIM *et al.*, 2003; HOLDITCH *et al.*, 2019). Este fenômeno pode estar relacionado com os elevados níveis de estrógeno do sexo feminino, quando comparado ao sexo masculino. Estudos sugerem que o hormônio promove o aumento do estresse oxidativo na lesão por cisplatina por aumento dos níveis de óxido nítrico (BARADARAN *et al.*, 2016).

Dentre os parâmetros fisiológicos apresentados, o peso renal apresentou aumento significativo na dose de 8 mg/kg, seguindo um padrão de aumento gradativo com o aumento da dose. Sabe-se que a lesão por cisplatina culmina na lesão celular por diferentes vias. Como mecanismo compensatório, os néfrons restantes sofrem com uma sobrecarga funcional e são estimulados a um processo

de hipertrofia por indução de fator de crescimento alfa (TGF- α) seus receptores celulares. A intensa resposta inflamatória resulta na secreção de mediadores que estimulam a inflamação e a ocorrência de processo de fibrose, com proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, justificando assim o aumento do peso renal (VIANA *et al.*, 2011; RAMAGNANI *et al.*, 2017).

Todos os animais apresentaram significativa perda de massa corporal quando comparada ao grupo controle durante o período experimental. É importante levar em consideração que vários fatores são responsáveis por essa perda de peso, além da lesão renal em si. Os animais do grupo controle apresentaram baixa perda de massa corporal, sendo atribuída ao estresse ao qual os animais foram expostos durante o período experimental pela manipulação, administrações intraperitoneais e ao final nas gaiolas metabólicas. Os grupos tratados apresentaram uma extensiva perda de peso, pois além de terem sofrido a mesma exposição do grupo controle, tiveram a variável tratamento, sendo assim atribuída às ações da cisplatina esses resultados. A desnutrição na DRC está relacionada ao processo inflamatório que estimulam o catabolismo proteico resultando em um gasto muscular e energético (STENVINKEL *et al.*, 2000).

Foi observado também um aumento relativo ao consumo de água e fluxo urinário aumentado nos animais tratados em relação ao grupo controle. A lesão da cisplatina às células tubulares renais diminuem a reabsorção de sódio nas células tubulares proximais nas fases iniciais de lesão, e de sódio e água no túbulo distal, explicando assim o aumento do fluxo urinário e consequente aumento do consumo de água. Importante notar que o grupo de 8 mg/kg não apresentou um fluxo urinário quantificável, refletindo possivelmente o estado avançado de lesão glomerular e escassa filtração renal (YAO *et al.*, 2007).

Quanto aos parâmetros bioquímicos, a creatinina apresentou elevação nos grupos de 5 e 8 mg/kg, e a ureia no grupo 8 mg/kg. A creatinina é um composto advindo do metabolismo muscular comumente utilizado na prática clínica para avaliação da função renal por ser uma molécula livremente filtrada pelos rins e não passa por processo de reabsorção tubular, logo, sua concentração plasmática é uma ferramenta utilizada para estimar a TGF, e sua elevação sérica é indicativa de comprometimento real. A ureia também é um importante marcador, pelo fato de ser livremente filtrada e também passar por reabsorção tubular, logo seu aumento na

corrente sanguínea também constata uma deficiente filtração glomerular (DALTON, 2011).

A filtração glomerular é um processo que ocorre nos glomérulos, um enovelamento de capilares coberta por três camadas cuja distribuição celular garante a retenção de componentes por peso molecular e carga elétrica, não permitindo a passagem da grande maioria das proteínas que circulam na corrente sanguínea, como a albumina. Logo, a presença elevada de proteínas na urina é um marcador utilizado para verificar a integridade da estrutura dos glomérulos e constata a injúria renal. Substâncias com livre filtração glomerular, como a creatinina, são utilizadas para estimar TFG, e quando elevadas na corrente sanguínea, indicam uma baixa taxa de filtração glomerular. O presente estudo não revelou resultados significados quanto a TFG e proteinúria, trazendo atenção especial a uma problemática de trabalho observado quanto ao grupo 8 mg/kg, que como mencionado anteriormente, foi observado o estado de oligúria, fator condizente com injúria renal, mas que afeta negativamente a estatística de testes que dependem da amostra de urina, como a TFG e a proteinúria (INKER *et al.*, 2014; LEVEY *et al.*, 2012).

A GGT é uma enzima utilizada para avaliação do dano tubular, pois está presente mais intensamente em células que possuem atividades absorptivas ou secretoras, como as células tubulares renais. Sua atividade está relacionada com o metabolismo da glutathione reduzida (GSH), e no caso da injúria renal por cisplatina, atua clivando o conjugado formado entre GSH e cisplatina, resultando na liberação de nefrotoxinas (LIEBERMAN *et al.*, 1995). Logo, sua elevação é indicativa de lesão tubular. Não foram observadas elevações significativas nas amostras de urina nos grupos tratamento. No entanto, o grupo 8 mg/kg apresentou um potencial para aumento quando comparado os valores individuais aos de outros grupos, ressaltando a importância da completude do número de amostras de urina para uma estatística melhorada.

A molécula de injúria renal (KIM-1) é uma proteína transmembrana expressa nas células epiteliais proximais tubulares em condições de injúria renal, sendo considerada um biomarcador para dano tubular, região dos néfrons onde a cisplatina exerce seus principais efeitos tóxicos. Seu papel no desenvolvimento de DRC a partir de LRA vem sendo relacionado visto sua presença estar associada a inflamação e fibrose intersticial. A expressão de KIM-1 se apresentou

significativamente elevada nas três doses testadas, confirmando o presente na literatura a respeito da elevação desse marcador na DRC (HUMPHREYS *et al.*, 2013; RYSZ *et al.*, 2017).

O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é uma importante citocina pró-inflamatória associada ao processo de citotoxicidade da cisplatina, por meio da ativação de processos de apoptose, produção de espécies reativas de oxigênio recrutamento de citocinas e quimiocinas que exacerbam a resposta inflamatória e são responsáveis por estimular fatores fibrinogênicos (YAO *et al.*, 2007). O TNF- α não apresentou resultados estatisticamente relevante em comparação ao grupo controle, mas uma observação a ser ressaltada é o potencial de redução do TNF- α com a elevação dose, podendo ser indicativo que as doses maiores de 5 e 8 mg/kg tenham lesionado a um estado próximo da cronicidade.

Endotelina é um peptídeo com potente ação vasoconstritora, sendo capaz de ser produzido por todas as células renais, mas especialmente pelas células tubulares na injúria renal. Sua atuação na injúria renal se dá através de danos na estrutura dos podócitos, prejudicando a barreira glomerular e ocasionando proteinúria e nefropatia hipertensiva. Também está relacionada ao aumento do estresse oxidativo e interferência no equilíbrio hidroeletrólítico por meio da diminuição da reabsorção de sódio e água (MIGUEL *et al.*, 2017; BUDU *et al.*, 2021). As três doses testadas apresentaram o aumento na expressão do mRNA que codifica a produção da endotelina, constatando o envolvimento desse gene na injúria renal provocada pela cisplatina.

Com o estabelecimento de uma DRC espera-se o aumento na expressão de genes de marcadores específicos para fibrose, como o colágeno tipo I alfa-2, produzido pelos fibroblastos com recuperação tecidual não funcional (VIANNA *et al.*, 2011). A expressão de Col1A2 se mostrou aumentada nas 3 doses testadas, confirmando assim que o protocolo experimental consegue estimular fatores relacionados à cronicidade, como a fibrose renal.

A seguir, na **Tabela 3** são demonstrados a síntese dos resultados obtidos, demonstrando em quais parâmetros foi possível observar alterações significativas para cada dose avaliada.

Tabela 3. Síntese dos resultados obtidos.

Parâmetros	CIS 3 mg/kg	CIS 5 mg/kg	CIS 8 mg/kg
Peso Renal	—	—	↑
Perda de Massa Corporal	↑	↑	↑
Consumo de Água	—	↑	↑
Fluxo Urinário	↑	↑	—
Creatinina	—	↑	↑
Ureia	—	—	↑
<i>Clearance</i> de Creatinina	—	—	—
Proteína Urinária	—	—	—
GGT	—	—	—
Col1A2	↑	↑	↑
Endotelina	↑	↑	↑
TNF- α	—	—	—
KIM-1	↑	↑	↑

Fonte: Elaborado pelo próprio autor. ↑ = Aumento significativo em relação ao grupo controle. — = Não foi observado diferença significativa.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos conclui-se que o modelo proposto de quatro semanas de indução de lesão com cisplatina consegue estimular satisfatoriamente a indução de marcadores importantes na DRC. No entanto, ainda não é possível apenas com esses dados definir a melhor dose para padronização do modelo de DRC cisplatina, dado a ausência de significância em marcadores importantes como TFG e proteinúria.

Isso pode ter se dado por um período de indução insuficiente, onde a lesão ainda esteja em transição entre a LRA para DRC, sendo necessário um período de indução de lesão maior para resultados mais esclarecedores.

Observa-se que a dose de 3 mg/kg consegue satisfatoriamente, nos parâmetros analisados, estimular a produção de marcadores de lesão renal, até mesmo os específicos para fibrose, como o Col1A2. Além disso, a escolha da dose também deve levar em consideração a sobrevivência dos animais, dado que a dose de 8 mg/kg levou os camundongos a uma maior quantidade de óbitos. Logo, sugere-se a partir desse projeto, um maior período de indução utilizando as menores doses testadas.

REFERÊNCIAS

- AMMIRATI, Adriano Luiz. Chronic kidney disease. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 66, p. s03-s09, 2020.
- BARADARAN, Azar et al. Cisplatin; nephrotoxicity and beyond. **Annals of Research in Antioxidants**, v. 1, n. 2, 2016.
- BASTOS, Marcus Gomes; BREGMAN, Rachel; KIRSZTAJN, Gianna Mastroianni. Doença renal crônica: frequente e grave, mas também prevenível e tratável. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, p. 248-253, 2010.
- BOTTINI, Paula Virgínia et al. Utilização da relação albumina/creatinina no diagnóstico de microalbuminúria. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 99-103, 2005.
- BUDU, A. et al. Renal fibrosis due to multiple cisplatin treatment is exacerbated by kinin B1 receptor antagonism. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, 2021.
- CARVALHO, José Antonio Mainardi de et al. **Investigação laboratorial da nefropatia diabética: avaliação de marcadores tubulares e do impacto da correção pela creatinina urinária**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- CORESH, Josef et al. Decline in estimated glomerular filtration rate and subsequent risk of end-stage renal disease and mortality. **Jama**, v. 311, n. 24, p. 2518-2531, 2014.
- DALTON, R. Neil. Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, p. 08-11, 2011.
- DASARI, Shaloam; TCHOUNWOU, Paul Bernard. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **European journal of pharmacology**, v. 740, p. 364-378, 2014.
- SILVA, Dayara de Oliveira. Análise do papel protetor do complexo [6]-gingerol- β -ciclodextrina frente à nefrotoxicidade induzida por cisplatina. 2021.
- DHONDUP, Tsering; QIAN, Qi. Electrolyte and acid-base disorders in chronic kidney disease and end-stage kidney failure. **Blood purification**, v. 43, n. 1-3, p. 179-188, 2017.
- DUNN, M_J; SCHARSCHMIDT, L.; ZAMBRASKI, E. Mechanisms of the nephrotoxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: **Disease, Metabolism and Reproduction in the Toxic Response to Drugs and Other Chemicals**. Springer, Berlin, Heidelberg, 1984. p. 328-337.

GHOSH, Sumit. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic chemistry**, v. 88, p. 102925, 2019.

INKER, Lesley A. et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 63, n. 5, p. 713-735, 2014.

HOLDITCH, Sara J. et al. Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 12, p. 3011, 2019.

HU, Wei; KAVANAGH, John J. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. **The lancet oncology**, v. 4, n. 12, p. 721-729, 2003.

KATAGIRI, Daisuke et al. Interstitial renal fibrosis due to multiple cisplatin treatments is ameliorated by semicarbazide-sensitive amine oxidase inhibition. **Kidney international**, v. 89, n. 2, p. 374-385, 2016.

KIM, Yong Keun et al. Beneficial effect of pentoxifylline on cisplatin-induced acute renal failure in rabbits. **Renal failure**, v. 25, n. 6, p. 909-922, 2003.

KISS, Robert Csaba; XIA, Fen; ACKLIN, Scarlett. Targeting DNA damage response and repair to enhance therapeutic index in cisplatin-based cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 15, p. 8199, 2021.

LEVEY, Andrew S.; CORESH, Josef. Chronic kidney disease. **The lancet**, v. 379, n. 9811, p. 165-180, 2012.

LIEBERMAN, Michael W. et al. gamma-Glutamyl transpeptidase. What does the organization and expression of a multipromoter gene tell us about its functions. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 5, p. 1175, 1995.

MODY, Hardik et al. A Review on Drug-Induced Nephrotoxicity: Pathophysiological Mechanisms, Drug Classes, Clinical Management, and Recent Advances in Mathematical Modeling and Simulation Approaches. **Clinical Pharmacology in Drug Development**, v. 9, n. 8, p. 896-909, 2020.

MORAIS, Beatriz Arruda; RODRIGUES, Gabrielly Mesquita; SANTOS, Walquiria Lene. Complicações renais ocasionadas por hiperglicemia em pacientes com diabetes mellitus descompensada. **Revista Brasileira Interdisciplinar de Saúde**, 2022.

NERBASS, Fabiana B. et al. Censo Brasileiro de Diálise 2020. **Brazilian Journal of Nephrology**, 2022.

NEVES, Amanda P.; VARGAS, Maria D. Complexos de platina (II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 3, p. 196-209, 2011.

OLA, Mohammad Shamsul; NAWAZ, Mohd; AHSAN, Haseeb. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 351, n. 1, p. 41-58, 2011.

PABLA, N.; DONG, Zheng. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney international**, v. 73, n. 9, p. 994-1007, 2008.

PERES, Luis Alberto Batista; CUNHA JÚNIOR, Ademar Dantas da. Acute nephrotoxicity of cisplatin: molecular mechanisms. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 35, p. 332-340, 2013.

ROMAGNANI, Paola et al. Chronic kidney disease. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-24, 2017.

SHARP, Cierra N. et al. Repeated administration of low-dose cisplatin in mice induces fibrosis. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 310, n. 6, p. F560-F568, 2016.

SHI, Mingjun et al. Cisplatin nephrotoxicity as a model of chronic kidney disease. **Laboratory Investigation**, v. 98, n. 8, p. 1105-1121, 2018.

STENVINKEL, Peter et al. Are there two types of malnutrition in chronic renal failure? Evidence for relationships between malnutrition, inflammation and atherosclerosis (MIA syndrome). **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 15, n. 7, p. 953-960, 2000.

VIANNA, Heloisa R. et al. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 33, p. 351-364, 2011.

VIEIRA, Itamar et al. Atualização em Nefrologia Clínica: citocinas e osteodistrofia renal. **J Bras Nefrol**, v. 23, n. 4, p. 224-29, 2001.

WHELTON, Andrew. Nephrotoxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: physiologic foundations and clinical implications. **The American journal of medicine**, v. 106, n. 5, p. 13S-24S, 1999.

WILLIS, Simon et al. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. **Journal of cell science**, v. 116, n. 20, p. 4053-4056, 2003.

WILMES, Anja et al. Mechanism of cisplatin proximal tubule toxicity revealed by integrating transcriptomics, proteomics, metabolomics and biokinetics. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 117-127, 2015.

WU, Huizi; HUANG, Jiaguo. Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies. **Current drug metabolism**, v. 19, n. 7, p. 559-567, 2018.

YAMABE, Noriko et al. Beneficial effect of Corni Fructus, a constituent of Hachimi-jio-gan, on advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-

treated diabetic rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 520-526, 2007.

YAO, Xin et al. Cisplatin nephrotoxicity: a review. **The American journal of the medical sciences**, v. 334, n. 2, p. 115-124, 2007.

ANEXO



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA QUITOSANA SULFATADA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA INDUZIDA POR CISPLATINA EM MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO.", protocolada sob o CEUA nº 9544230921 (ID 001990), sob a responsabilidade de **Alexandre Havt Bindá** e equipe; *Mikael Almeida Lima; Thiago Miranda de Freitas; Dayara de Oliveira Silva; Marcus Lins Queiroga; Clarice de Araújo Sales; Byanca Simões da Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 19/10/2021.

We certify that the proposal "THE POTENTIAL NEFROPROTECTIVE EFFECT OF SULFATED CHITOSAN IN AN IN VIVO EXPERIMENTAL MODEL OF CHRONIC KIDNEY DISEASE INDUCED BY CISPLATIN", utilizing 96 Heterogenics mice (96 females), protocol number CEUA 9544230921 (ID 001990), under the responsibility of **Alexandre Havt Bindá** and team; *Mikael Almeida Lima; Thiago Miranda de Freitas; Dayara de Oliveira Silva; Marcus Lins Queiroga; Clarice de Araújo Sales; Byanca Simões da Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 10/19/2021.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [11/2021](#) a [12/2024](#)

Área: [Departamento de Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central da UFC](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [6 a 12 semanas](#)

N: [96](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [10 a 25 g](#)

Local do experimento: Todo o experimento será realizado no Laboratório Pré-clínico do Instituto de Biomedicina - 2ª Andar, localizado no endereço Rua Coronel Nunes de Melo, 1315 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE, sempre em presença do pesquisador responsável. O local está dividido em espaço onde os animais experimentais serão acondicionados (em estantes ventiladas de 2 portas) e sala experimental separada onde serão realizados os procedimentos de eutanásia e extração de material biológico.

Fortaleza, 16 de novembro de 2022

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará