



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Veridiana Pacheco Goulart Martinazzo

**Estudo dos mecanismos de citotoxicidade da cisplatina em células HEK 293 e
avaliação do efeito protetor do composto probucol e seus derivados**

Florianópolis
2023

Veridiana Pacheco Goulart Martinazzo

**Estudo dos mecanismos de citotoxicidade da cisplatina em células HEK 293 e
avaliação do efeito protetor do composto probucol e seus derivados**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dirleise Colle, Dra.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra

Martinazzo, Veridiana

Estudo dos mecanismos de citotoxicidade da cisplatina em células HEK 293 e avaliação do efeito protetor do composto probucol e seus derivados / Veridiana Martinazzo ; orientador, Dirleise Colle, 2023.
56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Cisplatina. 4. Ferroptose. 5. Antioxidante. I. Colle, Dirleise. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Veridiana Pacheco Goulart Martinazzo

**Estudo dos mecanismos de citotoxicidade da cisplatina em células HEK 293 e
avaliação do efeito protetor do composto probucol e seus derivados.**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 24 de fevereiro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Karin Silva Caumo, Dra.

Instituição – UFSC

Prof.(a) Fabiana Ourique da Silva, Dra.

Instituição - UFJF

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmácia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Profa. Dirleise Colle, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2023.

*Dedico este trabalho à minha mãe,
que esteve sempre ao meu lado
durante o caminho até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por sempre iluminar meu caminho para que pudesse chegar até aqui;

À minha mãe, não existem repetições da palavra obrigada suficientes para demonstrar minha gratidão por todo suporte, apoio incondicional e amor com que me acolheu na minha escolha;

Agradeço à minha família por estar ao meu lado e me incentivar nessa jornada;

À minha orientadora Profa. Dirleise Colle, obrigada pela parceria, paciência, todos os seus ensinamentos e por ter aceitado, desde a graduação, me orientar e dividir comigo um pouco do seu conhecimento;

Ao Prof. Marcelo Farina um grande agradecimento pela parceria, por ceder o espaço de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver meu estudo, bem como os reagentes e demais materiais utilizados nessa dissertação;

Às minhas colegas, em especial Aline e Suzana, agradeço pelo conhecimento compartilhado e ajuda na rotina do laboratório;

Agradeço à minha banca de qualificação e defesa por terem aceitado o convite para colaborar com a realização desse sonho;

A todos aqueles que se fizeram de alguma forma presentes durante esse período, muito obrigada, em especial Giulia, Gabriela e Bruno que estiveram mais próximos e me ajudaram com palavras, ações e nos dias mais turbulentos de alguma forma.

Agradeço ao LAMEB por todo o suporte técnico na realização dos ensaios e também pela estrutura cedida;

Ao programa de pós graduação em Farmácia e a todos os professores que passaram na minha jornada de formação, obrigada por participarem da formação da profissional que me tornei.

À UFSC por ser minha casa por todos esses anos, me ensinar a superar adversidades, me acolher e proporcionar um ensino de excelência e gratuito.

RESUMO

A cisplatina é um agente antineoplásico utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Apesar de seus efeitos positivos no tratamento do câncer, a nefrotoxicidade é um fator limitante na terapia com o fármaco. Uma das principais manifestações clínicas induzidas pela cisplatina é a lesão renal aguda (LRA). A LRA é uma condição caracterizada por um rápido declínio na função excretória dos rins, com consequente acúmulo de produtos nitrogenados no sangue. Diferentes mecanismos parecem contribuir para a patogenicidade renal do composto incluindo lesão vascular, inflamação, estresse oxidativo e morte celular. A ferroptose é um tipo de morte celular oxidativa dependente de ferro e vem sendo descrito em várias patologias que incluem doenças renais, cardiovasculares e neurodegenerativas. Em relação à cisplatina, o envolvimento da ferroptose no mecanismo de LRA induzido pelo fármaco ainda não está totalmente elucidado. O entendimento dos mecanismos de toxicidade da cisplatina é fundamental na busca por terapias de proteção. Atualmente não existe terapia efetiva capaz de prevenir ou mitigar o dano renal induzido pela cisplatina. Entretanto, diferentes estudos mostram que o uso de compostos antioxidantes pode representar uma importante opção na prevenção da lesão renal através da redução da produção de espécies reativas (ER). O probucol e seu derivado succinobucol são compostos fenólicos com atividade antioxidante principalmente relacionada a sua capacidade de modular defesas antioxidantes intracelulares e, recentemente, seus derivados RC363 e RC574 apresentaram efeitos protetores em diferentes modelos de ferroptose. Neste sentido, o objetivo geral do estudo é investigar o possível envolvimento da ferroptose no mecanismo de citotoxicidade da cisplatina, bem como, avaliar o efeito protetor do composto probucol e seus derivados em células de rim humano HEK 293. As células foram expostas a concentrações crescentes de cisplatina durante 3, 6, 12 e 24h e foram avaliados parâmetros de viabilidade celular, níveis de tióis não proteicos (NPSH), geração de ER e peroxidação lipídica. O tratamento com cisplatina causou redução na viabilidade celular em 24 horas, além de induzir redução nos níveis de NPSH e aumento na geração de ER após 6 horas de exposição. Para avaliação do efeito protetor do composto probucol e seus derivados, as células foram pré-tratadas durante 24 horas com os compostos e, em seguida, expostas à cisplatina. O tratamento com os compostos não foi capaz de proteger da diminuição da viabilidade celular induzida pela cisplatina. Para avaliar o envolvimento da ferroptose no mecanismo de toxicidade da cisplatina, as células foram pré-tratadas com compostos quelantes de ferro ou com o composto antiferroptótico clássico ferrostatina-1 (Fer-1), seguido pela exposição ao antineoplásico. Nenhum dos tratamentos realizados foi capaz de proteger a redução na viabilidade celular induzida pela cisplatina nas células HEK 293. Em conjunto, os resultados mostram que o estresse oxidativo está relacionado ao mecanismo de toxicidade da cisplatina em células HEK 293 e que o probucol e seus derivados, bem como os quelantes de ferro e a Fer-1 não foram efetivos na proteção da diminuição da viabilidade celular causada pela cisplatina. Por fim, foi identificado que a ferroptose não está envolvida no mecanismo de toxicidade da cisplatina em células HEK 293.

Palavras-chave: Cisplatina; Ferroptose; Células HEK 293; Quelantes de ferro; Probuco; Succinobucol.

ABSTRACT

Cisplatin is an antineoplastic agent used in the treatment of several types of cancer. Despite its positive effects in cancer treatment, nephrotoxicity is a limiting factor in therapy with the drug. One of the main clinical manifestations induced by cisplatin is acute kidney injury (AKI). AKI is a condition characterized by a rapid decline in the excretory function of the kidneys, with consequent accumulation of nitrogenous products in the blood. Different mechanisms appear to contribute to the renal pathogenicity of the compound including vascular injury, inflammation, oxidative stress, and cell death. Ferroptosis is a type of iron-dependent oxidative cell death. Its role has been described in various pathologies that include renal, cardiovascular, and neurodegenerative diseases. In relation to cisplatin, the involvement of ferroptosis in the mechanism of AKI induced by the drug is not yet fully elucidated. Understanding the mechanisms of cisplatin toxicity is fundamental in the search for protective therapies. Currently, there is no effective therapy capable of preventing or mitigating the renal damage induced by cisplatin. However, different studies show that the use of antioxidant compounds may represent an important option in the prevention of kidney injury by reducing the production of reactive species (RE). Probucol and its derivative succinobucol are phenolic compounds with antioxidant activity mainly related to their ability to modulate intracellular antioxidant defenses and, recently, their derivatives RC363 and RC574 showed protective effects in different models of ferroptosis. In this sense, the overall objective of the study is to investigate the possible involvement of ferroptosis in the mechanism of cytotoxicity of cisplatin, as well as, to evaluate the protective effect of the compound probucol and its derivatives in human kidney HEK 293 cells. Cells were exposed to increasing concentrations of cisplatin for 3, 6, 12 and 24h and parameters of cell viability, non-protein thiol levels (NPSH), ER generation and lipid peroxidation were evaluated. Cisplatin treatment caused a reduction in cell viability by 24 h, and induced a reduction in NPSH levels and an increase in ER generation after 6 h of exposure. To evaluate the protective effect of the compound probucol and its derivatives, cells were pretreated for 24 hours with the compounds and then exposed to cisplatin. Treatment with the compounds was not able to protect from the cisplatin-induced decrease in cell viability. To evaluate the involvement of ferroptosis in the mechanism of cisplatin toxicity, cells were pretreated with iron chelating compounds or the classical anti-ferroptotic compound ferrostatin-1 (Fer-1), followed by exposure to the antineoplastic. None of the treatments performed was able to protect the reduction in cell viability induced by cisplatin in HEK 293 cells. Taken together, the results show that oxidative stress is related to the mechanism of cisplatin toxicity in HEK 293 cells and that probucol and its derivatives as well as iron chelators and Fer-1 were not effective in protecting the reduction in cell viability caused by cisplatin. Finally, it was identified that ferroptosis seems not to be involved in the mechanism of cisplatin toxicity in HEK 293 cells.

Keywords: Cisplatin; Ferroptose; HEK 293 cells; Iron chelators; Probucol; Succinobucol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do composto Cisplatina em 2D	17
Figura 2 - Ativação metabólica de conjugados de glutatona a tióis reativos	20
Figura 3 - Eventos fisiopatológicos envolvidos na nefrotoxicidade por cisplatina	21
Figura 4 - Mecanismo de ferroptose	25
Figura 5 - Estrutura do composto probucol e derivados	29
Figura 6 - Toxicidade da cisplatina em células HEK 293	40
Figura 7 - Toxicidade temporal da cisplatina em células HEK 293	41
Figura 8 - Efeitos da cisplatina sobre a geração de ER e concentração de GSH em células HEK 293.	43
Figura 9 - Toxicidade dos compostos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP em células HEK 293	45
Figura 10 - Efeito protetor dos quelantes de ferro frente a toxicidade da cisplatina em células HEK 293	46
Figura 11 - Efeito protetor da Fer-1 frente a toxicidade da cisplatina em células HEK 293	49
Figura 12 - Efeitos do tratamento com o probucol e seus derivados na viabilidade de células HEK 293	50
Figura 13 - Avaliação do efeito protetor do probucol e seus derivados na redução da viabilidade celular induzida por cisplatina	52

LISTA DE ABREVIACOES

3-NP –  cido 3-nitropropionico
BSO – Butionina sulfoximina
DCFH-DA - 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceina diacetato
DRC – Doença renal cr nica
DFCAF – Deferoxamina cafeina
DFO – Deferoxamina
DFP – Deferiprona
DMEM - Dubecco's modified eagle medium
DMSO – Dimetilsulfóxido
DTNB - 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico)
ER – Retículo endoplasmático
ERO – Espécies reativas de oxig nio
FDA – Food and Drug Administration
FER-1 – Ferrostatina 1
GCL – Glutamato cisteina ligase
GGT – Gama glutamil transpeptidase
GPx – Glutaciona peroxidase
GPx1 – Glutaciona peroxidase 1
GPx4 – Glutaciona peroxidase 4
GS – Glutaciona sintetase
GSH – Glutaciona
KYAT1 – Quirunenina aminotransferase 1
LRA – Les o Renal Aguda
MPTP – 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT - brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio
SFB - Soro fetal bovino
SIH – Salicilaldeido isonicotinoil hidrazina
SOD – Superóxido dismutase
TCA –  cido tricoloc tico
TFG – Taxa de filtrao glomerular
TFK – Tampão fosfato de potássio
TH – Tiroxina hidroxilase

SUMÁRIO

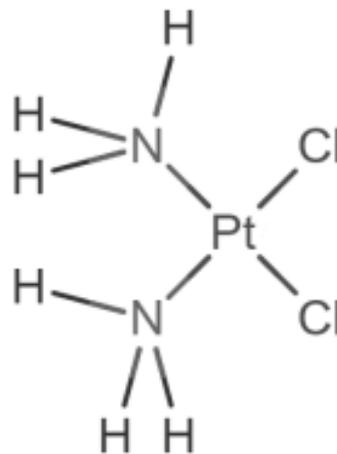
1. INTRODUÇÃO	17
1.1 CISPLATINA	17
1.2 MECANISMOS DE NEFROTOXICIDADE DA CISPLATINA	19
1.3 FERROPTOSE	23
1.4. COMPOSTO PROBUCOL E DERIVADOS	27
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	32
3.1. OBJETIVO GERAL	32
3.1.1 Objetivos específicos	32
4. METODOLOGIA	33
4.1. REAGENTES	33
4.2. CULTIVO CELULAR	33
4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	34
4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	35
4.5. ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE TIÓIS NÃO-PROTÉICOS (NPSH)	36
4.6. ENSAIO DA 2',7'-DICLORO-DI-HIDRO-FLUORESCÉINA DIACETATO (DCFH-DA)	37
4.7. ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS COM A SONDA FLUORESCENTE C11-BODIPY ^{581/591}	37
4.8. ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	38
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 CITOTOXICIDADE DA CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293	40
5.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À CISPLATINA NA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS, NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E NOS NÍVEIS DE GSH EM CÉLULAS HEK 293	42
5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO PROBUCOL E SEUS DERIVADOS FRENTE À CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293	44
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE QUELANTES DE FERRO NA CITOTOXICIDADE DA CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293	48
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ANTIFERROPTÓTICO CLÁSSICO FERROSTATINA-1 NA CITOTOXICIDADE DA CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293	51
6. CONCLUSÃO	54
PERSPECTIVAS	55
REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 CISPLATINA

A cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II)) é um composto antineoplásico de platina, da classe dos agentes alquilantes, e sua atividade foi descoberta em meados de 1960, em um estudo utilizando camundongos com tumor estabelecido (ROSENBERG et al, 1969). Alguns anos depois, a cisplatina foi aprovada pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização no tratamento de câncer de ovário e testículo (HIGBY et al, 1978). A Cisplatina é considerada um dos antineoplásicos mais eficientes usada mundialmente para tratamento de tumores sólidos como pulmão, ovário, cabeça e pescoço, mama e outros. A justificativa dada para sua escolha como tratamento para o câncer se dá pela eficácia já comprovada há décadas (ALDOSSARY, 2020). Sua estrutura química pode ser observada na figura 1.

Figura 1- Estrutura química do composto Cisplatina em 2D.



Fonte: Drugbank <(https://www.drugbank.ca/drugs/DB00515)>

Ao entrar na célula tumoral, através de difusão ativa, a cisplatina sofre reações de hidrólise e forma o composto reativo capaz de interagir com os sítios alvos (KLEIN et al, 2009; SAFAEI et al, 2005). Seu mecanismo de ação se dá através da ligação do composto ao DNA formando adutos que impedem o mecanismo de transcrição e replicação celular, resultando na parada do ciclo celular e morte celular por apoptose (FLOREA et al, 2011). Outros mecanismos também estão envolvidos no efeito

antineoplásico da cisplatina como a interferência na síntese e reparo de DNA, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), disfunção mitocondrial via estresse no retículo endoplasmático rugoso, entre outros (MANOHAR et al, 2018).

Apesar de demonstrar vários efeitos positivos sendo utilizada há mais de quarenta anos no tratamento do câncer, seu uso na clínica demonstrou limitação devido a seus potenciais efeitos colaterais. A partir de alguns estudos, foi possível verificar que há um grande potencial de desencadeamento de neurotoxicidade, ototoxicidade e nefrotoxicidade após uma única dose do composto. Dentre estes, a nefrotoxicidade tem se mostrado como principal fator limitante na terapia com cisplatina (SANTOS et al, 2012).

A maior parte da cisplatina tem sua excreção através dos rins, sendo que sua excreção biliar e intestinal é mínima, o que torna sua concentração no córtex renal cinco vezes maior que a concentração plasmática, o que explica a facilidade de desencadeamento de nefrotoxicidade (SANTOS et al, 2012). Atualmente não existe um método padronizado para detecção precoce da nefrotoxicidade induzida por cisplatina (KELLAND, 2007), então, a disfunção renal é identificada através do aumento da creatinina e ureia séricas (AKCAY et al, 2010).

Uma das principais manifestações clínicas da cisplatina é a lesão renal aguda (LRA) (MANOHAR et al, 2018). A LRA, é uma síndrome caracterizada por um rápido declínio na função excretora dos rins, ou seja, na taxa de filtração glomerular (TFG) com consequente acúmulo de produtos nitrogenados no sangue como ureia e creatinina (BELLOMO et al., 2012). O tratamento com cisplatina parece causar LRA em 20-30% dos pacientes e, clinicamente, pode ser caracterizada por uma redução na função renal que se manifesta como um aumento da creatinina sérica ($\geq 0,3$ mg/dL) ou uma diminuição de $0,5$ mL/kg/h na excreção de urina (HOLDITCH et al, 2019).

Além da LRA, outras formas de manifestação de toxicidade renal incluem hipomagnesemia, síndrome de Fanconi, acidose tubular, defeitos no processo de concentração renal, microangiopatia trombótica, dentre outras complicações (MANOHAR et al, 2018). A exposição contínua e prolongada ao fármaco pode levar à uma cronicidade da lesão renal e ao desenvolvimento de outras nefropatias (HAN et al, 2009). Diante disso, algumas medidas são adotadas para minimizar os efeitos tóxicos da cisplatina como, por exemplo, o aumento da hidratação dos pacientes em conjunto com a administração de manitol, que favorece a diurese e a excreção do fármaco, reduzindo a exposição renal (PERES e CUNHA, 2013). Diretrizes europeias

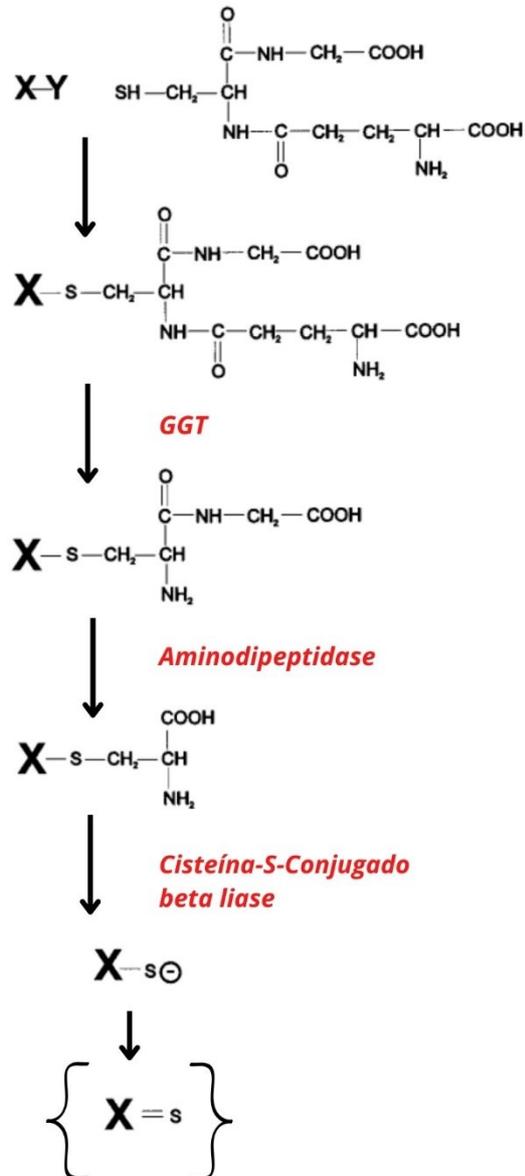
recomendam também o ajuste da dose de cisplatina conforme a função renal do paciente e administração de agentes que previnam a nefrotoxicidade (LAUNAY-VACHER et al., 2008). Entretanto, mesmo com estas medidas, o comprometimento renal ocorre de maneira frequente.

A cisplatina regula direta e indiretamente a função mitocondrial visto que, uma vez dentro da célula, a sua molécula é hidrolisada em outra carregada positivamente que interrompe diretamente a ação dos complexos mitocondriais o que leva ao um aumento na produção das espécies reativas (ER) (MILLER et al, 2010). Esse acúmulo de ER devido à disfunção mitocondrial causado pelo estresse oxidativo é uma característica da LRA induzida por cisplatina (MAPUSKAR et al, 2019). Estudos demonstram que melhorar a dinâmica mitocondrial, aumentando a disponibilidade de antioxidantes endógenos, pode representar um excelente meio de proteção aos efeitos da cisplatina sobre os rins (TANG, 2018).

1.2 MECANISMOS DE NEFROTOXICIDADE DA CISPLATINA

Os mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina têm sido extensivamente estudados nos últimos anos (OZKOK et al, 2014; VOLAREVIC et al, 2019; MANOHAR et al, 2018). A cisplatina possui afinidade com o transportador OCT2 (também conhecido como SLC22A2), o que favorece sua entrada nas células tubulares renais, uma vez que essas células expressam altas concentrações desse receptor. Após sua entrada no interior das células renais, a cisplatina sofre uma série de reações metabólicas, gerando um composto mais tóxico. Neste processo, primeiramente, são formados conjugados com o antioxidante glutathiona (GSH) (glutathiona-S-platina), através da enzima glutathiona-S-transferase. Esses conjugados glutathiona-S-platina são posteriormente clivados, pela ação da gama-glutamil transpeptidase (GGT), em conjugados de cisteinil-glicina, que, por sua vez, são convertidos em conjugados de cisteína pela ação de aminopeptidases e, finalmente, metabolizados a tióis altamente reativos e nefrotóxicos pela quinurenina aminotransferase-1 (TOWNSEND et al., 2003) (Figura 2).

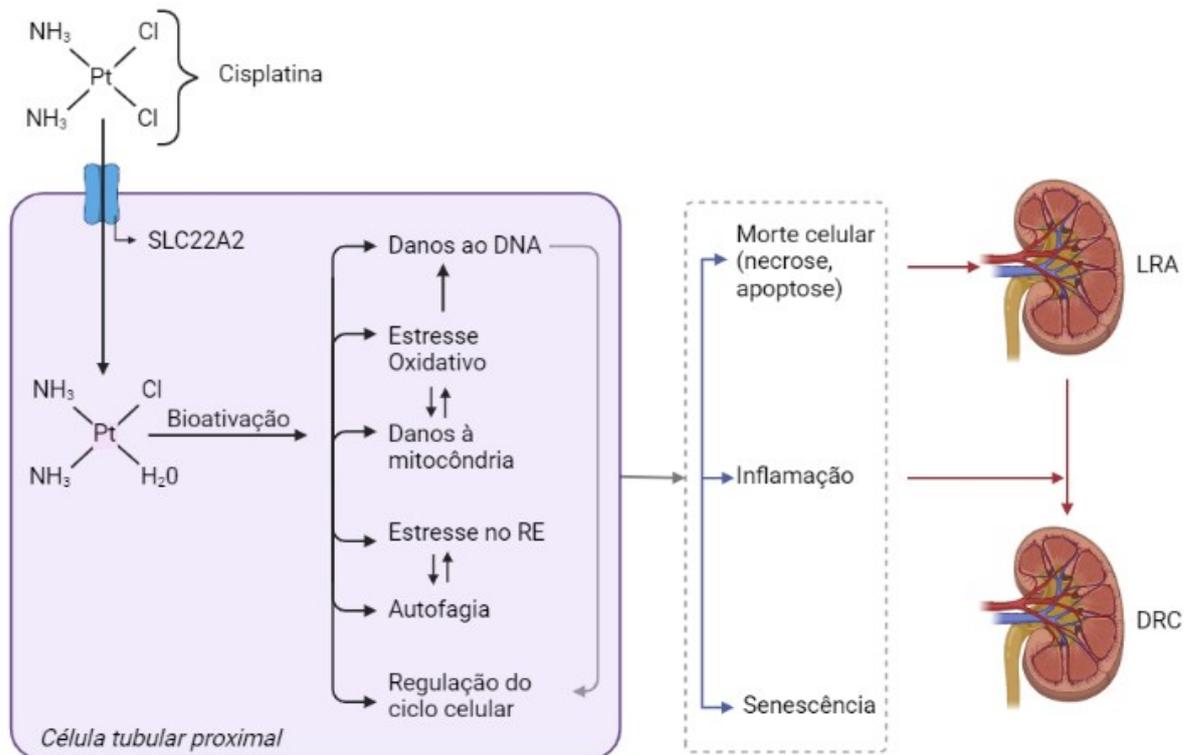
Figura 2 – Ativação metabólica de conjugados de glutathiona a tióis reativos



Legenda: Alcenos halogenados (X representa o aleno e Y um halogênio (flúor, cloro ou bromo) são metabolizados em nefrotoxinas através desta via. Os alcenos halogenados formam conjugados com a glutathiona (glutathiona-S), que são clivados em conjugados de cisteinil-glicina pela enzima GGT (gama-glutamil transpeptidase). Em seguida, a enzima aminodipeptidase cliva os conjugados de cisteinil-glicina em conjugados de cisteína. A enzima Cisteína-S-conjugado beta-liase catalisa a produção de tióis reativos instáveis, que são tóxicos. Acredita-se que a cisplatina seja metabolizada através desta mesma via. Na via proposta, Y representaria um dos cloros da cisplatina e X representaria o restante da molécula do fármaco. Na via proposta, o enxofre da molécula de glutathiona liga-se à platina deslocando o cloro. Adaptado de TOWNSEND et al, 2013.

Quando no interior das células renais, a cisplatina inicia diferentes efeitos citotóxicos culminando na morte celular. Entre os principais mecanismos de nefrotoxicidade pode-se destacar: i) Danos ao DNA; ii) estresse oxidativo; iii) disfunção mitocondrial; iv) estresse no retículo endoplasmático; v) resposta inflamatória e vi) alterações na sinalização de cálcio intracelular (MANOHAR et al, 2018, TANG et al., 2022).

Figura 3 - Eventos fisiopatológicos envolvidos na nefrotoxicidade por cisplatina



Legenda: A captação de cisplatina pelas células tubulares proximais renais é mediada por transportadores de membrana, como a família SLC22A2, SLC22A6 e SLC22A8. Depois de entrar nas células, um íon cloreto de cisplatina é substituído por uma molécula de água. A cisplatina hidratada é então bioativada para a forma tóxica por uma via dependente de gama-glutamil transpeptidase (GGT) e quinurenina aminotransferase 1 (KYAT1). O acúmulo de cisplatina nas células tubulares proximais renais induz à dano ao DNA, dano mitocondrial, estresse oxidativo, estresse no retículo endoplasmático (ER), autofagia e regulação do ciclo celular. Esses processos resultam na morte das células renais, inflamação e senescência celular, que levam à lesão renal aguda (LRA) e à doença renal crônica (DRC). Adaptado de TANG et al, 2023.

Dentre estes mecanismos, o estresse oxidativo parece desempenhar um papel de destaque nos mecanismos citados. A cisplatina pode induzir estresse oxidativo através da produção de EROs e também pela depleção da GSH (PLABA et al, 2008). A cisplatina pode induzir produção de EROs devido a sua rápida reação com moléculas contendo grupos tióis (SH) durante seu mecanismo de bioativação, o que acarreta em depleção de GSH. Além disso, a cisplatina induz dano mitocondrial, com consequente aumento na produção de ER pelas mitocôndrias danificadas. A excessiva geração de ER compromete o funcionamento de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), responsável pela redução do radical ânion superóxido e da catalase, importante na detoxificação de peróxido de hidrogênio. Esse prejuízo nas enzimas antioxidantes exacerba o dano mitocondrial, formando um ciclo vicioso. Por fim, a cisplatina também induz formação de EROs através da ativação de enzimas da via do citocromo P450, particularmente o citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e citocromo P450 4A11 (CYP4A11) (PLABA et al., 2008; Quintanilha et al 2017; TANG et al., 2022). A inibição dessas vias e mecanismos, pode levar à redução dos danos causados pela cisplatina permitindo uma administração de doses mais altas e, como consequência, maiores benefícios no tratamento oncológico (CASANOVA et al, 2019).

Diversos estudos também demonstraram que a cisplatina ativa diferentes vias de sinalização celular, aumenta a liberação de citocinas e moléculas de sinalização nas células epiteliais que resultam em inflamação renal, apoptose e necrose (SANTOS et al, 2012b). O estresse oxidativo é capaz de ativar a caspase-3 e dar início à apoptose (ELDUTAR et al, 2017). Estudos com animais identificaram que a cisplatina tem a capacidade de aumentar a expressão da caspase-3, que é responsável por danos em células renais e prejuízo na função renal (DENIZ et al, 2020.) Também foi observado que a administração de cisplatina induz o aumento da expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas renais, incluindo a interleucina 1 β , interleucina 18, CX3CL1 (uma quimiocina envolvida nas etapas iniciais de inflamação) e interleucina 3 em camundongos (FAUBEL et al, 2007).

A ativação de mecanismos de morte celular por apoptose ou necrose foram previamente descritos como eventos primários na indução de LRA por cisplatina. Entretanto, estudos pré-clínicos com inibidores dessas vias de morte celular não foram capazes de prevenir ou evitar a LRA induzida pelo fármaco, indicando que outros tipos de morte celular podem também contribuir para o desenvolvimento de LRA induzida

pela cisplatina (YU et al, 2015; TRISTAO et al, 2012; HERZOG et al, 2012). Neste cenário, a ferroptose, um tipo de morte celular regulada, vem sendo apontada como um mecanismo de morte celular envolvido na LRA induzida pela cisplatina (GUO et al, 2018; HU et al, 2020). Entretanto, ainda existem poucos estudos na literatura neste tema, e o real envolvimento da ferroptose no mecanismo de toxicidade renal da cisplatina ainda não está claro.

1.3 FERROPTOSE

A morte celular por ferroptose ocorre de forma dependente do ferro intracelular e é uma consequência do acúmulo de produtos da peroxidação lipídica letais para as células. O termo “ferroptose” foi inicialmente proposto em 2012, por Stockwell e colaboradores, que descreveram como um tipo de morte celular oxidativa não-apoptótica, que pode ser induzida por compostos como o RSL3 (um inibidor da enzima glutaciona peroxidase 4 - GPx4 - que induz peroxidação lipídica) e pela erastina (que inibe a captação de cistina pelo sistema antiportador cistina/glutamato, causando depleção de GSH) (STOCKWELL et al., 2017). Importante também destacar que a ferroptose envolve características morfológicas, bioquímicas e genéticas, distintas dos outros tipos de morte celular como apoptose, necrose e autofagia (DIXON et al., 2012).

Apesar do mecanismo de ferroptose não estar totalmente descrito, a literatura, até o presente momento, mostra que esse tipo de morte celular pode ser induzido pela inibição do sistema antiportador de cistina/glutamato (Xc-), pelo acúmulo de ferro ou ácidos graxos poli-insaturados, ou pela depleção de inibidores endógenos de ferroptose, como a GSH e a enzima GPx4 (Stockwell et al., 2017; DIXON et al., 2012) .

O sistema Xc- é responsável pelo influxo de cistina (a forma oxidada da cisteína), juntamente com o efluxo de glutamato (CONRAD e SATO, 2011). Dentro das células a cistina é reduzida à cisteína (Cys-SH), que é utilizada para a síntese da GSH ou de outras proteínas (CONRAD e SATO, 2011). A inibição do sistema Xc-, que pode ocorrer por excesso de glutamato extracelular (STOCKWELL, 2017; LEWERENZ et al., 2018) ou por inibidores diretos como a erastina (DIXON, et al., 2012, YANG e STOCKWELL, 2016), resulta em uma expressiva depleção do conteúdo intracelular de GSH, uma vez que o aminoácido cisteína é o substrato

limitante na via de síntese da GSH. Essa depleção de GSH é responsável por induzir morte celular por ferroptose.

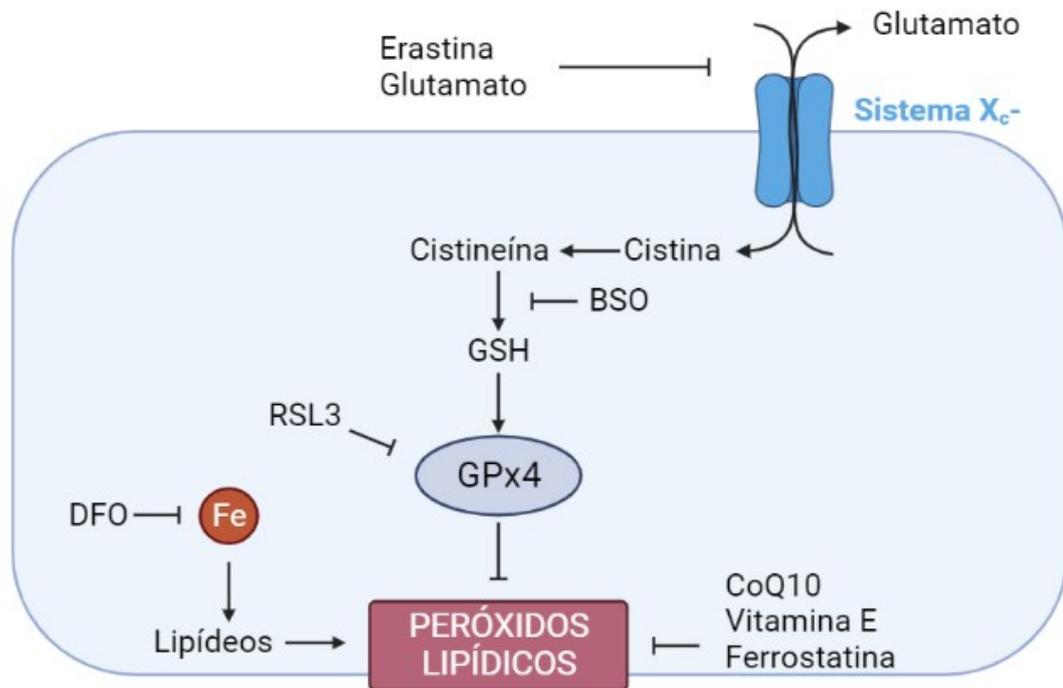
A depleção de GSH também pode ocorrer pela inibição direta da enzima chave na via de síntese deste antioxidante, a enzima glutamato cisteína ligase (GCL), que catalisa a condensação da cisteína e do glutamato para formar o dipeptídeo γ -glutamilcisteína (γ GluCys), o qual, em uma segunda reação catalisada pela enzima glutathione sintetase (GS), forma o tripeptídeo γ -glutamilcisteínilglicina (γ GluCysGly - GSH) através da adição do aminoácido glicina (FARINA e ASCHNER, 2019). Como a GCL é responsável pela etapa limitante da síntese de GSH, sua inibição direta também causa importante depleção no conteúdo de GSH intracelular, culminado com ferroptose (YANG e STOCKWELL, 2016; LEWERENZ et al., 2018).

A GSH é um importante antioxidante endógeno não enzimático que serve como um cofator redutor das enzimas glutathione peroxidases (GPx), as quais são responsáveis por catalisar a redução de peróxidos (por exemplo, R-OOH) em seus álcoois correspondentes (R-OH) às custas da oxidação de duas moléculas de GSH formando glutathione oxidada (GSSG) (BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013). No cenário da ferroptose, a GPx4 exerce um papel fundamental.

A GPx4 é responsável por converter hidroperóxidos lipídicos (L-OOH), que apresentam potencial toxicidade em álcoois lipídicos (L-OH), através da doação de elétrons da GSH. Durante a ferroptose, o ferro é necessário para o acúmulo de L-OOH e indução de peroxidação lipídica. O ferro normalmente está ligado às proteínas transferrina e ferritina e, desta forma, é não reativo. Entretanto, a depleção de GSH acaba prejudicando as defesas antioxidantes resultando em acúmulo de EROs. Essas EROs podem oxidar a ferritina citoplasmática, liberando o ferro no estado ferroso (Fe^{2+}), o qual pode participar da reação de Fenton com L-OOH, gerados como consequência da inibição da GPx4, produzindo radicais lipídicos tóxicos que propagam a reação em cadeia da peroxidação lipídica, resultando em danos nas membranas biológicas e ferroptose (FORCINA E DIXON, 2019).

A inativação da GPx4 pode ocorrer indiretamente através da depleção da GSH ou de maneira direta com a utilização de inibidores como o composto RSL3. Em ambas as situações, a inibição desta enzima resulta no acúmulo de L-OOH e peroxidação lipídica, culminando em morte celular ferroptótica (DIXON et al, 2012).

Figura 4 - Mecanismo de ferroptose



Legenda: Vias moleculares de regulação da ferroptose. BSO: butionina sulfoximina, CoQ10: coenzima Q10, DFO: deferoxamina. Adaptado de YANG e STOCKWELL, 2016.

A peroxidação lipídica e a morte celular através da ferroptose podem ser inibidas através do uso de quelantes de ferro como a deferoxamina (DFO) (LI et al, 2020; DIXON et al., 2012). A DFO foi introduzida na clínica na década de 70 e é utilizada como quelante de ferro para o tratamento de pacientes com sobrecarga de ferro transfusional, principalmente em pacientes com talassemia beta maior (CANÇADO, 2007). O tratamento com DFO protegeu o aumento da geração de EROs e a morte celular por ferroptose induzidas pela erastina em células de fibrosarcoma HT-1080 (DIXON et al., 2012).

Outra molécula que foi identificada como inibidora da ferroptose é a ferrostatina-1 (Fer-1). Dixon e colaboradores demonstraram que a Fer-1 inibiu, de maneira específica, a morte induzida pelos indutores de ferroptose erastina e RSL3, sem efeito protetor frente à morte por necrose induzida pelo peróxido de hidrogênio e induzida pelo composto estaurosporina, um indutor clássico de apoptose em células de fibrosarcoma humano HT-1080 (DIXON et al., 2012). Esses mesmos autores também mostraram um efeito protetor da Fer-1 frente à toxicidade do glutamato em fatias

organotípicas de cérebro de ratos (DIXON et al., 2012). O mecanismo de proteção da Fer-1 envolve sua atividade antioxidante do tipo *scavenger*. A Fer-1 é capaz de transferir dois átomos de hidrogênio e dois elétrons, reduzindo espécies reativas lipídicas e, desta forma, bloqueando a peroxidação lipídica (SKOUTA et al., 2014).

A ferroptose foi descrita em diferentes estudos como um mecanismo de morte celular em diversas patologias incluindo doenças neurodegenerativas, acidente vascular cerebral, lesões por isquemia-reperfusão e LRA (CONRAD et al, 2019; TANG et al, 2020). Em um modelo de LRA em camundongos, a Fer-1, demonstrou proteção contra os danos causados pela cisplatina, indicando que o antineoplásico pode induzir este tipo de morte celular (HU et al, 2020). De maneira semelhante, em outro estudo, o tratamento com o quelante de ferro DFO foi capaz de diminuir a peroxidação lipídica induzida pela cisplatina em fatias de rim de rato (KAMEYAMA et al, 1991), indicando um possível papel da ferroptose na lesão renal induzida por cisplatina. Ikeda e colaboradores, em um estudo *in vivo* em camundongos, mostraram que a cisplatina causou aumento no acúmulo de ferro nos rins, além de aumentar os níveis do marcador de peroxidação lipídica 4-hidroxinonenal (4-HNE), o qual foi reduzido pelo tratamento com Fer-1 e DFO (IKEDA et al., 2021). Em outro estudo recente, foi demonstrado que a cisplatina induziu redução na viabilidade celular, peroxidação lipídica, depleção de GSH e diminuição de GPx4 em células tubulares renais HK2. Neste mesmo estudo, o tratamento com Fer-1 foi capaz de proteger parcialmente a perda da viabilidade celular induzida pela cisplatina (YU et al., 2021).

Entretanto, o real envolvimento da ferroptose na toxicidade renal induzida por cisplatina ainda carece de investigação. Conhecer os mecanismos de toxicidade da cisplatina é importante na busca por estratégias protetoras. Alguns estudos com compostos antioxidantes vêm demonstrando resultados satisfatórios na proteção frente à nefrotoxicidade causada pela cisplatina como a melatonina (SAAD et al, 2002), N-acetilcisteína (WU et al, 2005), compostos naturais como a curcumina (WALY et al, 2011), entre outros. Porém, em estudos realizados em humanos, não foi possível verificar nenhum efeito benéfico desses compostos (WEIJL et al, 2004). Assim, a busca por terapias capazes de prevenir ou atenuar a toxicidade induzida por cisplatina torna-se de fundamental importância para evitar o desenvolvimento de LRA nos pacientes que fazem uso do medicamento.

1.4. COMPOSTO PROBUCOL E DERIVADOS

O Probucol foi descrito em 1970 como composto hipolipemiante (BARNHART et al, 1970) com efeito comprovado em humanos (DRAKE et al, 1969). Apesar de não estar mais em uso devido aos seus efeitos colaterais, trata-se de um composto com propriedades antioxidantes e antiinflamatória que foi utilizado durante um longo período para o tratamento de doenças cardiovasculares (TARDIF et al, 2002). Estudos demonstraram sua capacidade de modulação de defesas antioxidantes (FARINA et al., 2009; SANTOS et al., 2020) além de efeitos neuroprotetores em modelos de doenças neurodegenerativas (COLLE et al, 2013; RIBEIRO et al, 2013; SANTOS et al, 2012).

O probucol apresentou efeito protetor frente ao dano oxidativo induzido pelo metilmercúrio em culturas primárias de neurônios cerebelares e, tal efeito foi atribuído a capacidade do composto em modular positivamente a atividade da enzima glutathione peroxidase 1 (GPx-1) (FARINA et al., 2009). Um estudo posterior mostrou efeitos protetores do probucol em um modelo de doença de Alzheimer induzido pela administração do peptídeo A β em camundongos, onde o composto foi capaz de prevenir a perda sináptica, os danos cognitivos e a peroxidação lipídica induzidos pelo peptídeo A β (SANTOS et al., 2012). O tratamento com o probucol também demonstrou efeito neuroprotetor em um modelo *in vivo* da doença de Huntington induzido pela administração do ácido 3-nitropropiónico (3-NP) em ratos. Foi observado que o probucol atenuou os danos motores e alterações em marcadores de estresse oxidativo induzidos pelo 3-NP, além de aumentar os níveis de GSH e a atividade da enzima GPx no estriado (COLLE et al., 2013a). De maneira semelhante, o probucol também protegeu os déficits motores e a peroxidação lipídica no estriado de camundongos tratados com 6-hidroxidopamina (6-OHDA), em um modelo de doença de Parkinson (RIBEIRO et al., 2013).

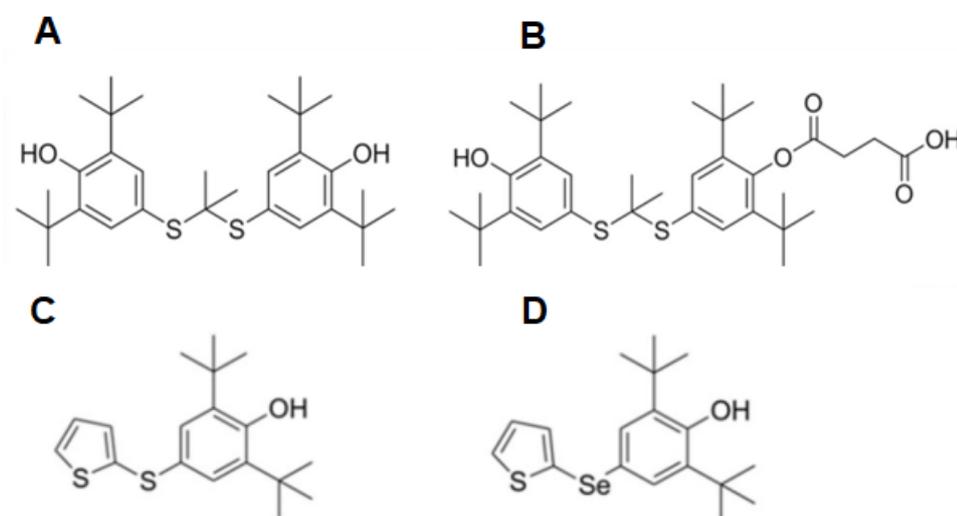
Por fim, um estudo mais recente mostrou que o probucol é capaz de aumentar a atividade da GPx1 em células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y), sem alterar a expressão da enzima, efeito este que foi relacionado à proteção do composto frente à toxicidade induzida por peróxidos. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que o efeito protetor do probucol é perdido com o *knockdown* da GPx1, indicando que o aumento na atividade da enzima tem papel fundamental na proteção exercida pelo probucol (SANTOS et al., 2020).

O succinobucol, por sua vez, é um éster monosuccínico derivado do probucol que retém as propriedades antioxidantes deste composto, mas sem causar seus efeitos colaterais indesejados (SUNDELL et al, 2003), além de apresentar propriedades antiinflamatórias (LUYENDYK et al, 2007). O composto também demonstrou efeitos benéficos em modelos de doença de Parkinson e Huntington (SANTOS et al, 2017; COLLE et al, 2016; COLLE et al, 2013b).

Colle e colaboradores, demonstraram, em um modelo *in vitro* da Doença de Huntington com 3-NP, que os tratamentos com probucol e succinobucol foram efetivos em proteger frações sinaptossomais de encéfalo de ratos contra o aumento de EROs, peroxidação lipídica e depleção da GSH. Mas quando comparados, o tratamento com succinobucol apresentou efeito superior ao do probucol em atenuar a disfunção mitocondrial causada pelo estresse oxidativo induzido pelo 3-NP (COLLE et al, 2013b). Em outro estudo, o succinobucol também demonstrou efeito protetor frente à toxicidade induzida pelo 3-NP em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Tal efeito, foi atribuído ao aumento da atividade e expressão da enzima GCL e aumento nos níveis de GSH induzidos pelo pré-tratamento com o composto succinobucol (COLLE et al, 2016).

Já em um estudo realizado com modelo de doença de Parkinson foi demonstrado que o succinobucol diminuiu sintomas não motores, neurodegeneração e neuroinflamação induzidos pela administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinida (MPTP) em camundongos. Neste modelo, o succinobucol demonstrou ser capaz de impedir a diminuição dos níveis de tiroxina hidroxilase (TH) na substância negra e corpo estriado dos animais tratados com MPTP (SANTOS et al, 2017).

Figura 5 – Estrutura do composto Probucol e derivados



Legenda: Probucol (A), succinobucol (B), RC363 (C) e RC574 (D). Fonte: Adaptado de Naime, 2022.

Novos compostos análogos do probucol foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Antônio Luiz Braga (Departamento de Química, CFM/UFSC, SC, BR) em parceria com o Prof. Dr. Marcelo Farina (Departamento de Bioquímica, CCB/UFSC, SC, BR) como os compostos RC363 e o RC574. Em estudo recente, esses compostos demonstraram inibição da disfunção mitocondrial induzida por glutamato, além de efeitos protetores associados a um aumento da concentração e atividade intracelular da enzima GPx em linhagens de células hipocâmpais HT22. Além disso, neste mesmo estudo, o tratamento das células com estes compostos diminuiu a geração de superóxidos mitocondriais e demonstrou também proteção contra os efeitos do composto RSL3, um indutor clássico de ferroptose (BUENO et al, 2020). Em outro estudo, os compostos derivados do probucol RC363 e o RC574 demonstraram efeito protetor em modelos de ferroptose induzidos por RSL3, glutamato e butionina sulfoximina (BSO) em células HT22 e, tal efeito foi similar ao composto antiferroptótico Fer-1 (NAIME et al, 2022).

Em conjunto esses estudos mostram um importante papel protetor do probucol e seus derivados em diferentes modelos que envolvem danos oxidativos. Em especial, os compostos derivados do probucol RC363 e o RC574 já demonstraram efeito protetor em modelos de ferroptose. Diante disso, torna-se importante avaliar o

efeito protetor desses compostos frente à toxicidade da cisplatina, uma vez que não existem terapias disponíveis que possam mitigar de maneira efetiva os danos induzidos pelo fármaco.

2. JUSTIFICATIVA

Desde a sua aprovação nos anos 70, a cisplatina vem sendo amplamente utilizada para o tratamento de neoplasias. Entretanto, a nefrotoxicidade é um fator limitante na terapia com o fármaco (PERES e CUNHA, 2013). Estima-se que cerca de um terço dos pacientes desenvolve nefrotoxicidade após uma única dose de cisplatina (LEBWOHL e CANETTA, 1998). A lesão renal aguda (LRA) é uma das principais manifestações clínicas da nefrotoxicidade da cisplatina. Apesar dos inúmeros estudos sobre os mecanismos de toxicidade da cisplatina sobre os rins, ainda existem questões a serem investigadas. Recentemente, a ferroptose tem sido proposta como um mecanismo importante na patogênese da LRA em diferentes modelos experimentais (TANG e XIAO, 2020). No entanto, o envolvimento da ferroptose no mecanismo de LRA induzida pela cisplatina ainda não está totalmente elucidado. Um melhor conhecimento da patogênese da LRA induzida pelo fármaco é crucial para prevenir o comprometimento renal e melhorar a sobrevida de pacientes em tratamento com a cisplatina. Além disso, o entendimento dos mecanismos de toxicidade induzidos pelo fármaco também é fundamental para a busca por terapias de proteção. Atualmente não existem estratégias terapêuticas efetivas para prevenir ou mitigar o dano renal induzido pela cisplatina. Uma das estratégias adotadas para prevenir o comprometimento renal é o aumento da hidratação dos pacientes visando evitar o acúmulo do fármaco nos rins (PERES e CUNHA, 2013). Entretanto, esta estratégia é limitada, não sendo capaz de efetivamente evitar ou reduzir a toxicidade do fármaco sobre o tecido renal. Neste sentido, o interesse em estudar compostos antioxidantes como o probucol e derivados torna-se relevante, uma vez que esses compostos apresentaram atividade protetora em diferentes modelos experimentais. Considerando os argumentos acima destacados, acredita-se que a busca por possíveis agentes com atividades renoprotetoras é amplamente justificável. Deste modo, o objetivo do estudo é investigar o envolvimento da ferroptose na citotoxicidade da cisplatina em um modelo *in vitro* em células de rim humano HEK 293, bem como avaliar o efeito benéfico (terapêutico) dos compostos probucol e derivados frente à toxicidade induzida pela cisplatina, buscando um melhor entendimento do papel da ferroptose como mecanismo de morte celular na LRA.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o possível envolvimento da ferroptose no mecanismo de citotoxicidade da cisplatina, bem como, avaliar o efeito protetor do composto probucol e seus derivados em células de rim humano HEK 293.

3.1.1 Objetivos específicos

- (i) Avaliar a toxicidade da cisplatina em células HEK 293 através de ensaios de viabilidade celular;
- (ii) Verificar marcadores de estresse oxidativo, envolvidos na morte celular por ferroptose, como a geração de espécies reativas, os níveis de GSH intracelulares, bem como a peroxidação lipídica (geração de hidroperóxidos lipídicos) em resposta a exposição à cisplatina;
- (iii) Avaliar a toxicidade do PB e dos seus derivados através de ensaios de viabilidade celular;
- (iv) Investigar o efeito protetor do composto probucol e seus derivados frente à toxicidade induzida pela cisplatina;
- (v) Avaliar a toxicidade dos compostos quelantes de ferro DFO, deferoxamina cafeína (DFCAF), deferiprona (DFP) e salicilaldeído isonicotinoil hidrazina (SIH);
- (vi) Investigar se os quelantes de ferro DFO, DFCAF, DFP e SIH são capazes de proteger da toxicidade induzida pela cisplatina;
- (vii) Investigar o efeito protetor do composto anti-ferroptótico clássico Fer-1 frente à toxicidade induzida pela cisplatina nas células HEK 293.

4. METODOLOGIA

4.1. REAGENTES

Os compostos cisplatina, probucol, ferostatina-1, brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT), 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA), e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A sonda fluorescente borodipirrometenos Bodipy 581/591 C11 (C11-BODIPY^{581/591}) foi adquirida da empresa Thermo Fischer (Waltham, MA, USA). O meio *dubecco's modified eagle medium* (DMEM) e o soro fetal bovino (SFB) foram obtidos da empresa Gibco Life Technologies.

O composto succinobucol foi sintetizado previamente em colaboração com o Professor Dr. Marcelo Godoi da Universidade Federal do Rio Grande, Campus Santo Antônio da Patrulha em parceria já estabelecida (WEINGARTEN, 2004; COLLE et al, 2013). A síntese dos compostos derivados do probucol, RC363 e RC574 foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr. Antônio Luiz Braga (Departamento de Química, CFM/UFSC, SC, BR), por intermédio do professor Dr. Marcelo Farina (Departamento de Bioquímica, CCB/UFSC, SC, BR), e encontra-se descrita na literatura (Bueno et al., 2020).

O composto DFCAF, derivado da DFO, foi sintetizado pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Dr. Breno Pannia Espósito (Instituto de Química, USP, São Paulo, BR). A síntese da DFCAF foi previamente descrita na literatura (Alta et al., 2014). Os compostos quelantes de ferro, DFO, DFP e o composto SIH foram gentilmente cedidos pelo professor Breno Pannia Espósito (Instituto de Química, USP, São Paulo, BR) ao professor Dr. Marcelo Farina (Departamento de Bioquímica, CCB/UFSC, SC, BR), que, por sua vez, disponibilizou para a utilização neste estudo

4.2. CULTIVO CELULAR

Para este estudo *in vitro* foram usadas células embrionárias de rim humano (HEK 293, ATCC – Rockville, EUA), gentilmente cedidas pela professora Dra. Fabíola Branco Filippin Monteiro (Departamento de Análises Clínicas, CCS/UFSC, SC, BR). As células HEK 293 são provenientes de rim de um feto saudável abortado em

meados da década de 70, por causas desconhecidas. As células foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 2 mM de glutamina, 0,28 µg/µL de gentamicina e 250 µg de anfotericina B. As culturas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e cultivadas em placas de petri com área de crescimento de 60,8 cm². O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias e o repique ocorreu conforme necessidade verificando a confluência celular (~90%), utilizando solução de tripsina 1x. Os experimentos foram realizados em 60-70% de confluência celular e foram utilizadas células entre as passagens 5 e 10.

4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os compostos probucol, seus derivados, ferrostatina e os quelantes de ferro foram preparados em Dimetilsulfóxido (DMSO) que foi utilizado como veículo e cuja concentração não ultrapassou 0,1% nas células. A cisplatina foi preparada em solução salina (NaCl 0,9%) estéril.

Primeiramente, a toxicidade da cisplatina nas células HEK 293 foi investigada. As células foram expostas ao veículo (salina) ou à cisplatina nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 250, 300 e 500 µM durante 24 horas. Após este período de exposição, a viabilidade celular foi analisada através do ensaio de redução do MTT. A partir deste experimento, as concentrações de 25, 100 e 250 µM de cisplatina foram escolhidas para investigar o efeito temporal do antineoplásico nas células. Para isso, as células foram expostas ao veículo ou à cisplatina durante 3, 6, 12 e 24 horas. Esse experimento teve o objetivo de avaliar em qual tempo de exposição, a cisplatina causa citotoxicidade, para então definir um tempo de exposição anterior à diminuição da viabilidade celular para investigar os eventos (marcadores de estresse oxidativo) que precedem a redução na viabilidade das células. Baseado nesses experimentos a concentração de 100 µM de cisplatina e o tempo de exposição de 6 horas foram escolhidos para os experimentos para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo.

Para o estudo do efeito protetor do probucol e derivados, inicialmente, foi realizada uma curva de concentração, anteriormente descritas em estudos realizados pelo grupo de pesquisa, com os compostos probucol e seus derivados para então definir qual a concentração que seria usada para cada composto nos experimentos posteriores. As células foram tratadas com veículo (DMSO 1%), probucol,

succinobucol, RC 363 ou RC 574 nas concentrações de 0,5, 1, 3 e 10 μM , durante 48 horas e, ao final do tratamento, foi realizado o teste de viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT. Baseado nestes resultados, foram escolhidas as concentrações de 0,5 e 3 μM do composto probucol e seus derivados para utilização nos ensaios de proteção.

Para os ensaios de proteção com os derivados do probucol, as células foram pré-tratadas com veículo (DMSO 1%, sendo 0,1% quando no poço) ou com os compostos (nas concentrações escolhidas previamente), durante 24 horas e, em seguida, expostas a 100 μM de cisplatina por 24 horas. Após este período, a viabilidade celular foi analisada.

Em relação aos quelantes de ferro, também foram realizadas curvas de concentração, onde as células foram tratadas com veículo (DMSO 1%), 0,5, 1, 3, 10 e 20 μM dos quelantes DFO, DFCAF, DFP e SIH. Após esses tratamentos foi realizado o ensaio de viabilidade celular e, a partir dos resultados obtidos, foram determinadas as concentrações de 0,5 e 3 μM para os compostos SIH e DFO e 0,5, 3 e 10 μM para a DFCAF e a DFP.

Para os ensaios de proteção com os quelantes de ferro, as células foram pré-tratadas com veículo (DMSO 1%) ou com os compostos DFO, DFCAF, DFP e SIH (nas concentrações escolhidas previamente), durante 24 horas e, em seguida, expostas a 100 μM de cisplatina por 24 horas. Após este período, foi realizado o ensaio para avaliação da viabilidade celular.

Em experimentos paralelos, as células HEK 293 foram tratadas com veículo (DMSO 1%) ou com composto antiferroptótico clássico Fer-1 nas concentrações de 0,5 e 3 μM (NAIME et al, 2022) durante 24 ou 1 hora, seguida da exposição à cisplatina durante 24 horas. Após este período, foi realizado o ensaio para avaliação da viabilidade celular.

4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de redução do MTT (MOSMAN, 1983) foi utilizado para verificar a viabilidade celular. Neste ensaio verifica-se a capacidade de redução do sal tetrazólico, MTT, [brometo de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio], pelas desidrogenases mitocondriais, em um composto azulado denominado formazan,

sendo que a quantidade de cristais de formazan formada é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MOSMANN, 1983).

Para os ensaios de viabilidade, as células HEK 293 foram cultivadas em placas de 96 poços com 6.000 células por poço e, após 24 horas de cultivo, as células receberam os tratamentos, conforme destacado no item anterior (4.3).

Após os tratamentos, o meio de cultivo foi removido e, em seguida, foi adicionado aos poços 100 μ L de uma solução de MTT (0,5 mg/mL). As células foram incubadas durante uma hora e meia a 37 °C, protegidas da luz. Após o tempo de incubação, a solução de MTT foi removida e 100 μ L do solvente DMSO puro foi adicionado aos poços para solubilizar o formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 - TECAN) no comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem do controle (células tratadas com veículo, 100%).

4.5. ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE TIÓIS NÃO-PROTÉICOS (NPSH)

A determinação da concentração intracelular de glutathiona (GSH) foi realizada através de método previamente descrito por Ellman, no qual é mensurado principalmente glutathiona reduzida (ELLMAN, 1959). Conforme Cooper, 1998, o conteúdo de NPSH é proporcional à concentração de GSH, sendo que cerca de 95% dos tióis não-proteicos correspondem à GSH. Este ensaio é baseado na reação do composto DTNB com grupos tióis, após precipitação das proteínas que contêm grupos tióis em sua estrutura, resultando na formação do composto 5,5'tiobis-(2-ácido nitrobenzóico) (TNB), o qual pode ser mensurado em comprimento de onda específico. A concentração de TNB formada é proporcional ao conteúdo de NPSH (ELLMAN, 1959). Neste ensaio foram cultivadas 291.000 células/poço, em placas de 6 poços e, após 48 horas do plaqueio, as células foram tratadas, sendo 2 poços com veículo (salina) e 2 poços com 100 μ M de cisplatina durante 6 horas. Após o tempo de exposição, as células foram lavadas com 1000 μ L de PBS 0,01 M a 37°C e coletadas com 200 μ L de uma solução de PBS 0,01 M contendo 0,5% de Triton X-100, com o auxílio de raspadores. Após a coleta, 20 μ L de amostra foi reservado para posterior determinação de proteínas e o restante foi precipitado com 180 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado e levado à centrifugação por 10 minutos, à 4°C, em velocidade de 5000xg. Finalizada esta etapa, havia um precipitado com o conteúdo

proteico, que foi descartado e um sobrenadante que foi utilizado para a determinação de NPSH após incubação com DTNB 10 mM em Tampão fosfato de potássio (TFK 1M pH 7,0).

As absorbâncias das amostras foram mensuradas no comprimento de onda de 412 nm utilizando espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 - TECAN). Os resultados foram calculados através da curva de concentração de GSH para determinar o conteúdo de NPSH (nmol de NPSH/mg de proteína) e expressos como percentual do controle (células tratadas com veículo).

4.6. ENSAIO DA 2',7'-DICLORO-DI-HIDRO-FLUORESCEÍNA DIACETATO (DCFH-DA)

Para avaliar a produção de espécies reativas (ER) foi utilizado o composto 2',7'-dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA). A DCFH-DA é uma sonda fluorescente que sofre uma reação de desacetilação ao ser internalizada pelas células, formando o composto DCFH que, por sua vez, é reduzido pelas espécies reativas, produzindo como consequência o composto fluorescente DCF. Este composto emite fluorescência que, quando determinada, é proporcionalmente correspondente à quantidade de ER geradas internamente nas células (KALYANARAMAN et al., 2012).

Para isto, células HEK 293 foram cultivadas em placas de 24 poços (60.000 células/poço) e, após 48 horas do plaqueio, foram tratadas com TBOOH 2,5 mM (controle positivo), com veículo ou com 100 µM de cisplatina. Logo após o tratamento, as células foram expostas à sonda DCFH-DA na concentração de 10 µM (concentração final nos poços). Em seguida foi realizada a leitura da fluorescência, a cada 30 minutos, nos comprimentos de onda de 488 nm para excitação e 525 nm para emissão, por 6 horas, sob temperatura constante de 37°C em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 - TECAN). Os resultados da fluorescência da DCF foram analisados e a produção de espécies reativas foi expressa pela porcentagem do controle (células tratadas com veículo).

4.7. ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DE PERÓXIDOS LIPÍDICOS COM A SONDA FLUORESCENTE C11-BODIPY^{581/591}

A sonda fluorescente borodipirrometenos Bodipy 581/591 C11 (C11-BODIPY^{581/591}) foi utilizada para determinar a produção de hidroperóxidos lipídicos. Trata-se de um reagente lipofílico com sensibilidade à peroxidação lipídica pois apresenta uma estrutura polar e apolar simultaneamente. Sua porção apolar favorece a incorporação da sonda na membrana plasmática enquanto seu caráter polar apresenta ligações duplas que estão suscetíveis à oxidação por radicais peroxil. Esta oxidação faz com que sua fluorescência altere sua coloração de vermelho para verde identificando assim a peroxidação de lipídios da membrana (NAGUIB, 1998).

As células foram cultivadas em placas de 24 poços (60.000 células/poço) e, após 48 horas do plaqueio, foram expostas ao veículo (salina) ou à 100 µM de cisplatina. Logo após à exposição, foi adicionada a sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} na concentração de 10 µM em cada poço. Em seguida foi realizada a leitura da fluorescência, a cada 30 minutos, nos comprimentos de onda de 530 nm/590 nm (excitação/emissão) para a fluorescência vermelha e 485 nm/528 nm (excitação/emissão) para a fluorescência verde, por 6 horas, sob temperatura constante de 37°C em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 - TECAN). Os resultados foram calculados como a razão entre a fluorescência da sonda oxidada (verde) sobre a fluorescência da sonda reduzida (vermelho) e expressos em porcentagem do controle (Células tratadas com veículo).

4.8. ENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A determinação do conteúdo proteico foi realizada conforme o método descrito por Lowry e colaboradores (1951). Neste ensaio foi utilizado a alíquota de 20 µL de amostra reservada anteriormente durante o ensaio de determinação de NPSH. Uma curva padrão de albumina de soro bovino foi utilizada para o cálculo da concentração de proteínas celular.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa GraphPad Prisma 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Análises de variância (ANOVA) de uma ou duas vias foram utilizados para avaliar as diferenças entre grupos, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Diferenças entre dois grupos (controle *versus*

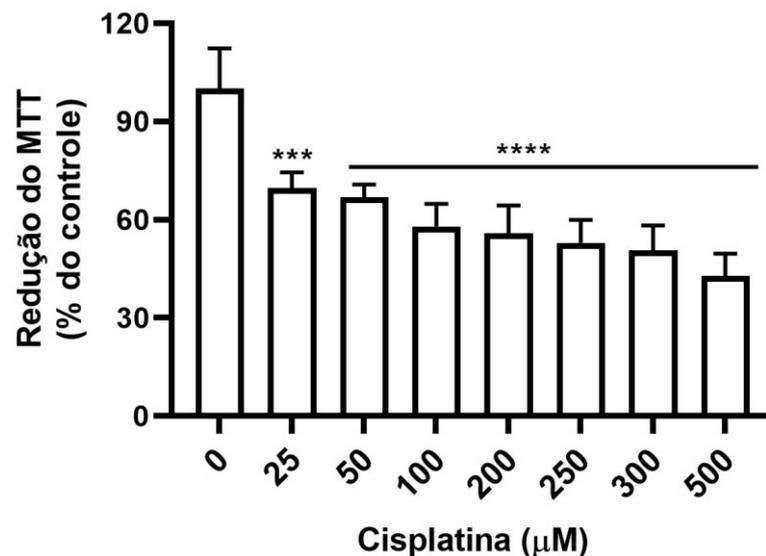
cisplatina) foram analisadas através de teste t de Student. Os dados foram representados como média \pm erro padrão da média e as diferenças entre grupos foram consideradas significativas para um valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CITOTOXICIDADE DA CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293

Inicialmente, foi avaliada a citotoxicidade da cisplatina nas células HEK 293. As células foram expostas à cisplatina nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 250, 300 e 500 μM durante 24 h. Conforme a figura 6, a exposição à cisplatina causou uma redução significativa na viabilidade celular em todas as concentrações testadas ($p < 0,001$).

Figura 6 - Toxicidade da cisplatina em células HEK 293



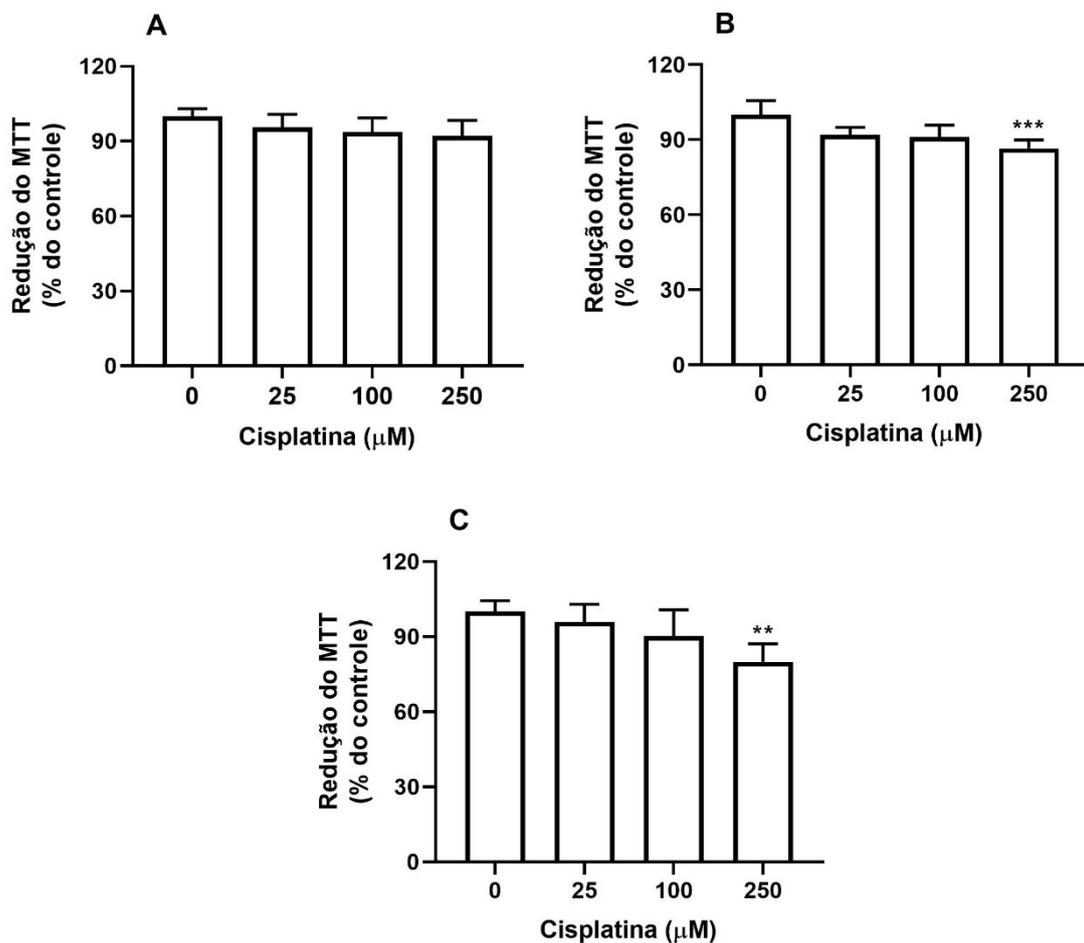
Legenda: As células foram expostas ao veículo (Salina) ou à cisplatina (25 - 500 μM). Após 24 horas de exposição, o ensaio de viabilidade celular foi realizado. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 4$). *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey).

Baseado nesses resultados, foram escolhidas as concentrações de 25, 100 e 250 μM de cisplatina para avaliar a toxicidade temporal deste composto nas células HEK 293. Para este experimento, as células foram expostas à cisplatina, nas concentrações previamente determinadas, nos tempos de 3, 6 e 12 horas.

A exposição à cisplatina durante 3 horas, não causou alteração significativa na viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas (Figura 7A). Por outro lado, a cisplatina, na concentração de 250 μM , causou uma redução significativa na

viabilidade das células após 6 e 12 horas de exposição (13%, $p < 0,001$ e 20%, $p < 0,01$, respectivamente; Figura 7B-C). Baseados nesses resultados, a concentração de 100 μM , a qual em 24 horas reduziu aproximadamente 60% a viabilidade celular, foi escolhida para os demais experimentos. Além disso, o tempo de exposição de 6 horas, no qual não houve alteração na viabilidade celular, foi escolhido para avaliação dos eventos que precedem a perda de viabilidade, como os parâmetros de estresse oxidativo relacionados à indução de morte celular por ferroptose (geração de espécies reativas, conteúdo de GSH intracelular e peroxidação lipídica).

Figura 7 - Toxicidade temporal da cisplatina em células HEK 293



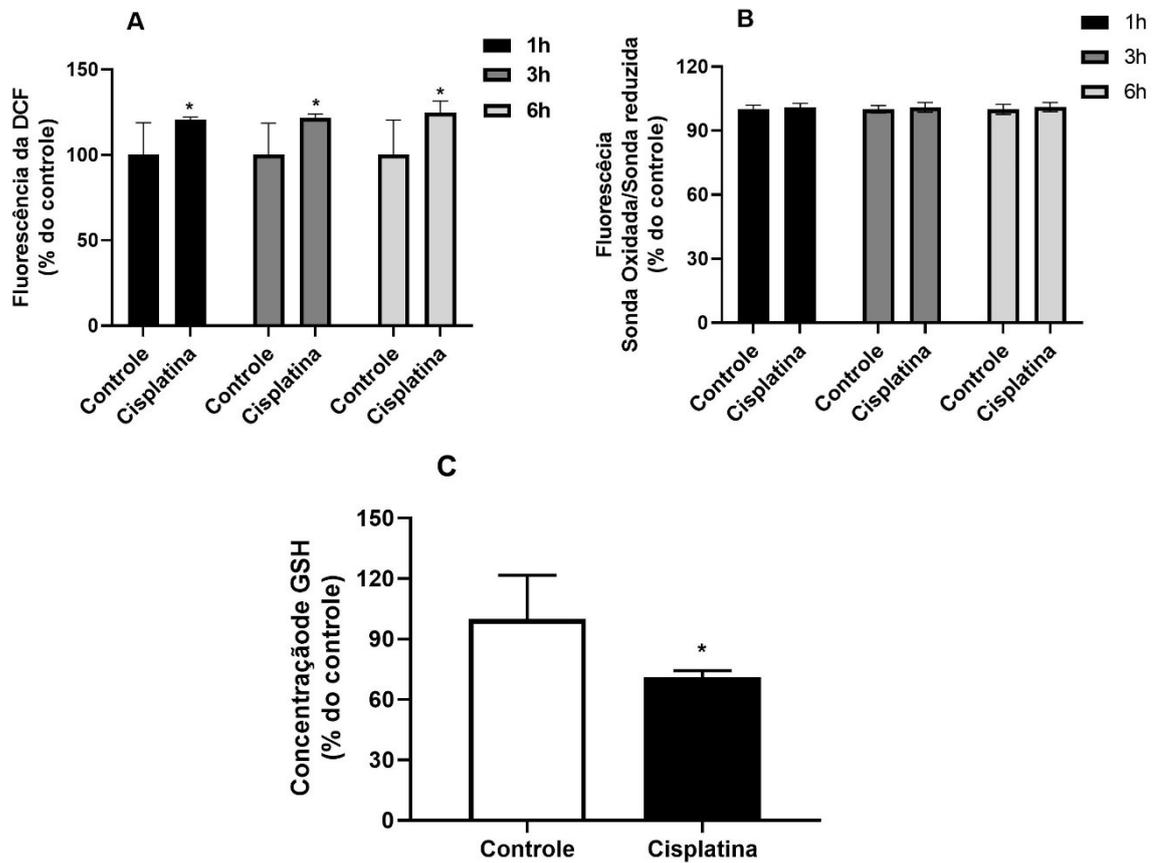
Legenda: As células foram expostas ao veículo (Salina) ou à cisplatina 25, 100 ou 250 μM por 3 (A), 6 (B) ou 12 horas (C). Após cada período de exposição o ensaio de viabilidade celular foi realizado. Os dados representam a média \pm EPM ($n = 5$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferença significativa quando comparados ao controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey).

5.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À CISPLATINA NA GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS, NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E NOS NÍVEIS DE GSH EM CÉLULAS HEK 293

A geração de ER, a depleção de GSH e a peroxidação lipídica são eventos primários envolvidos na morte celular por ferroptose (DIXON et al., 2012). Diante disso, para investigar se a cisplatina é capaz de induzir a morte celular ferroptótica em células HEK 293, primeiramente fomos investigar se o antineoplásico era capaz de induzir geração de ER. Na figura 8A, podemos observar que a exposição à cisplatina na concentração de 100 μ M causou um aumento significativo na geração de ER após 1, 3 e 6 horas de exposição ($p < 0,05$). Porém, a cisplatina, em nenhum dos tempos testados, foi capaz de induzir aumento significativo na peroxidação lipídica (Figura 8B).

Em relação ao conteúdo de GSH, a cisplatina causou uma depleção significativa após 6 horas de exposição ($p < 0,05$; Figura 8C). Em conjunto, esses resultados indicam que a geração de ER e a depleção de GSH, observados após 6 horas de tratamento com a cisplatina, são provavelmente mecanismos que antecedem a diminuição da viabilidade das células que ocorre após 24 horas de exposição ao antineoplásico. Além disso, uma vez que esses mecanismos estão envolvidos na morte celular por ferroptose, os resultados podem indicar um possível envolvimento desse tipo de morte celular no mecanismo de toxicidade da cisplatina em nosso modelo. E, apesar da peroxidação lipídica não ter aumentado após 6 h de exposição à cisplatina, não podemos descartar que tal fenômeno possa estar ocorrendo em tempos mais tardios, uma vez que tanto a geração de ER quanto a depleção da GSH são mecanismos que antecedem a peroxidação lipídica. Assim, valeria investigar o marcador de peroxidação lipídica após 12 h de exposição à cisplatina.

Figura 8 - Efeitos da cisplatina sobre a geração de ER, peroxidação lipídica e concentração de GSH em células HEK 293.



Legenda: (A) As células foram expostas ao veículo (Salina) ou à cisplatina 100 μ M durante 1, 3 e 6 horas e a geração de ER foi monitorada através a sonda DCFH-DA e os dados expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo, 100%). (B) As células foram expostas ao veículo (Salina) ou à cisplatina 100 μ M durante 1, 3 e 6 horas e a peroxidação lipídica foi monitorada através a sonda C11-BODIPY581/591 e os dados expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo, 100%). (C) As células foram expostas ao veículo (Salina) ou à cisplatina 100 μ M por 6 horas, seguido do ensaio do NPSH. Os dados foram expressos pela porcentagem do controle (células tratadas com veículo, 100 %). Os dados representam a média \pm EPM (n = 3-4). * p < 0,05 indicam diferença quando comparados ao grupo controle através de teste t de Student.

Há muitas décadas que o estresse oxidativo tem sido apontado como um importante fator na nefrotoxicidade da cisplatina. O aumento na geração de EROs já foi demonstrado tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (CHEN et al., 2019; WANG et al., 2019; GILANI et al., 2022). Como mencionado anteriormente, um dos

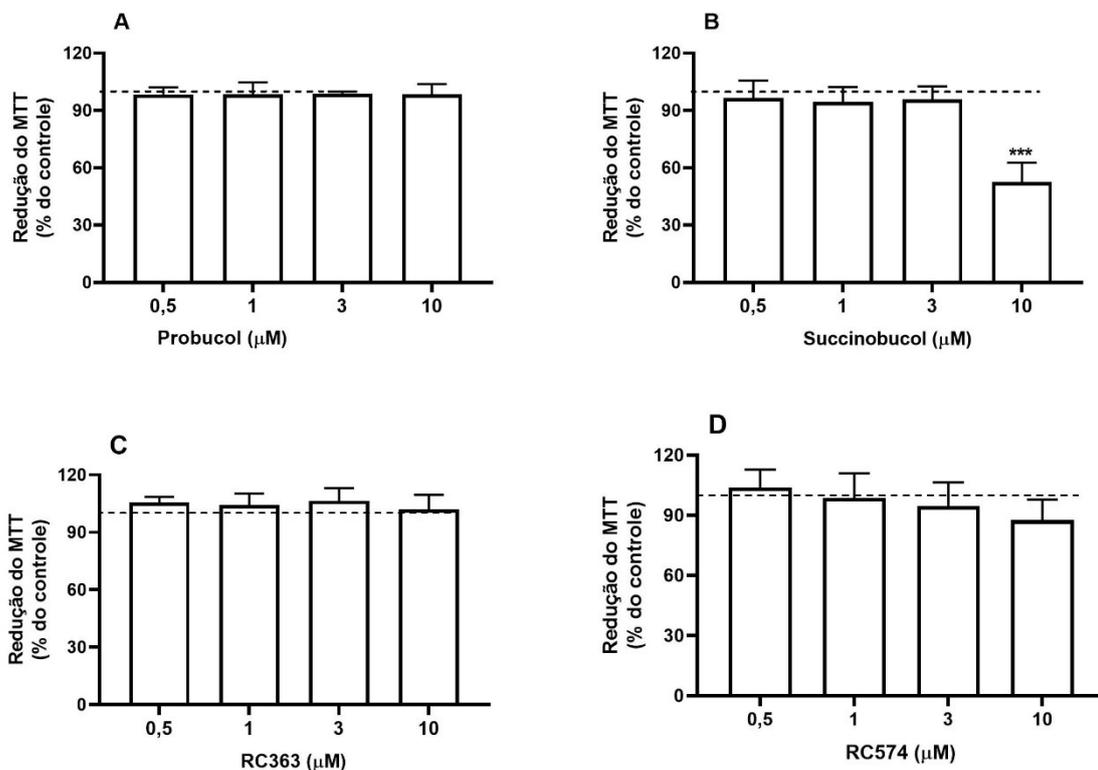
mecanismos responsáveis pelo aumento na geração de ER após o tratamento com a cisplatina é a depleção da GSH. A GSH é um antioxidante endógeno não-enzimático responsável pela manutenção do equilíbrio redox das células, agindo como uma importante defesa celular frente às ER. Durante a detoxificação de EROs, a GSH pode reagir de forma não-enzimática com as EROs e também atuar como um doador de elétrons na redução de peróxidos pela ação das enzimas GPx (BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013). A exposição à cisplatina causa depleção da GSH, uma vez que o fármaco, após ser captado pelas células é metabolizado a um composto altamente reativo, que rapidamente pode reagir com moléculas contendo grupos tióis (TOWNSEND et al., 2003). Esse mecanismo resulta na inativação e depleção da GSH, modificando o estado redox das células, levando a um acúmulo de EROs endógenas e estresse oxidativo (PLABA et al., 2008; TANG et al., 2022). Em nosso estudo, a exposição à cisplatina por 6 h causou depleção de GSH, evento esse que foi acompanhado por um aumento na geração de ER, também verificado após 6 h de exposição ao fármaco. Nossos resultados corroboram os achados de Wang e colaboradores, que também verificaram aumento na geração de ER e citotoxicidade após exposição à 100 μ M de cisplatina em células HEK 293 (WANG et al., 2019). Esse aumento na geração de ER pode estar relacionado à depleção de GSH induzida pela cisplatina; entretanto, a cisplatina também é capaz de gerar ER através de outros mecanismos como disfunção mitocondrial e via sistema do citocromo P450 (PLABA et al., 2008; QUINTANILHA et al 2017; TANG et al., 2022). Esses eventos, apesar de não terem sido avaliados em nosso modelo, devem também ser considerados como mecanismos envolvidos na geração de ER pela cisplatina.

5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO PROBUCOL E SEUS DERIVADOS FRENTE À CITOTOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293

Inicialmente, antes de avaliar se o probucol e seus derivados protegiam da toxicidade induzida pela cisplatina, foi avaliada a viabilidade das células HEK 293 após o tratamento com diferentes concentrações desses compostos antioxidantes. O objetivo desse experimento foi avaliar se os compostos causavam alguma toxicidade nas células, para então definir quais concentrações seriam usadas para os ensaios de proteção. O tratamento com o composto probucol e com seus derivados RC363 e RC574, durante 48 h, não causou alterações significativas na viabilidade celular, em

nenhuma das concentrações testadas (Figura 9A, 9C e 9D, respectivamente). Por outro lado, foi observada uma redução de aproximadamente 45% na viabilidade das células tratadas com o composto succinobucol na concentração de 10 μM ($p < 0,001$; Figura 9B). A partir destes resultados, estabeleceu-se então as concentrações de 0,5 e 3 μM para todos os compostos, as quais não demonstraram efeitos citotóxicos no ensaio de viabilidade celular, para serem utilizadas nos ensaios posteriores.

Figura 9 - Efeitos do tratamento com o probucol e seus derivados na viabilidade de células HEK 293

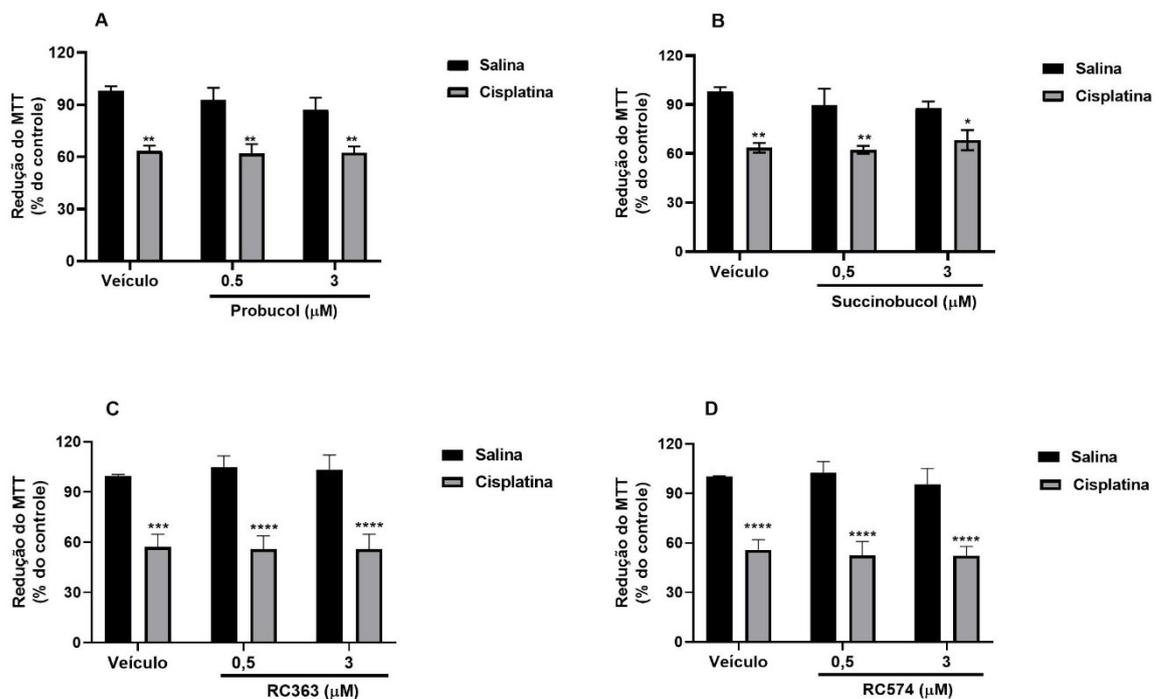


Legenda: As células foram tratadas com concentrações crescentes dos compostos probucol (A), succinobucol (B), RC363 (C) e RC574 (D) por 48h. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam média \pm EPM de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ indica diferença estatística em relação ao grupo controle através de análise de variância de uma via, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Tendo em vista os resultados obtidos anteriormente, investigou-se o possível efeito protetor do probucol e seus derivados na toxicidade induzida por cisplatina.

Nestes experimentos as células foram pré-tratadas com veículo, probucol, succinobucol, RC363 e RC574 durante 24 h, nas concentrações de 0,5 e 3 μM . Posteriormente, as células foram expostas à cisplatina 100 μM e o ensaio de viabilidade celular foi realizado após 24 h de exposição à cisplatina. Na figura 10, podemos observar que a cisplatina induziu redução significativa na viabilidade celular, porém os tratamentos com o composto probucol e seus derivados não foram capazes de proteger as células frente ao efeito citotóxico induzido pela cisplatina em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 10 - Avaliação do efeito protetor do probucol e seus derivados na redução da viabilidade celular induzida por cisplatina



Legenda: As células foram pré-tratadas com 0,5 e 3 μM de probucol (A) e seus derivados succinobucol (B), RC363 (C), RC574 (D), durante 24 h e, posteriormente, expostas a 100 μM de cisplatina por 24 h. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem do controle (células tratadas com veículo). Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam médias \pm EPM de 6 experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ indicam diferença estatística em relação ao grupo controle através de análise de variância de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Um estudo recente realizado com modelo *in vitro* demonstrou que o probucol e o succinobucol não apresentaram efeito protetor em modelo de ferroptose induzida por Glutamato, BSO e RSL3 em células HT22. Já os compostos RC363 e RC574, nas concentrações de 0,5 e 3 μM , demonstraram proteção total frente à morte celular ferroptótica induzida pelo Glutamato e pelo RSL3. Ambos também apresentaram, na concentração de 0,5 μM , reversão parcial dos efeitos do tratamento com BSO. Além disso, no mesmo estudo, foi demonstrado que o efeito protetor desses compostos foi semelhante ao efeito protetor da Fer-1 (NAIME et al, 2021), indicando que esses compostos possuem atividade antiferroptótica. Apesar de Naime e colaboradores utilizarem como método de avaliação o co-tratamento, devido a limitações das células HEK 293, no presente estudo foi realizado tratamento prévio.

Em nosso estudo, os compostos RC363 e RC574 não protegeram da toxicidade da cisplatina. Talvez a falta de proteção pode estar relacionada ao protocolo de tratamento utilizado em nosso estudo (pré-tratamento por 24 h). No estudo de Naime et al, 2021, os tratamentos com os compostos foram realizados 6 horas após a exposição aos indutores de ferroptose Glutamato e BSO, tempo este em que a depleção da GSH já estavam ocorrendo (NAIME et al, 2021). Em relação ao composto RSL-3, o efeito protetor dos derivados do probucol foi observado somente quando realizado um co-tratamento com os compostos, indicando que o tempo de tratamento é um fator importante para verificar um possível efeito protetor.

Uma vez que esses compostos possuem atividade antioxidante direta (NAIME et al, 2021), seu efeito protetor sobre a ferroptose pode envolver uma atividade do tipo *scavenger*, neutralizando ER lipídicas e impedindo a morte celular por ferroptose. Entretanto, em nosso estudo, como os tratamentos foram realizados 24 h antes da exposição à cisplatina, talvez essa atividade antioxidante direta possa ter sido perdida, o que pode ter comprometido o mecanismo de proteção desses compostos.

Outro fator que deve ser levado em consideração é o fato de que em nosso modelo de células HEK 293, a ferroptose possa não ser a principal via de morte celular induzida pela cisplatina. Estudos já demonstraram que a cisplatina induz tanto necrose como apoptose (SANTOS et al., 2012b; TANG et al., 2023). Um estudo recente mostrou que o tratamento com cisplatina, na mesma concentração utilizada no presente estudo (100 μM), foi capaz de induzir morte celular por apoptose após 24 h de exposição ao fármaco em células HEK 293 (WANG et al., 2018). Talvez frete a

outros tipos de morte celular diferentes da ferroptose os compostos derivados do probucol não sejam efetivos em proteger as células.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DE QUELANTES DE FERRO NA CITOTOXIDADE DA CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293

Considerando que os compostos derivados do probucol não foram capazes de proteger as células HEK 293 frente à toxicidade da cisplatina e, aliado a isso, para testar a hipótese de que a ferroptose estaria envolvida no mecanismo de toxicidade da cisplatina em células HEK 293, fomos investigar se o quelante de ferro DFO, que já demonstrou efeito protetor em outros modelos de ferroptose (DIXON et al., 2012), seria capaz de proteger da toxicidade da cisplatina. Além desse quelante, resolvemos utilizar outros três novos compostos como os quelantes SIH, DFP e DCAF.

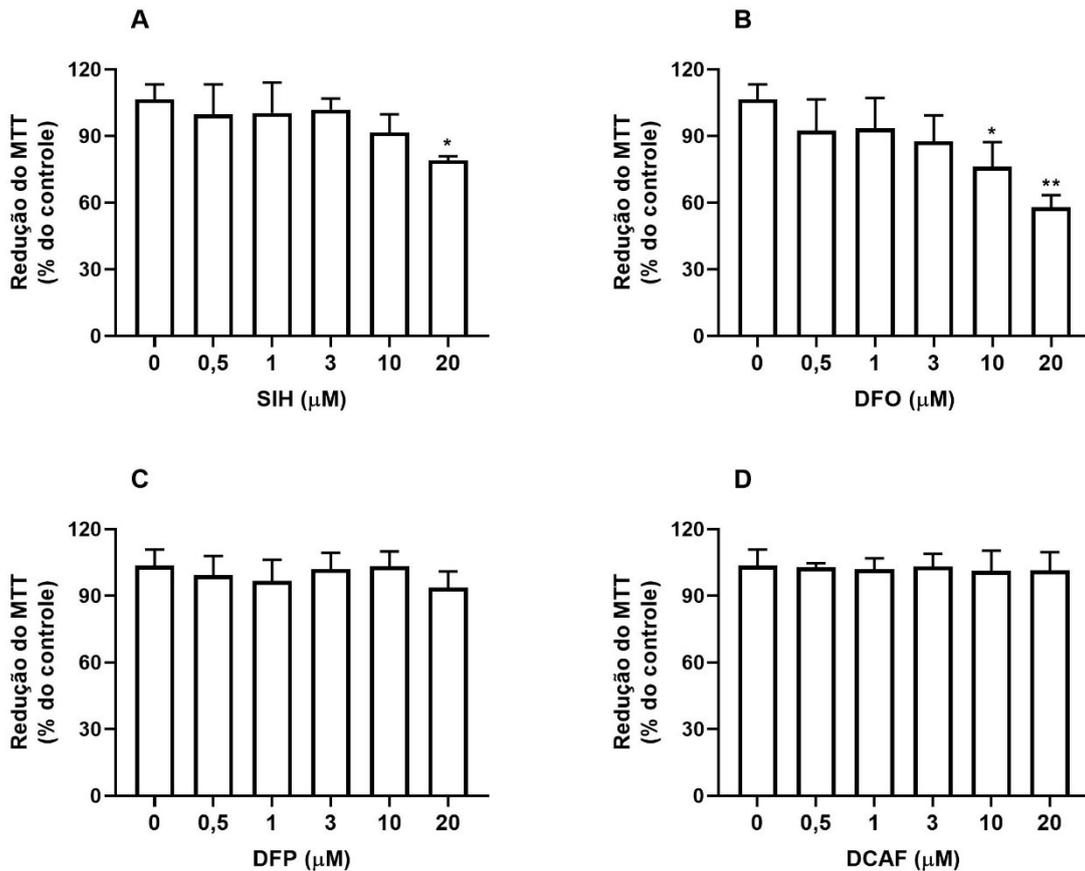
Para isso, primeiramente foram realizados ensaios de toxicidade dos quelantes de ferro nas células HEK 293, para então definir quais concentrações seriam utilizadas nos ensaios de proteção. As células foram tratadas com os quelantes de ferro, em diferentes concentrações, por 48 horas, e, em seguida, foram realizados ensaios para avaliação da viabilidade celular.

O tratamento com o quelante SIH, causou redução significativa na viabilidade celular na concentração de 20 μM ($p < 0,05$; Figura 11A). Já o quelante DFO induziu uma redução na viabilidade das células nas concentrações de 10 e 20 μM ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente; Figura 11B). Por outro lado, não foram observadas alterações significativas na viabilidade das células tratadas com os quelantes DFP e DCAF em nenhuma das concentrações testadas (Figuras 11C e 11D). A partir destes resultados, estabeleceu-se então as concentrações de 0,5 e 3 μM para os quelantes SIH e DFO e as concentrações de 0,5 μM , 3 μM e 10 μM para os quelantes DFP e DCAF, as quais não demonstraram efeitos citotóxicos no ensaio de viabilidade celular, para serem utilizadas nos ensaios posteriores.

Para investigar o possível efeito protetor dos quelantes e ferro, as células foram pré-tratadas com os compostos nas concentrações pré-estabelecidas no experimento anterior durante 24 horas e, posteriormente, expostas à cisplatina 100 μM . O ensaio de viabilidade celular foi realizado após 24 h de exposição à cisplatina. Na figura 12 podemos observar que a cisplatina induziu uma redução significativa na viabilidade

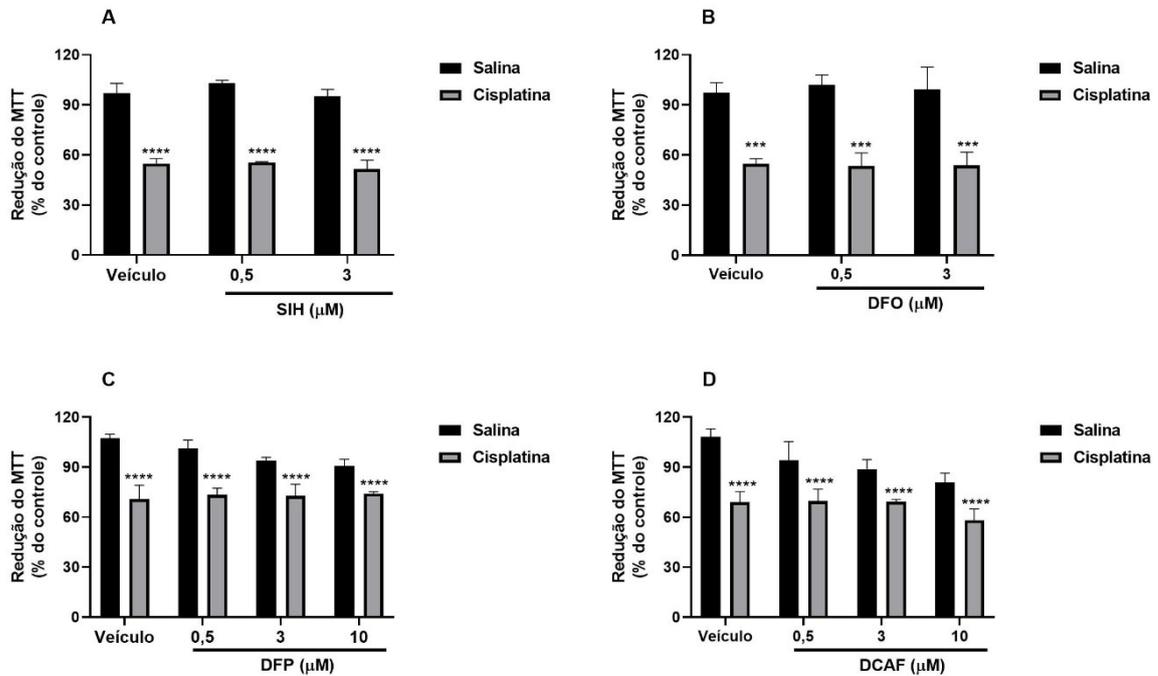
celular ($p < 0,0001$; Figura 12A-D), porém o pré-tratamento com os quelantes, não foi capaz de proteger as células contra o efeito citotóxico induzido pelo fármaco.

Figura 11 - Toxicidade dos compostos quelantes de ferro DFO, DFCAF, SIH e DFP em células HEK 293



Legenda: As células foram expostas ao veículo (DMSO) ou a concentrações crescentes (0,5 - 20 μM) SIH (A), DFO (B), DFP (C) e DFCAF (D). Após 24 horas de exposição o ensaio de viabilidade celular foi realizado. Cada barra representa a média \pm EPM de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ indicam diferença quando comparados ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey).

Figura 12 - Efeito protetor dos quelantes de ferro frente a toxicidade da cisplatina em células HEK 293



Legenda: As células foram tratadas com veículo (DMSO) ou com 0,5 e 3 μM de SIH (A), 0,5 e 3 μM de DFO (B), 0,5, 3 e 10 μM de DFP (C) e 0,5, 3 e 10 μM de DCAF (D) durante 24 horas. Em seguida, as células foram expostas à 100 μM de cisplatina e, após 24 horas, o ensaio de viabilidade celular foi realizado. Cada barra representa a média ± EPM (n = 3). ***p < 0,001 e ****p < 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey).

A DFO é um quelante de ferro que foi aprovado para uso em 1968 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e apresentou efeito inibidor sobre a ferroptose causada pela erastina e RSL3 (DIXON et al, 2012), porém seu uso na clínica tem baixa adesão devido às dificuldades encontradas durante o tratamento. Buscando novos compostos que pudessem demonstrar efeitos similares aos da DFO, porém sem as adversidades, o professor Breno Pannia Espósito em conjunto com seu grupo de pesquisa, desenvolveram um conjunto da molécula de DFO com cafeína chamada de deferoxamina-cafeína (DFCAF) que apresentou as mesmas características antioxidantes da DFO juntamente com maior permeabilidade celular (ALTA et al,

2014). Até o momento não existem estudos comparativos dos efeitos antiferroptóticos entre DFO e DFCAF.

Da mesma forma, a pesquisa por novos quelantes de ferro semelhantes à DFO que evitassem a relutância de seu uso na clínica fez surgir a DFP, atualmente fornecida pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A DFP (1,2-dimetil-3-hidroxi-4-piridona) possui maior capacidade de quelar o ferro intracelular e vem se demonstrando promissor em estudos para o tratamento de doenças neurodegenerativas (CRICHTON et al, 2019).

O SIH (Salícialdeído isonicotinoil hidrazina) é um quelante de ferro experimental altamente lipofílico que penetra as membranas celulares e quela o ferro de forma eficaz, desta forma inativando a produção de espécies reativas dependentes de ferro. Estudos demonstraram que o SIH quando em contato com H_2O_2 protegeu células H9c2 de perda de potencial de membrana e morte celular devido a impedir os danos oxidativos (SIMUNEK et al, 2005). Desta forma o estudo de novos quelantes de ferro que apresentam este perfil de maior lipofilicidade e com estudos que já apresentam efeitos promissores como protetores contra a ferroptose podem ser estratégias de proteção além das convencionais.

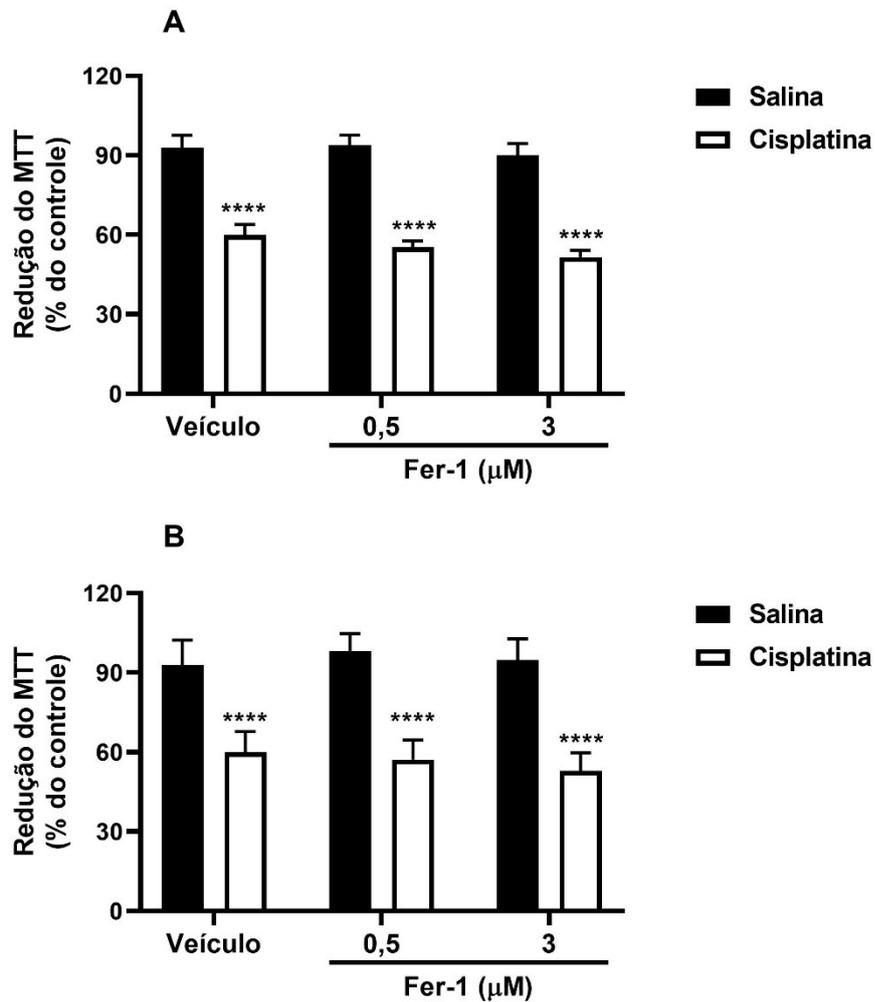
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ANTIFERROPTÓTICO CLÁSSICO FERROSTATINA-1 NA CITOTOXIDADE DA CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293

Como não verificamos nenhum efeito protetor dos derivados do probucol e nem dos quelantes de ferro sobre a toxicidade induzida pela cisplatina nas células HEK 293, resolvemos testar se o agente antiferroptótico clássico Fer-1 era capaz de proteger as células frente à toxicidade do antineoplásico e, desta forma, avaliar se a ferroptose estaria de fato envolvida ou não em nosso modelo.

Para este experimento, as células foram pré-tratadas com Fer-1, nas concentrações de 0,5 e 3 μM , durante 1 ou 24 horas, seguida da exposição à cisplatina por 24 horas. A figura 13 mostra que em nenhum dos protocolos experimentais testados houve um efeito protetor da Fer-1 sobre a diminuição da viabilidade celular induzida pela cisplatina nas células HEK 293 (Figura 13A e 13B). Esses dados indicam que a ferroptose parece não estar envolvida no mecanismo de toxicidade da cisplatina nas células HEK 293, pelo menos nas condições testadas no presente estudo.

Figura 13 - Efeito protetor da Fer-1 frente a toxicidade da cisplatina em células HEK

293.



Legenda: As células foram tratadas com veículo (DMSO) ou com 0,5 e 3 μM de Fer-1 por 1 (A) ou 24 horas (B), seguido da exposição à 100 μM de cisplatina por 24 horas. Em seguida, o ensaio de viabilidade celular foi realizado. Cada barra representa a média ± EPM (n = 4). ****p < 0,0001 indicam diferença quando comparados ao grupo controle (veículo) (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de post hoc Tukey).

Yu e colaboradores demonstraram em seu estudo, em células epiteliais de túbulo proximal (HK2), que quando a cisplatina reduziu a viabilidade celular, o inibidor de ferroptose Fer-1 melhorou significativamente as taxas de sobrevivência celular, sugerindo que a ferroptose é um dos mecanismos que está envolvido na LRA induzida pela cisplatina (YU et al, 2021). Em outro estudo recente, a Fer-1 também demonstrou

efeito protetor frente ao dano renal induzido pela cisplatina em um modelo *in vivo* em camundongos. Neste estudo, o tratamento com Fer-1 foi capaz de reduzir o marcador de peroxidação lipídica 4-HNE no tecido renal dos animais expostos à cisplatina (IKEDA et al., 2021). Em conjunto, esses estudos sugerem que a ferroptose é um dos mecanismos envolvidos na toxicidade da cisplatina. Entretanto, em nosso modelo com células HEK 293 não foi possível verificar o envolvimento desse tipo de morte celular na toxicidade do fármaco.

A falta de proteção da Fer-1 em nosso estudo pode estar relacionada ao próprio modelo utilizado para avaliar a ferroptose. No estudo de Yu e colaboradores, no qual também foi utilizado um modelo *in vitro* com cultivo celular, esses autores utilizaram as células HK2, que são células renais tubulares proximais humanas, um modelo mais adequado para induzir LRA *in vitro*, uma vez que a cisplatina causa lesão tubular especificamente nessa região do néfron (FUJISHIRO et al., 2021). Já as células HEK 293, por sua vez, foram obtidas a partir de células embrionárias de rim humano transfectadas com adenovírus. Existem estudos na literatura que contestam a utilização dessa linhagem celular como modelo de células renais, uma vez que a análise do genoma dessas células mostrou que as mesmas possuem muito mais características de células adrenais do que de células epiteliais renais, indicando que provavelmente um precursor adrenal embrionário possa ser, de fato, a origem dessas células (SHAW et al., 2002; STEPANENKO e DMITRENKO, 2015). Apesar dessas evidências, esta linhagem celular é ainda amplamente utilizada como modelo para estudar nefrotoxicidade e atividade de compostos protetores em diferentes estudos.

Assim, a falta de proteção dos compostos derivados do probucol e dos quelantes de ferro, bem como a não verificação do envolvimento da ferroptose na toxicidade da cisplatina, pode ser devido a uma limitação do modelo de cultivo celular utilizado em nosso estudo. Mais estudos, utilizando os derivados do probucol, poderiam ser realizados em modelos de células tubulares proximais como as células HK2.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que o estresse oxidativo está envolvido no mecanismo de toxicidade da cisplatina em células HEK 293. Além disso, os compostos derivados do probucol, os quelantes de ferro e a ferrostatina-1 não foram efetivos em proteger as células da toxicidade induzida pela cisplatina. E, finalmente, foi possível concluir que a ferroptose parece não estar envolvida no mecanismo de toxicidade da cisplatina em células HEK 293.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas para um possível trabalho futuro no mesmo tema, algumas análises poderão ser realizadas, como destacado abaixo:

(i) Avaliar, nas mesmas condições experimentais utilizadas no presente estudo, se a cisplatina é capaz de induzir outros tipos de morte celular (necrose, apoptose, autofagia).

(ii) Avaliar a peroxidação lipídica após 12 horas de exposição à cisplatina.

(iii) Investigar se o co-tratamento com os compostos derivados do probucol é capaz de proteger da toxicidade da cisplatina.

(iv) Avaliar se os compostos RSL-3 e BSO são capazes de induzir ferroptose nas células HEK 293 e investigar se os derivados do probucol possuem efeito protetor.

(v) Avaliar o efeito protetor (ou antiferroptótico) dos compostos derivados do probucol frente à toxicidade da cisplatina em células tubulares renais HK2.

REFERÊNCIAS

- ALDOSSARY S. A. Review on Pharmacology of Cisplatin: Clinical Use, Toxicity and Mechanism of Resistance of Cisplatin. **Biomed Pharmacol J** 2019;12(1).
- AKCAY, A., TURKMEN, K., LEE, D., EDELSTEIN, C.L. Update on the diagnosis and management of acute kidney injury. **Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.** 3, 129–140. 2010.
- AMARAL E.P., et al. A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis-induced cell death and tissue necrosis. **J Exp Med.** 2019;216(3):556-570. doi:10.1084/jem.20181776;
- BELLOMO R., KELLUM J. A., RONCO C. Acute kidney injury. **Lancet** 2012; 380:756-66.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R., MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3289–3303, 2013.
- BUENO, D.C., et al. New Probucol Analogues Inhibit Ferroptosis, Improve Mitochondrial Parameters, and Induce Glutathione Peroxidase in HT22 Cells. **Mol Neurobiol** 57, 3273–3290 (2020)
- CANÇADO R. D. Iron overload and iron chelation in sickle cell disease. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, 316-326, 2007.
- CASANOVA A. G., et al. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of clinically tested protectants of cisplatin nephrotoxicity. **Eur J Clin Pharmacol**:1–11
- CHEN X, WEI W, LI Y, HUANG J, CI X. Hesperetin relieves cisplatin-induced acute kidney injury by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Chem Biol Interact.** 2019 Aug 1;308:269-278.
- COLLE D., et al. Probucol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. **PLoS One.** 2013a.
- COLLE D., et al., Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. **Mol Neurobiol.** 2016.
- COLLE D., et al. Succinobucol versus probucol: higher efficiency of succinobucol in mitigating 3-NP-induced brain mitochondrial dysfunction and oxidative stress in vitro. **Mitochondrion** 13:125–33. 2013b.
- CONRAD, M., SATO, H. The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system xc⁻: cystine supplier and beyond. **Amino Acids**, v. 42, p. 231–246, 2011.
- CONRAD M, Pratt DA. The chemical basis of ferroptosis. **Nat Chem Biol** 2019; 15:1137-47.;
- DENIZ, G. Y. et al. Antioxidant and anti-apoptotic effects of vitexilactone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 00, n. 00, p.1–8, 2020.
- DIXON, S.J., et al, Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. **Cell**, v. 149, p.1060–1072, 2012.
- ELDUTAR E., KANDEMIR F. M., KUCUKLER S., CAGLAYAN C. A novel automated

method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. **Clin Biochem.** 37:112–119. 2017.

FARINA, M., CAMPOS, F., VENDRELL, I., BERENQUER, J., BARZI, M., PONS, S., SUÑOL, C. Probucol Increases Glutathione Peroxidase-1 Activity and Displays Long-Lasting Protection against Methylmercury Toxicity in Cerebellar Granule Cells. **Toxicological Sciences.** v. 2, p. 416–426, 2009.

FARINA, M., ASCHNER, M. Glutathione antioxidant system and methylmercury-induced neurotoxicity: An intriguing interplay. **BBA - General Subjects** 2019.

FAUBEL, S., et al. Cisplatin-induced acute renal failure is associated with an increase in the cytokines interleukin (IL)-1beta, IL-18, IL-6, and neutrophil infiltration in the kidney. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics,** 322(1), 8–15. 2007.

FLOREA, A. M.; BÜSSELBERG, D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. **Cancers (Basel),** v. 3, n. 1, p. 1351-71, Mar 2011a. ISSN 2072-6694.

FORCINA, G. C., DIXON, S. J. GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis. **Proteomics,** v. 19, p. 1-11, 2019

FUJISHIRO H., TAGUCHI H., HAMA O S, SUMI D, HIMENO S. Comparisons of segment-specific toxicity of platinum-based agents and cadmium using S1, S2, and S3 cells derived from mouse kidney proximal tubules. **Toxicol In Vitro.** 2021 Sep;75:105179.

GILANI S. J., et al. Rosinidin Protects against Cisplatin-Induced Nephrotoxicity via Subsiding Proinflammatory and Oxidative Stress Biomarkers in Rats. **Int J Environ Res Public Health.** 2022 Aug 7;19(15):9719

GUO J, et al. Ferroptosis: a novel anti-tumor action for cisplatin. **Cancer Res Treat** 2018;50(2):445-60.;

HAN, X.; YUE, J.; CHESNEY, R. W. Functional TauT protects against acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol,** v. 20, n. 6, p. 1323-32, Jun 2009.

HERZOG C, et al. VAD-fmk prevents cisplatin induced cleavage of autophagy proteins but impairs autophagic flux and worsens renal function. **Am J Physiol Ren Physiol** 2012; 303:F1239-F1250.

HIGBY, D. J.; WALLACE, H. J.; ALBERT, D. J.; HOLLAND, J. F. Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors. **Cancer,** v. 33, n. 5, p. 1219-5, May 1974. ISSN 0008-543X.

HOLDITCH, S.J. et al. Recent Advances in Models, Mechanisms, Biomarkers, and Interventions in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. **Int. J. Mol. Sci.** 2019, 20, 3011. <https://doi.org/10.3390/ijms20123011>

HU Z, et al. VDR activation attenuates cisplatin induced AKI by inhibiting ferroptosis. **Cell Death Dis** 2020; 11(73):1-11.85.

IKEDAA Y., et al. Role of ferroptosis in cisplatin-induced acute nephrotoxicity in mice. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology,** May 2021. 67(2):126798. DOI:10.1016/j.jtemb.2021.126798

- KAMEYAMA Y., GEMBA M. The iron chelator deferoxamine prevents cisplatin induced lipid peroxidation in rat kidney cortical slices. **Jpn J Pharmacol** 1991; 57(2):259- 62.
- KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat Rev Cancer**. 7:573–584. 2007.
- KLEIN, A. V.; HAMBLEY, T. W. Platinum Drug Distribution in Cancer Cells and Tumors. **Chemical Reviews**, 109(10), 4911–4920. 2009.
- LAUNAY-VACHER V, et al. Prevention of cisplatin nephrotoxicity: state of the art and recommendations from the European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care. **Cancer Chemother Pharmacol** 2008; 61:903-09
- LEBWOHL D, CANETTA R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. **Eur J Cancer** 1998; 34(10):1522-34.
- LEWERENZ, J., ATES, G., METHNER, A., CONRAD, M., MAHER, P., Oxytosis/Ferroptosis—(Re-) Emerging Roles for Oxidative Stress-Dependent Non-apoptotic Cell Death in Diseases of the Central Nervous System. *Frontiers in Neuroscience*, v.12, p. 1 – 23, 2018
- LI, J., et al. Ferroptosis: past, present and future. **Cell Death Dis** 11, 88 (2020).
- MANOHAR S., LEUNG N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. **J Nephrol** 2018; 31:15-25.
- MAPUSKAR, K.A., et al. Persistent increase in mitochondrial superoxide mediates cisplatin-induced chronic kidney disease. **Redox Biol.** 2019, 20, 98–106.
- MILLER, R.P.; TADAGAVADI, R.K.; RAMESH, G.; REEVES, W.B. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. **Toxins** 2010, 2, 2490–2518.
- MIZUNO T, et al. The risk factors of severe acute kidney injury induced by cisplatin. **Oncology**. 85(6):364-9. 2013
- MUNDT, L.A., SHANAHAN K. Exame de Urina e de Fluidos Corporais de Graff. 2a edição. Porto Alegre: Artmed, 2011
- NAIME A. A, et al. Prevention of ferroptosis in acute scenarios: an in vitro study with classic and novel anti-ferroptotic compounds. **Free radical Research**, 2022
<https://doi.org/10.1080/10715762.2021.2017912>
- NAIME, Aline Aita. **Estudo do efeito protetor de compostos derivados do probucol e de quelantes de ferro frente a diferentes indutores de oxitose/ferroptose em células HT22**. Tese (Doutorado) – Curso de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 2022.
- OZKOK A., EDELSTEIN C. L. Pathophysiology of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury. **Bio Med Research International** 2014; ID 967826.
- PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney Int**, v. 73, n. 9, p. 994-1007, May 2008. ISSN 1523-1755.
- PERES LAB, CUNHA JAD. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: mecanismos moleculares. **J Bras Nefrol** 2013; 35(4):332-40.

QUINTANILHA, J. C. F. et al. Involvement of cytochrome P450 in cisplatin treatment: implications for toxicity. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 80, 223–233 (2017). 75.

RIBEIRO, R.P., et al. Probulcol Affords Neuroprotection in a 6-OHDA Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neurochemical Research.* v. 38, p. 660–668, 2013.

ROSENBERG, B., VANCAMP, L., TROSKO, J., MANSOUR, V. Platinum Compounds: A New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature.* 222. (1969) 385-6. 10.1038/222385a0

SAAD S.Y., AL-RIBAKI A. C. Protection effects of taurine supplementation against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Chemotherapy*, 48. 200

SAFAEI, R.; HOWELL, S. B. Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 53(1), 13–23. 2005.

SANTOS D. B., et al. Succinobucol, a non-statin hypocholesterolemic drug, prevents premotor symptoms and nigrostriatal neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 2017; 54:1513-30.

SANTOS, D. B., et al. Probulcol, a lipidlowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. *Experimental Neurology.* v. 233, p. 767-775, 2012a.

SANTOS, N., MARTINS, N., SANTOS, A. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update. *Archives of Toxicology.* 86. 1233-1250, 2012b.

SANTOS, D. B., et al. Probulcol Protects Neuronal Cells Against Peroxide-Induced Damage and Directly Activates Glutathione Peroxidase-1. *Molecular Neurobiology*, 2020.

SHAW G, MORSE S, ARARAT M, GRAHAM FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* 2002 Jun;16(8):869-71.

SKOUTA, R., et al., Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. *J Am Chem Soc*, v .136, p.4551–4556, 2014

STEPANENKO A. A., DMITRENKO V. V. HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene.* 2015 Sep 15;569(2):182-90.

STOCWELL, B. R., et al. Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, v. 171, p. 273–285, 2017.

TOWNSEND D.M., et al. Metabolism of Cisplatin to a Nephrotoxin in Proximal Tubule Cells *J Am Soc Nephrol* 14: 1–10, 2003

TANG C., LIVINGSTON M. J., SAFIRSTEIN R., DONG Z. Cisplatin nephrotoxicity: new insights and therapeutic implications. *Nat Rev Nephrol.* 2023 Jan;19(1):53-7

TANG, J., et al Blockade of histone deacetylase 6 protects against cisplatin-induced acute kidney injury. *Clin. Sci.* 2018, 132, 339–359

TANG S, XIAO X. Ferroptosis and kidney disease. *Int Urol Nephrol* 2020; 52:497-03

TARDIF J.C., GREGOIRE J., L'ALLIER P. L.; et al. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. **Am J Cardiovasc Drugs**, 2(5): 323-34, 2002.

TRISTAO V. R, et al. Nec-1 protects against nonapoptotic cell death in cisplatin induced kidney injury. **Ren Fail** 2012; 34:373-77.

VOLAREVIC V, et al. Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: a balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity. **J Biomed Sci** 2019; 26(1):25.

XU Y., et al. A role for tubular necroptosis in cisplatin-induced AKI. **J Am Soc Nephrol** 2015; 26:2647-58.

YANG W.S., STOCKWELL B.R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. **Trends Cell Biol**, v. 26, p. 165-176, 2016.

YAN, H. F., et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases. **Sig Transduct Target Ther** 6, 49 (2021).

YU M., et al. Downregulation of Cx43 reduces cisplatin-induced acute renal injury by inhibiting ferroptosis **Food and Chemical Toxicology** 158 (2021) 112672

WALY M. I., et al. Effect of curcumin on cisplatin- and oxaliplatin-induced oxidative stress in human embryonic kidney (HEK) 293 cells. **Ren Fail**. 2011; 33(5):518-23.

WANG S. W., et al. Astilbin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through reducing oxidative stress and inflammation. **Food Chem Toxicol**. 2018 Apr;114:227-236.

WEIJL NI, et al. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Eur J Cancer**. 40(11):1713–1723(2004)

WU, Y.J.; MULDOON, L. L.; NEUWELT, E. A. The chemoprotective agent N acetylcysteine blocks cisplatin-induced apoptosis through caspase signaling pathway. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 312. 2005.