UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da interferência do efeito antioxidante do carvedilol, um
potencial agente nefroprotetor, na atividade antitumoral da
cisplatina**

Maria Augusta Carvalho Rodrigues

Ribeirão Preto

2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da interferência do efeito antioxidante do carvedilol, um
potencial agente nefroprotetor, na atividade antitumoral da
cisplatina**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Maria Augusta Carvalho Rodrigues

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos
Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Glenda Gobe

Ribeirão Preto

2013

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

Carvalho Rodrigues, Maria Augusta

Avaliação da interferência do efeito antioxidante do carvedilol, um potencial agente nefroprotetor, na atividade antitumoral da cisplatina. Ribeirão Preto, 2013.

97p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Santos, Antonio Cardozo dos.

1. Carvedilol. 2. Cisplatina. 3. Nefroproteção 4. Antioxidante.
5. Estresse oxidativo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Augusta Carvalho Rodrigues

Avaliação da interferência do efeito antioxidante do carvedilol, um potencial agente nefroprotetor, na atividade antitumoral da cisplatina

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, à minha família e aos anjos (amigos) que têm passado pelo meu caminho.

A Deus, por nunca me deixar perder a fé e por me dar muito mais do que mereço, mais até do que tenho coragem de pedir.

Em especial aos meus pais, Cícero e Leila, sempre tão incentivadores, que nunca hesitaram em abrir mão dos próprios sonhos para realizar os das filhas. À minha irmã, Bárbara, que me fez descobrir uma grande amiga dormindo na cama ao lado durante os últimos anos (“Porque nós somos melhores juntas”).

A toda a minha família: grande, mineira, unida e barulhenta. Composta por tios e tias que são pais e mães, e também por primos e primas que são irmãos e irmãs; de onde eu sempre volto uma pessoa melhor, talvez por sempre encontrar café quente e abraço apertado.

Aos amigos queridos, de todos os cantos e de todas as fases da minha vida (“including my Aussie mates”), por serem tão presentes e por fazerem os dias mais suaves.

AGRADECIMENTOS

Não seria possível a conclusão deste trabalho, tão importante para minha formação pessoal e profissional, sem a ajuda direta de muitos colaboradores. Desta forma, deixo meu **“Muito obrigada”**:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos, exemplo de pessoa e profissional. Por ter me aberto as portas do laboratório e confiado no meu trabalho;

À nossa equipe toxicoDINÂMICA: Neife, pela pronta ajuda sempre e pelas correções nos relatórios e artigos; Nádia, Danilo, Ana Carolina e Roberto, companheiros que levarei sempre comigo; Márcia, por dividir não só animais, madrugadas e tubos de ensaio, mas também a amizade; aos novatos não menos importantes, Guilherme e Laís; já sinto falta de todos;

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Glenda Gobé, por me receber tão bem em sua casa e em seu laboratório e por me fazer sentir em casa, mesmo do outro lado do mundo;

À toda equipe do Centre for Kidney Disease Research (CKDR): Nigel, Miko, David V., David S., Vishal, Ashley, Kanyarat; e do Queensland Institute of Medical Research (QIMR): Clay, Sang-Hee, Doug, Glynn, Rita, por me ajudarem e ensinarem tanto e de forma tão carinhosa;

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo e ao Robson, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), por ceder gentilmente as células S-180;

Ao Prof. Dr. Niels Câmara, do ICB-USP, por ceder gentilmente as células HK-2;

Ao Prof. Dr. Sérgio Britto e aos funcionários do laboratório de patologia da FMRP, por gentilmente emblocarem meus tecidos em parafina;

À Prof^a. Dr^a. Lusânia Greggí Antunes e seu aluno Alexandre pela colaboração no ensaio do micronúcleo e na discussão dos resultados;

Ao Prof. Dr. Fernando Barbosa pela colaboração na dosagem da platina;

Ao Prof. Dr. Oswaldo Baffa e Prof^a. Dr^a. Angela Kinoshita, da Física Médica, pela ajuda nos ensaios de RPE;

Aos professores e técnicos dos laboratórios de Toxicologia e Bioquímica da FCFRP, a quem eu recorria com frequência;

À Prof^a. Dr. Yara Lucisano Valim, minha supervisora no PAE, que a cada dia me deixava mais encantada com a missão de ser docente;

Aos “meninos do biotério”: Reinaldo, Ronaldo, Ramon, Antonio. A ajuda de vocês foi imprescindível;

Aos funcionários da Pós-Graduação: em especial Rosana, Ana e Rose;

Às agências de fomento Capes e Fapesp pelas bolsas de estudo e apoio ao projeto de pesquisa.

“Nothing in the world can take the place of **persistence**. Talent will not; nothing is more common than unsuccessful men with talent. Genius will not; unrewarded genius is almost a proverb. Education will not; the world is full of educated derelicts. Persistence and determination alone are omnipotent.”

Calvin Coolidge

RESUMO

CARVALHO RODRIGUES, M. A. **Avaliação da interferência do efeito antioxidante do carvedilol, um potencial agente nefroprotetor, na atividade antitumoral da cisplatina.** 2013. 97f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

A cisplatina é um dos mais efetivos agentes antitumorais, porém seu uso clínico é limitado principalmente pela nefrotoxicidade. A terapia adjuvante com antioxidantes tem sido sugerida como estratégia de proteção contra a toxicidade induzida pela cisplatina nos tecidos saudáveis, e a eficácia de diferentes antioxidantes tem sido demonstrada em diversos modelos experimentais. Entretanto, a maioria dos compostos descritos como citoprotetores não foi ainda avaliada em modelos experimentais portadores de tumores e não há um consenso sobre o impacto da terapia antioxidante na atividade antitumoral da cisplatina. Além disso, há poucos dados sobre o efeito de muitos destes citoprotetores sobre a saúde humana, sendo que alguns podem apresentar atividade pró-oxidante sob determinadas condições. Nossos estudos anteriores demonstraram que o beta-bloqueador carvedilol protege eficazmente contra a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em ratos. No presente estudo foram explorados dois novos aspectos da proteção exercida pelo carvedilol: (a) o efeito da carvedilol na atividade antitumoral da cisplatina e (b) os mecanismos moleculares de proteção. O primeiro aspecto foi avaliado *in vivo* em camundongos portadores de Sarcoma 180. Neste modelo, quatro grupos (n=8) de camundongos Swiss, machos adultos, inoculados com uma suspensão de células de Sarcoma 180 (via subcutânea) foram submetidos aos seguintes tratamentos: (I) Grupo Controle: carboximetilcelulose 0,5% (0,10mL/ animal 30g, via oral ou v.o, 1 vez ao dia, por 3 dias) e solução salina (0,75mL/animal 30g, intraperitoneal ou i.p. no primeiro dia) ; (II) Grupo Cisplatina (Cisp): cisplatina (25 mg/kg, i.p., no primeiro dia); (III) Grupo Carvedilol+Cisplatina (CV+Cisp): carvedilol (10 mg/kg, v.o, 1 vez ao dia, por 3 dias) e cisplatina (25 mg/Kg, i.p., no primeiro dia); e (IV) Grupo Carvedilol (CV): carvedilol (10 mg/kg, v.o., 1 vez ao dia, por 3 dias). A função renal (uréia e creatinina plasmáticas), e a análise histopatológica do tecido renal comprovaram o dano renal induzido pela cisplatina e a nefroproteção exercida pelo carvedilol. A biodistribuição da platina (ICP-MS) e a atividade antitumoral da cisplatina (índice de remissão tumoral e curva de sobrevivência) não foram alteradas pelo carvedilol. O carvedilol não protegeu contra a mutagenicidade (avaliada em sangue periférico) e contra a mielossupressão induzidas pela cisplatina. O ensaio de TUNEL e análise imuno-histoquímica da caspase-3 clivada e da proteína pró-apoptótica Bax comprovaram a proteção do carvedilol contra a apoptose que foi induzida pela cisplatina no tecido renal, porém a proteína anti-apoptótica Bcl-x_L permaneceu inalterada nos quatro grupos. O envolvimento da atividade antioxidante do carvedilol no mecanismo de proteção foi demonstrado pelos ensaios de peroxidação lipídica e GSH no tecido renal. Os estudos mecanísticos foram realizados em modelo *in vitro* com células HK-2 (de rim humano normal) divididas em quatro grupos de tratamento: (I) Controle: salina tamponada com fosfato (PBS); (II) Cisp: 25µM de cisplatina; (III) CV+Cisp: 50µM de carvedilol e 25 µM de cisplatina; (IV) CV: 50 µM de carvedilol. Foi observada diminuição da morte celular por apoptose e da expressão das proteínas caspase-3, pro-caspase-9 e Bax no grupo CV+Cisp quando comparado ao grupo Cisp. Assim como nos estudos *in vivo*, não houve alteração na expressão da

proteína Bcl-x_L. A atividade da proteína SIRT-1 apresentou-se aumentada no grupo CV+Cisp e inalterada nos demais. Adicionalmente, o mecanismo antioxidante do carvedilol foi associado ao sequestro dos íons ferrosos, mas não ao sequestro de radicais livres. Em conclusão, a atividade nefroprotetora do carvedilol está associada a mecanismos antioxidantes provavelmente decorrentes do sequestro de íons ferrosos. O mecanismo nefroprotetor do carvedilol não diminui a atividade antitumoral da cisplatina, o que sugere que mecanismos distintos sejam responsáveis pela nefrotoxicidade e pela atividade antitumoral da cisplatina. Ainda, o estresse oxidativo parece desempenhar papel central na nefrotoxicidade, o que não acontece na atividade antitumoral, que tem sido associada principalmente a danos ao DNA nuclear. Estes resultados sugerem que a terapia antioxidante pode ser uma alternativa segura na proteção dos tecidos saudáveis durante a quimioterapia com cisplatina.

Palavras Chave: carvedilol, cisplatina, nefroproteção, antioxidante, estresse oxidativo, sarcoma 180

ABSTRACT

CARVALHO RODRIGUES, M. A. **Evaluation of the interference of the antioxidant effect of carvedilol, a potential nephroprotector, in the antitumor activity of cisplatin.** 2013. 97f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Cisplatin is one of the most effective anticancer agents; however, its clinical use is limited mainly by its nephrotoxicity. The adjuvant therapy with antioxidants has been suggested as a strategy of protection against the toxicity induced by cisplatin in healthy tissues and the efficacy of different antioxidants has been demonstrated in several experimental models. However, most of these compounds described as cytoprotectors have never been tested in tumor-bearing models, and there is not a consensus on the impact of the antioxidant therapy on the antitumor activity of cisplatin. Moreover, there are few data about the effect of many of these compounds on human health; some can even display pro-oxidant activity under certain conditions. Our previous studies have demonstrated that the beta-blocker carvedilol efficiently protects against the nephrotoxicity induced by cisplatin in rats. In the present study two new aspects of the protection of carvedilol were explored: (a) the effect of carvedilol on the antitumoral effect of cisplatin and (b) the molecular mechanisms of protection. The first aspect was evaluated *in vivo* in Sarcoma-180-tumor-bearing mice. In this model, four groups groups (n=8) of Swiss, adult mice, inoculated with Sarcoma-180 cells (subcutaneous via) were treated as follows: (I) Control group: carboxymethylcellulose 0.5% (0.10mL/ 30g animal, oral, once a day, 3 days) and saline solution (0.75mL/30g animal, intraperitoneal or ip, on the first day); (II) Cisplatin group (Cisp): cisplatin 25mg/kg, i.p., on the first day; (III) Carvedilol + Cisplatin group (CV+Cisp): carvedilol (10mg/kg, oral, once a day, 3 days) and cisplatin (25 mg/kg, i.p., on the first day); (IV) Carvedilol group (CV): carvedilol (10mg/kg, oral, once a day, 3 days). The renal function (plasmatic BUN and creatinine) and the renal histopathology, showed the renal damage induced by cisplatin and the nephroprotection of carvedilol. The biodistribution of platinum (ICP-MS) and the antitumor activity of cisplatin (tumor remission index and survival curve) were not altered by carvedilol. Carvedilol did not protect against the mutagenicity (evaluated in the peripheral blood) and the bone marrow suppression induced by cisplatin. TUNEL assay and the imunohistochemical analyses of the cleaved caspase-3 and the proapoptotic protein Bax showed the protection of carvedilol against the apoptosis induced by cisplatin in the renal tissue; however, the anti-apoptotic protein Bcl-xL remained unaltered in the four groups. The involvement of the antioxidant activity of carvedilol in the protective mechanism was demonstrated by lipid peroxidation and GSH assays in the renal tissue. The mechanistic studies were performed *in vitro* in HK-2 cells (from normal human kidney) divided into four groups of treatment: (I) Control: phosphate buffered saline (PBS); (II) Cisp: 25µM cisplatin; (III) CV+Cisp: 50µM carvedilol and 25 µM cisplatin; and (IV) CV: 50 µM carvedilol. Reduced cell death by apoptosis and reduced expression of caspase-3, pro- caspase-9 and Bax were observed in CV+Cisp as compared to Cisp. Similarly to the *in vivo* studies, no alterations in the expression of Bcl-xL were observed. The activity of SIRT-1 was increased in the group CV+Cisp, but was unaltered in all the other groups. Additionally, the antioxidant mechanism of carvedilol was associated with the scavenging of ferrous ions but not with the scavenging of free radicals. In conclusion, the nephroprotective activity of carvedilol is associated with antioxidant

mechanisms which probably results from the scavenging of ferrous ions. The nephroprotective mechanism of carvedilol does not reduce the antitumor activity of cisplatin, which suggests that distinct mechanisms are responsible for the nephrotoxicity and the antitumor activity of cisplatin. Moreover, the oxidative stress might play a central role in the nephrotoxicity, but this does not happen in the antitumor activity, which has been associated mainly with nuclear DNA damage. These findings suggest that the antioxidant therapy might be a safe alternative to protect healthy tissues during cisplatin chemotherapy.

Keywords: carvedilol, cisplatin, nephroprotection, antioxidant, oxidative stress, sarcoma 180

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de ação da cisplatina..	4
Figura 2: Estrutura química do carvedilol. Grupos da molécula responsáveis pelas atividades antiadrenérgica e antioxidante do fármaco.	6
Figura 3: Concentração plasmática de creatinina em camundongos portadores de S-180.	34
Figura 4: Concentração plasmática de uréia em camundongos portadores de S-180..	35
Figura 5: Morfologia renal após coloração H&E. (A) Fotomicrografias (x200) e (B) Porcentagem de túbulos renais danificados.....	36
Figura 6: Concentração de MDA no homogenato renal de camundongos portadores de S-180.....	37
Figura 7: Concentração de GSH no homogenato renal de camundongos portadores de S-180.....	38
Figura 8: Avaliação de apoptose in situ através do ensaio de TUNEL. (A) Fotomicrografias (x200) e (B) quantificação de pixels positivos correspondentes à marcação de apoptose.	39
Figura 9: Imuno-histoquímica para caspase-3 clivada. (A) Fotomicrografias (x200) e (B) Quantificação de pixels positivos correspondentes à presença de caspase-3 clivada no tecido.....	41
Figura 10: Imuno-histoquímica para Bax. (A) Fotomicrografias (x200) e (B) Quantificação de pixels positivos correspondentes à presença de Bax no tecido.....	42
Figura 11: Imuno-histoquímica para Bcl-xL (A) Fotomicrografias (x200) e (B) Quantificação de pixels positivos correspondentes à presença de Bcl-xL no tecido..	43

Figura 12: Concentração de platina no homogenato renal de camundongos portadores de S-180.....	45
Figura 13: Concentração de platina na massa tumoral de camundongos portadores de S-180.....	45
Figura 14: Massa tumoral dos camundongos portadores de S-180 após 3 dias de tratamento	47
Figura 15: Curvas de sobrevida dos quatro grupos de tratamento.....	48
Figura 16: Teste de Micronúcleo. (A) Fotomicrografias de eritrócitos policromáticos (setas amarelas) e eritrócitos policromáticos micronucleados (asteriscos) sob microscopia de fluorescência (x1000) e (B) Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) por 1000 eritrócitos policromáticos (PCE).....	49
Figura 17: Fotomicrografia de esfregaço de sangue periférico após 72 horas de tratamento; corado com laranja de acridina e analisado sob microscopia de fluorescência (x1000). Eritrócitos policromáticos - PCE (setas amarelas).	50
Figura 18: (A) Eritrócitos policromáticos (setas azuis) e eritrócitos normocromáticos (setas vermelhas) avaliados em esfregaço de medula óssea corada com Giemsa, sob microscopia óptica (x1000) (B) Relação PCE/NCE após 72 horas de tratamento	51
Figura 19: Efeito da cisplatina e do carvedilol na indução da apoptose em células HK-2 analisada por H&E	52
Figura 20: Viabilidade celular determinada através da coloração com azul de Trypan	53
Figura 21: Determinação da apoptose baseada na análise da morfologia após coloração HE.....	54

Figura 22: Porcentagem de células apoptóticas após coloração com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo.....	55
Figura 23: Histograma obtido pelo citômetro de fluxo com indicação da região (P2) utilizado utilizada para quantificação das células apoptóticas.....	55
Figura 24: Avaliação da caspase-3 em células HK-2 por Western-blotting.....	57
Figura 25: Avaliação da caspase-9 em células HK-2 por Western-blotting.....	58
Figura 26: Avaliação da proteína Bax em células HK-2 por Western-blotting.	59
Figura 27: Avaliação da proteína Bcl-xL em células HK-2 por Western-blotting	60
Figura 28: Avaliação da proteína SIRT-1 em células HK-2 por Western-blotting.....	61
Figura 29: Espectro da ressonância paramagnética de elétrons (RPE) para o radical livre DPPH (500µM), na presença de veículo (DMSO), de carvedilol 5µM e carvedilol 5mM	62
Figura 30: Espectro da ressonância paramagnética de elétrons (RPE) para o radical livre TEMPOL (100µM) na presença de veículo (DMSO), de carvedilol 5µM e de carvedilol 5mM	63
Figura 31: Relação entre a concentração de íon ferroso e concentração de carvedilol (0, 50, 75, 100, 150 e 200µM) após reação com batofenantrolina e análise espectrofotométrica.....	64
Figura 32: Reações de Haber-Weiss (reações 1 e 2) e reação de Fenton (reação 3).	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedimento para determinação de creatinina em plasma.....	15
Tabela 2: Procedimento para determinação de uréia em plasma.	16
Tabela 3: Procedimento para determinação de proteínas na amostra.	17
Tabela 4: Detalhamento dos anticorpos primários e diluições dos anticorpos primários e secundário utilizados nos ensaio de Western-blotting	28
Tabela 5: Quadro Geral dos resultados obtidos no modelo in vivo nos quatro grupos de tratamento (Controle, Cisp, CV+Cisp e CV).	32
Tabela 6: Quadro Geral dos resultados obtidos no modelo in vitro nos quatro grupos (Controle, Cisp, CV+Cisp e CV)	33
Tabela 7: Taxa de remissão do tumor dos grupos de animais tratados em relação ao grupo Controle.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs. – absorbância

Apaf-1 – fator protease ativador da apoptose - 1

BHT – hidroxil tolueno butilado

BSA – albumina bovina sérica

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Cisp – cisplatina

CV – carvedilol

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DMSO – dimetilsulfóxido

DMEM – Dulbeccos Modified Eagle Medium (meio de cultura para cultivo de células)

DMTU – dimetiltiouréia

DNA – ácido desoxiribonucleico

DPPH – diphenyl-picrylhydrazyl

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

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

RPE – ressonância paramagnética eletrônica

FDA – American Food and Drug Administration

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GSH – glutathione reduzida

GSSG – glutathione oxidada

HE – Hematoxilina e eosina

HK-2 – human kidney-2

HRP – Horseradish Peroxidase

ICP-MS – espectrometria de massa acoplada a plasma

IDN – Índice de Divisão Nuclear

i.p. – intraperitoneal

MDA – malondialdeído

MN – micronúcleo

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

NCE – eritrócitos normocromáticos

nm – nanômetro

OCT-2 – Organic Cation Transporter 2 ou transportador de cátions orgânicos-2

PBS – salina tamponada com fostato

PBS/T – PBS acrescentado de Tween 20 0,05%

PCE – eritrócitos policromáticos

pH – potencial hidrogênioônico

PKC δ – proteína quinase C gama

Ppc – Positive Pixel Count

RNA – ácido ribonucleico

S-180 – Sarcoma 180

SDS/PAGE – dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida para eletroforese

SFB - Soro Fetal Bovino

TBA – ácido tiobarbitúrico

TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TdT – terminal deoxynucleotidyl transferase

TEMPOL – 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxy

TMAH – hidróxido de tetrametilamônio

TMOP – 1,1,3,3-tetrametoxipropano

TUNEL – Terminal deoxytidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling

v.o. – via oral

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract.....	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de abreviaturas e Siglas	ix
I – INTRODUÇÃO	1
Importância clínica da cisplatina.....	2
Farmacocinética e farmacodinâmica da cisplatina	2
Toxicidade renal induzida pela cisplatina	4
O papel dos antioxidantes	5
Carvedilol	6
Modelos tumorais em camundongos (Sarcoma 180)	7
Medidas de citoproteção empregadas atualmente	8
II – OBJETIVOS	10
III- MATERIAIS E MÉTODOS	12
1- Reagentes.....	13
2- Células tumorais (S-180).....	13
3- Animais	14
4- Tratamento dos animais.....	11
5- Avaliação da função renal	14
5.1- Creatinina plasmática.....	14
5.2- Uréia plasmática.....	15
5.3- Histopatologia renal – Coloração com hematoxilina-eosina (HE)	16
6 - Avaliação da nefrotoxicidade	16
6.1- Determinação de proteína no homogenato renal	16
6.2- Marcadores de estresse oxidativo.....	17
6.2.1- Lipoperoxidação.....	17
6.2.2- Glutathione reduzida (GSH)	18
7- Marcadores das vias de morte celular.....	18

7.1- Ensaio de TUNEL.....	18
7.2- Ensaio imuno-histoquímicos.....	19
7.2.1- Determinação imuno-histoquímica da caspase-3	20
7.2.2- Determinação imuno-histoquímica da Bax.....	20
7.2.3- Determinação imuno-histoquímica da Bcl-x _L	21
8- Influência do carvedilol na atividade antitumoral da cisplatina	22
8.1- Determinação da platina	22
8.2- Avaliação do desenvolvimento do tumor	23
8.2.1- Peso do tumor	23
8.2.2- Avaliação da taxa de remissão do tumor	23
8.3- Sobrevida dos animais	23
9- Influência do carvedilol na mutagenicidade induzida pela cisplatina	23
9.1- Teste do micronúcleo em sangue periférico.....	23
9.2- Determinação da taxa de eritrócitos policromáticos em medula óssea (relação PCE/NCE)	24
10- Ensaio <i>in vitro</i>	24
10.1- Viabilidade celular	25
10.2- Análise de apoptose após coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)	25
10.3- Determinação de apoptose por citometria de fluxo	26
10.4- Detecção de proteínas da via apoptótica por Western-blotting	27
11- Mecanismo de ação antioxidante do carvedilol.....	29
11.1- Avaliação da atividade antioxidante do carvedilol por de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	29
11.2- Capacidade de quelar íons ferrosos (Fe ²⁺)	29
V – RESULTADOS	30
Resultados <i>in vivo</i>	34
1- Avaliação da função e da morfologia renal	34
1.1- Creatinina e ureia plasmáticas	34
1.2- Morfologia renal – coloração com hematoxilina e eosina (HE)	35
2- Marcadores de estresse oxidativo – MDA e GSH	37
3- Avaliação da morte celular por apoptose e suas vias	38
3.1- Ensaio de TUNEL.....	38
3.2- Ensaio imuno-histoquímicos – Caspase-3, Bax e Bcl-x _L	40

4- Influência do carvedilol na atividade antitumoral da cisplatina	44
4.1- Determinação da platina – córtex renal e tumor	44
4.2- Avaliação do desenvolvimento do tumor: massa tumoral e taxa de remissão do tumor	46
4.3- Sobrevida dos animais	46
4.4- Avaliação da mutagenicidade induzida pela cisplatina – Micronúcleo e Determinação da taxa de reirócitos policromáticos em medula óssea (relação PCE/NCE)	48
Resultados <i>in vitro</i>	52
1- Determinação da concentração de cisplatina e carvedilol para os ensaios com as células HK-2	52
2- Viabilidade celular	53
3- Avaliação da apoptose	53
3.1- Coloração com hematoxilina e eosina - HE	53
3.2- Citometria de Fluxo (FACS)	54
4- Avaliação de Caspase-3, Caspase-9, Bax, Bcl-x _L e SIRT-1 por Western-blotting	55
4.1- Avaliação da caspase-3	56
4.2- Avaliação da caspase-9	58
4.3- Avaliação da Bax	59
4.4- Avaliação da Bcl-x _L	60
4.5- Avaliação da SIRT-1	61
5- Mecanismo antioxidante do carvedilol	62
5.1.- Ressonância Paramagnética Nuclear (RPE)	62
5.2- Capacidade de quelar íons ferrosos	63
VI – DISCUSSÃO	65
VII – CONCLUSÕES	79
VIII – REFERÊNCIAS	81
ANEXO	96

INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

Importância Clínica da Cisplatina

Apesar dos avanços do conhecimento em relação aos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer e dos novos alvos terapêuticos propostos, nenhum outro agente antineoplásico representou um avanço clínico tão significativo como a cisplatina representou na década de 70. A sua atividade antitumoral foi descoberta acidentalmente por Barnett Rosenberg em estudo que avaliava o efeito do campo magnético gerado por eletrodos de platina na divisão de *E. coli*. Ele observou que a divisão celular era inibida, promovendo um crescimento filamentosos, efeito atribuído a produtos resultantes da eletrólise posteriormente identificados como compostos de platina. Com base nestas observações, Rosenberg e colaboradores investigaram a atividade da cisplatina em modelos animais de camundongos portadores de leucemia L1210 e Sarcoma-180, nos quais a cisplatina mostrou-se um potente agente antitumoral (DOS SANTOS et al., 2012; ROSENBERG, 1978; ROSENBERG et al., 1969).

O uso clínico da cisplatina foi aprovado pelo FDA (*"American Food and Drug Administration"*) em dezembro de 1978. Desde então, a cisplatina tem sido amplamente utilizada para o tratamento de uma variedade de tumores sólidos, bem como hematológicos (PABLA;DONG, 2008; SHERMANN;LIPPARD, 1987). O uso clínico da cisplatina revolucionou o tratamento do câncer de testículos, elevando o percentual de cura de 20 para 95% (WANG, D.;LIPPARD, 2005). Ela também é comumente empregada no tratamento do câncer de ovário e de bexiga, sendo ainda um componente importante na quimioterapia empregada contra câncer de pulmão, cabeça e pescoço, pâncreas, mama, endométrio e esôfago (em conjunto com radioterapia), além de câncer cervical avançado, osteosarcomas e melanomas metastáticos, dentre outros. É ainda utilizada nos casos de tumores sólidos que não responderam ao tratamento padrão empregado. O seu efeito terapêutico poderia ser significativamente aumentado com o escalonamento da dose, porém a terapia com altas doses é limitada principalmente pela nefrotoxicidade (CVITKOVIC, 1998; HANIGAN;DEVARAJAN, 2003).

Farmacocinética e Farmacodinâmica da cisplatina

Estudos iniciais indicavam que a cisplatina entraria nas células principalmente por difusão, porém estudos posteriores sugeriram a participação de sistemas de

transporte ativo tais como: transportador de cobre Ctr1 (ISHIDA et al., 2002) e transportador de cátion orgânico OCT2 (*“organic cation transporter-2”*) (CIARIMBOLI et al., 2010; CIARIMBOLI et al., 2005; KRONING; LICHTEINSTEIN; NAGAMI, 2000).

Uma vez na corrente circulatória, a cisplatina liga-se às proteínas plasmáticas numa proporção de 80 a 88%. Sua meia vida plasmática é longa, aproximadamente 10 dias, sendo que a platina acumula-se progressivamente no plasma. A excreção cisplatina é predominantemente renal e envolve processos de reabsorção e secreção (BOISDRON-CELLE et al., 2001).

A cisplatina é um fármaco de configuração plana, possuindo um átomo central de platina envolto por dois átomos de cloro e dois grupos amônia. A concentração de íons cloreto no sangue e no meio intracelular modula a reatividade da cisplatina *in vivo*. Sabe-se que o fármaco administrado por injeção intravenosa é ativado durante a passagem pelas membranas celulares (ROSENBERG, 1985). Devido à baixa concentração intracelular de íons cloreto (aproximadamente 145 mM no meio extracelular e 3 mM no meio intracelular), quando no interior da célula, os íons cloreto da molécula de cisplatina se dissociam da platina, sendo substituídos por grupos hidroxila (COHEN; LIPPARD, 2001; KARTALOU; ESSIGMANN, 2001). Esta hidrólise intracelular da cisplatina leva à formação de dois metabólitos altamente reativos, carregados positivamente: monoclouro-monoaqua-diamino-platina e diaqua-diamino-platina, por substituição de um ou dois íons cloreto, respectivamente. Estes metabólitos reagem facilmente com o DNA nuclear, formando ligações covalentes, principalmente nas posições N7 de bases púricas, resultando em ligações cruzadas nas posições 1,2 e 1,3 de uma mesma fita do DNA. Tais ligações geram distorções na dupla hélice do DNA e impedem sua replicação e transcrição (COHEN; LIPPARD, 2001; EASTMAN, 1999; HALABE; WONG; SUTTON, 1991; LIPPARD, 1987; SCHENELLMANN, 2001; SHERMANN; LIPPARD, 1987; WANG, D.; LIPPARD, 2005; ZWELLING; KOHN, 1979). Esse tem sido o principal mecanismo associado ao efeito antineoplásico da cisplatina (Figura 1).

A especificidade da cisplatina em relação à determinada fase do ciclo celular parece variar entre os diferentes de células, porém os efeitos relativos à ligação cruzada são mais pronunciados durante a fase S (KADIKOYLU et al., 2004).

Figura 1: Mecanismo de ação da cisplatina. Os íons cloreto da molécula são substituídos por hidroxila e ocorre a formação de ligações cruzadas com a fita do DNA, impedindo a replicação e a transcrição e culminando na morte celular (KARTALOU;ESSIGMANN, 2001).

Toxicidade renal induzida pela cisplatina

Apesar da alta eficiência da cisplatina, o seu uso é limitado pelo seu alto potencial tóxico. Hepatotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e nefrotoxicidade, além de náusea, vômito e diarreia são comumente associados ao tratamento com este fármaco (KHAN et al., 2012; KIM, H. J. et al., 2010; KLEIN;BROWN;TURNLEY, 2007).

Dentre as toxicidades induzidas pela cisplatina, a nefrotoxicidade é considerada um dos efeitos adversos mais graves e constitui a maior causa de morbidade e mortalidade decorrentes de seu uso (CVITKOVIC, 1998; KINTZEL, 2001; LEE, R. H. et al., 2001). Estima-se que 25 a 35% dos pacientes tratados com cisplatina apresentam um severo declínio na função renal após uma única dose do fármaco (HAN;YUE;CHESNEY, 2009; YAO et al., 2007).

O rim não é somente o principal responsável pela excreção da cisplatina, mas é também o principal sítio de acúmulo do fármaco (SCHENELLMANN, 2001). Estima-se que a concentração de cisplatina em células do epitélio tubular proximal

renal seja aproximadamente cinco vezes maior do que sua concentração sérica (KUHLMANN;BURKHARDT;KOHLE, 1997). O dano renal induzido pela cisplatina ocorre inicialmente nos túbulos proximais, especialmente em células epiteliais tubulares dos segmentos S-2 e S-3. Os glomérulos e túbulos distais são afetados posteriormente (WERNER et al., 1995).

A cisplatina não interage apenas com DNA nuclear. Já foi descrito que apenas 1% da cisplatina intracelular liga-se ao DNA nuclear, sendo que a maior parte da cisplatina intracelular disponível interage com sítios nucleofílicos de outras moléculas, incluindo proteínas de membrana, do citoesqueleto e do citosol, fosfolipídios, RNA e DNA mitocondrial (GONZALEZ et al., 2001; TOWNSEND et al., 2003)

A via pela qual a cisplatina induz morte nas células tubulares renais ainda não foi completamente esclarecida. Os dois principais mecanismos sugeridos são o estresse oxidativo e a inflamação (ALI;AL MOUNDHRI, 2006; PABLA;DONG, 2008; YAO et al., 2007). A indução do estresse oxidativo é reconhecida como um importante fator indutor de apoptose em diversos tipos celulares (MUKHOPADHYAY et al., 2011; PABLA et al., 2011). A lesão mitocondrial e o posterior estabelecimento de um estado de estresse oxidativo após o tratamento com cisplatina já foram demonstrados por estudos anteriores (CULLEN et al., 2007; SANTOS, N. A. et al., 2007; SCHENELLMANN, 2001).

O papel dos antioxidantes

Antioxidantes têm sido propostos como adjuvantes na quimioterapia com cisplatina a fim de minimizar os efeitos tóxicos, permitir o escalonamento de doses e, por conseguinte, a obtenção do máximo efeito terapêutico. Adicionalmente, a resistência de certos tipos de tumores que não respondem à terapia com cisplatina, tais como câncer de ovário, cólon e bexiga poderia ser suplantada se doses maiores do quimioterápico pudessem ser utilizadas de forma segura. Idealmente, esses antioxidantes deveriam ser capazes de agir seletivamente sobre os tecidos saudáveis, sem interferir no efeito terapêutico do quimioterápico e não causar, por si só, efeitos adversos severos (PABLA et al., 2011; WANG, D.;LIPPARD, 2005).

Um grande número de antioxidantes tem se mostrado promissores quanto à nefroproteção, como vitamina C (TARLADACALISIR;KANTER;UYGUN, 2008), vitamina E (AJITH et al., 2009), resveratrol (DO AMARAL et al., 2008), quercetina

(FRANCESCATO et al., 2004), DMTU (SANTOS, N. A. et al., 2008) N-acetilcisteína (DICKY et al., 2005), alopurinol, ebselem (LYNCH et al., 2005), edaravone (SATO et al., 2003), naringenina (BADARY et al., 2005), licopeno (ATESSAHIN et al., 2005), CAPE (OZEN et al., 2004), entre outros; porém não há dados suficientes acerca do seu efeito sobre a atividade antitumoral da cisplatina (PABLA;DONG, 2008). Estudos em animais portadores de tumores e a identificação de novos agentes nefroprotetores que não diminuam a eficácia antitumoral da cisplatina são escassos e essenciais para o desenvolvimento de estratégias de citoproteção clinicamente factíveis.

Carvedilol

O carvedilol ou 1- (carbazol-4-iloxi) -3-[[2-(o-metoxifenoxi) etil] -2-propranol (Figura 2) é um beta-bloqueador não-seletivo de terceira geração, tendo sido o primeiro fármaco da classe aprovado para o tratamento de insuficiência cardíaca congestiva (1995). Atualmente, carvedilol, assim como outros beta-bloqueadores, tem sido utilizado no tratamento de doença coronariana, hipertensão e insuficiência cardíaca (MOCHIZUKI et al., 2007; RUFFOLO;FEUERSTEIN, 2006). Dentro desta classe de fármacos, o carvedilol é o único que possui atividade antioxidante, mesmo em baixas concentrações (DANDONA;GHANIM;BROOKS, 2007).

Figura 2: Estrutura química do carvedilol. Grupos da molécula responsáveis pelas atividades antiadrenérgica e antioxidante do fármaco. Asterisco indica centro quiral (RUFFOLO;FEUERSTEIN, 2006).

Esta capacidade antioxidante única do carvedilol dentre os β bloqueadores deve-se à porção carbazol presente na sua molécula. O carvedilol é um fármaco largamente metabolizado pelas enzimas hepáticas, principalmente do CYP2D6 (OLDHAM;CLARKE, 1997). Hidroxilações nas posições 2, 6 e 8 do carbazol aumentam a atividade antioxidante de 10 a 40 vezes. Entre os vários metabólitos do carvedilol, o 1-[3-hidroxicarbazolil-(4)-oxi]-3-(2metoxifenixietil) aminopropanol-(2) é um dos mais importantes, sendo que sua formação se dá pela introdução de uma hidroxila na posição 3 do grupo carbazol do carvedilol. A sua atividade antioxidante foi descrita como sendo 30 vezes maior que a do carvedilol (YUE et al., 1992). Enquanto hidroxilações na porção carbazol do carvedilol aumentam a atividade antioxidante, hidroxilações no anel aromático aumentam a atividade β bloqueadora. Os metabólitos 4 hidroxi-carvedilol e 5-hidroxi-carvedilol são os metabólitos com maior atividade β bloqueadora (SENTHILKUMAR et al., 2010).

Os mecanismos de ação antioxidante do carvedilol descritos incluem seqüestro de íons ferro e/ou seqüestro de radicais livres; porém o mecanismo ainda não foi completamente esclarecido (DANDONA;GHANIM;BROOKS, 2007; NOGUCHI;NISHINO;NIKI, 2000; YUE et al., 1992)

A eficácia do carvedilol contra danos causados pelo estresse oxidativo foi demonstrada em diferentes processos de citotoxicidade: doença cardiovascular (DANDONA;GHANIM;BROOKS, 2007); miocardite (PAUSCHINGER et al., 2005); discinesia orofacial induzida por neurolépticos (NAIDU;SINGH;KULKARNI, 2002); lesão renal induzida por isquemia e reperfusão (HAYASHI, T. et al., 2010; SINGH;CHANDER;CHOPRA, 2004); e mitocondriopatia cardíaca induzida pelo quimioterápico doxorrubicina (ARMSTRONG, 2004; OLIVEIRA et al., 2004; SPALLAROSSA et al., 2004). Em nosso laboratório, demonstramos o efeito protetor do carvedilol contra a toxicidade mitocondrial renal e estresse oxidativo induzidos pela cisplatina em ratos (RODRIGUES et al., 2010; 2011). Há ainda um registro de uma patente baseada em um estudo *in vitro* que sugere que o carvedilol, por si só, possui atividade antitumoral (BURMAN et al., 2003), o que, teoricamente, intensificaria a ação da cisplatina, no caso de terapia adjuvante.

Modelos tumorais em camundongos (Sarcoma 180)

O sarcoma 180 foi descoberto em 1914, na região axilar de um camundongo albino, por Woglom, da Universidade de Columbia é utilizado para estudos desde

1919, sem alteração em suas características morfológicas. As células do sarcoma 180 crescem muito rapidamente; com 7 dias de implantação subcutânea, o tumor alcança aproximadamente 15 x 11 x 8 mm (SUGIURA;STOCK, 1952).

A inoculação de células S-180 (provenientes de tumor desenvolvido naturalmente em camundongos) é um modelo clássico indicado por institutos regulamentadores e amplamente utilizado na avaliação de potenciais drogas anticâncer há muitos anos (FIELD, 1955; WANG, X.;LEWIS;MITCHELL, 2008).

O modelo animal original, utilizado nos primeiros estudos *in vivo* com a cisplatina por Rosenberg, na década de 70, envolveu a implantação do sarcoma 180 em camundongos. De acordo com os experimentos desenvolvidos, os animais tratados com uma dose única de cisplatina (8,0 mg/kg) apresentaram remissão completa do tumor (ROSENBERG et al., 1969). No presente estudo propomos o uso do mesmo modelo animal utilizado por Rosenberg, o que nos permitirá avaliar a manutenção da atividade antitumoral da cisplatina após o tratamento concomitante com outros fármacos potencialmente capazes de diminuir a nefrotoxicidade induzida pelo quimioterápico, como é o caso do carvedilol.

Medidas de citoproteção empregadas atualmente

Muitos análogos de platina foram sintetizados e avaliados como agentes antineoplásicos, e dentre eles, a carboplatina e a oxaliplatina obtiveram aprovação do FDA; porém ambos mostraram-se eficazes apenas contra um pequeno espectro de tumores (BOULIKAS;VOUGIOUKA, 2003; WANG, D.;LIPPARD, 2005). Assim, devido à grande eficácia e amplo espectro de ação, a cisplatina continua sendo um fármaco largamente empregado na clínica, apesar dos seus severos efeitos adversos, o que justifica o grande número de estudos com foco na nefroproteção.

Além de procedimentos de hidratação e diurese, o único agente citoprotetor aprovado para uso em pacientes submetidos à quimioterapia com cisplatina é a amifostina (Ethiol®) (ASNA et al., 2005; GRADISHAR et al., 2001; KEMP et al., 1996; PLANTING et al., 1999; SASTRY;KELLIE, 2005; SCHILLER et al., 1996). No entanto, a amifostina também apresenta efeitos adversos, como reações cutâneas, náusea, hipotensão e hipocalcemia (BLOCK;GYLLENHAAL, 2005); adicionalmente alguns estudos colocam em dúvida a eficácia da amifostina. Há relatos de casos que indicam que o uso de amifostina não protegeu contra a ototoxicidade, nefrotoxicidade e lesão na medula óssea em crianças durante o tratamento de

hepatoblastoma (KATZENSTEIN et al., 2009); além disso, há um relato de severa neurotoxicidade, ototoxicidade e nefrotoxicidade em uma paciente com carcinoma epitelial de ovário tratada com amifostina e altas doses de cisplatina (SASTRY;KELLIE, 2005).

Nos últimos anos, numerosos estudos têm abordado a capacidade nefroprotetora de vários compostos e têm sugerido seu uso em conjunto com a cisplatina. Tais estudos têm sugerido uma proteção significativa de vitaminas, compostos inorgânicos, compostos sintéticos e polifenóis extraídos de plantas, entretanto, estudos que avaliem o efeito do quimioterápico na supressão do tumor, na presença desses citoprotetores, são escassos (PABLA;DONG, 2008; SHEU;NAUDURI;ANDERS, 2006). Nesse contexto, o presente estudo preenche uma lacuna importante existente entre a proposição de novos agentes citoprotetores e a comprovação de um mecanismo protetor que não implique na diminuição da atividade antitumoral da cisplatina.

OBJETIVOS

III – OBJETIVOS

- ◆ Investigar a influência da coadministração do carvedilol na atividade antitumoral da cisplatina em modelo experimental realizado com camundongos portadores de sarcoma-180;
- ◆ Comprovar o efeito protetor do carvedilol contra a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina nesse modelo experimental;
- ◆ Elucidar os mecanismos envolvidos na nefroproteção exercida pelo carvedilol utilizando modelo *in vitro* com células de rim humano (HK-2).

MATERIAIS E MÉTODOS

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

1- Reagentes

Foram utilizados reagentes de elevado grau de pureza, no mínimo grau analítico P.A. Para o preparo das soluções foi utilizada água do Tipo I (ultra pura) obtida em sistema de purificação Milli-Q Gradiente (Millipore, Bedford, USA). A solução de cisplatina foi preparada em solução salina isotônica (NaCl 0,9%) e a solução de carvedilol foi preparada em solução aquosa de carboximetilcelulose 0,5%. O carvedilol foi gentilmente cedido pela empresa Baldacci S. A. (São Paulo, SP, Brasil) e Torrent do Brasil (São Paulo, SP, Brasil).

2- Células tumorais (S-180)

As células S-180 foram cedidas gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. José Roberto Mineo, do Departamento de Imunologia e Genética da Universidade Federal de Uberlândia. Tais células foram cultivadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Foi utilizado o meio de cultura DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de mix de antibióticos (5mg/mL de penicilina, 5mg/mL de estreptomicina e 10mg/mL de neomicina) a fim de manter um estoque de tais células no laboratório, evitando-se assim, possíveis perdas da linhagem (GERAN et al., 1972; STOCK et al., 1955).

As células para implantação no tecido subcutâneo dos camundongos receptores e formação do tumor sólido foram colhidas diretamente do líquido ascítico de um camundongo doador, em cujos peritôneos as células foram cultivadas por 7 a 10 dias.

3- Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, adultos, pesando 25-30g, obtidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Os animais foram alojados em gaiolas mantidas em salas com temperatura ambiente entre 22 e 24°C e umidade entre 45 e 55%, com ciclos de 12 horas de claro/escuro. Água e ração padrão foram fornecidas *ad libitum* durante todo o experimento.

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, sob protocolo nº

09.1.848.53.0 e seguem as normas estabelecidas nos “Princípios Éticos na Experimentação Animal”.

4- Tratamento dos animais

Os camundongos tratados foram divididos em 4 grupos, contendo 8 animais cada. As células tumorais foram implantadas por injeção subcutânea na virilha dos animais e no 8º dia após o implante (ROSENBERG, 1985) os animais que desenvolveram o tumor sólido receberam os seguintes tratamentos:

- ♦ **Grupo controle:** uma solução de carboximetilcelulose 0,5% (gavagem) (0,10mL/animal 30g) imediatamente antes da injeção de solução salina (0,75mL/animal 30g) e posteriormente, uma administração diária de carboximetilcelulose 0,5% (0,10 mL/animal 30g, gavagem) nos dois dias consecutivos;
- ♦ **Grupo cisplatina (CISP):** uma injeção de cisplatina (25 mg/kg, i.p.) no primeiro dia de tratamento;
- ♦ **Grupo carvedilol (CV):** uma administração diária de CV (10 mg/kg, gavagem) em três dias consecutivos;
- ♦ **Grupo carvedilol + cisplatina (CV + CIS):** uma administração de CV (10 mg/kg, gavagem), imediatamente antes da injeção de cisplatina (25 mg/Kg, i.p.) e posteriormente uma administração diária de CV (10 mg/Kg, gavagem), nos dois dias consecutivos.

Decorridas 72 horas do início do tratamento, os animais foram anestesiados com tiopental de sódio (Cristália, Itapira, Brasil) 50 mg/kg, o sangue heparinizado foi colhido por punção cardíaca e os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. O tumor e os rins foram imediatamente removidos.

5 – Avaliação da Função Renal

5.1 – Creatinina plasmática

A creatinina foi determinada utilizando-se kit diagnóstico (CREATININA Labtest®), que se baseia na reação descrita por Jaffé, na qual a creatinina reage com o ácido pícrico em meio alcalino, gerando uma coloração avermelhada (SIMUNEK et al., 2009). Os ensaios foram realizados segundo o procedimento descrito pelo fabricante (Tabela 1).

Tabela 1: Procedimento para determinação de creatinina em plasma.

	Branco	Amostra	Padrão
<i>Tampão (n° 2) (mL)</i>	1,0	1,0	1,0
<i>Plasma (mL)</i>	-	0,125	-
<i>Água (mL)</i>	0,125	-	-
<i>Padrão (n° 3) (mL)</i>	-	-	0,125
<i>Ac. Pícrico (n°1) (mL)</i>	0,250	-	0,250

Após agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos e a absorbância foi determinada a 510 nm (A1) em espectrofotômetro Femto 600 Plus.

Adicionou-se, então, ao branco e ao teste 0,05 mL de acidificante (ácido acético, reagente n°4); após homogeneização a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos. Uma nova absorbância foi determinada a 510 nm (A2).

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

5.2 - Uréia plasmática

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

O método baseia-se na reação de Berthelot, descrita em 1859, na qual ocorre a hidrólise da uréia pela ação da urease com formação de íon amônio e CO₂. O íon amônio, por sua vez, reage em pH alcalino com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio para formar o azul de indofenol. A intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra e as absorbâncias são determinadas em 600 nm, espectrofotômetro Femto 60 Plus (BOLLETER; BUSHMAN; TIDWELL, 1961; WILCOX et al., 1966).

A amostra de plasma foi diluída 10 vezes antes da realização do ensaio para que os valores obedecessem à curva de calibração do fabricante.

Tabela 2: Procedimento para determinação de uréia em plasma.

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

Os tubos foram agitados e incubados a 37°C por 5 minutos. A seguir adicionou-se 1,0 mL de oxidante de uso (hidróxido de sódio 0,14 mol/L e hipoclorito de sódio 6,05 mmol/L) em cada tubo, agitou-se e incubou-se novamente a 37°C por 5 minutos.

A absorbância foi determinada em 600 nm em espectrofotômetro Femto 600 Plus. A concentração da amostra foi calculada dividindo-se a absorbância da amostra pela absorbância do padrão e multiplicando o valor pela concentração do padrão (70 mg/dL) e pelo fator de diluição (10).

5.3 – Histopatologia renal - Coloração com hematoxilina-eosina (HE)

Secções do córtex renal (4µm) foram desparafinizadas, hidratadas, coradas com hematoxilina e eosina (HE), desidratadas em concentrações gradativas de etanol (etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% I, etanol 100% II) e xilol (xilol 100% I, xilol 100% II e xilol 100% III), montadas com DepEx® (Merck) e cobertas com lamínula.

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico Olympus BH2 (x200). Em cada lâmina foi analisado o número de túbulos proximais danificados (INOUE et al., 2008). Após a contagem de 10 campos por lâminas os resultados foram expressos em % média de túbulos renais danificados.

6 – Avaliação da nefrotoxicidade

6.1 - Determinação de proteína no homogenato renal

Após a morte dos animais, os rins foram imediatamente retirados, imersos em solução contendo KCl 0,2g/L, KH₂PO₄ 0,2 g/L, NaCl 8,0 g/L, Na₂HPO₄ 1,15g/L, pH 7,4 (PBS) mantida em banho de gelo. Os rins foram seccionados, limpos e sua massa foi determinada, o tecido renal foi homogeneizado em PBS, na proporção de 1:10. Para tal, foi utilizado homogeneizador tipo Potter-Elvehjem e foram realizados três ciclos de 15 segundos intercalados com 1 minuto de repouso. O homogenato foi

centrifugado a 350 x g por 10 min (4°C) o sobrenadante foi separado para determinação de proteína e realização dos ensaios de estresse oxidativo.

Para a determinação de proteína foi empregado o método do Biureto (CAIN;SKILLETER, 1987). Nesse método o sulfato de cobre é adicionado a uma solução protéica, em um meio fortemente alcalino e uma coloração violeta é produzida, resultante do complexo formado entre os íons cúpricos e as ligações peptídicas das proteínas. A cor foi monitorada em espectrofotômetro Femto 600 Plus operando a 540 nm (GORNALL;BARDAWILL;DAVID, 1949).

Para solubilizar as proteínas foi utilizada uma solução de ácido clorídrico a 5% em NaOH 5M. O reagente de biureto foi composto de sulfato de cobre 0,15%, tartarato de sódio e potássio 0,6% e 30% (v/v) de solução de NaOH 10%.

O procedimento foi realizado como descrito na Tabela 3.

Tabela 3: Procedimento para determinação de proteínas na amostra.

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

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

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

6.2 – Marcadores de Estresse Oxidativo

6.2.1- Lipoperoxidação

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

O homogenato renal (200 μ L) foi adicionado a 200 μ L de PBS. Foram então adicionados 400 μ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% m/v (solubilizado em NaOH 50mM), 200 μ L de H_3PO_4 20%, 40 μ L de NaOH 10M e 10 μ L de BHT 100mM (butil-hidroxitolueno). A solução foi homogeneizada e aquecida a 85°C por 20 minutos. Após esfriar naturalmente, foram adicionados 1,5 mL de butanol, a mistura foi agitada em vórtex por 3 minutos. A fase orgânica (superior) foi coletada e a concentração determinada a partir da medida da absorbância em 535 nm frente a uma curva de calibração preparada com 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMOP) nas concentrações de 0,2; 0,5; 1,0; 3,0; 7,0; 10,0; 12,5; 15,0 e 20,0 μ M. As absorbância foi determinada em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3000 (KOWALTOWSKI et al., 1996).

6.2.2- Glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da glutathiona foi realizada de acordo com a técnica de Hissin e Hilf modificada (HISSIN;HILF, 1976). O homogenato renal (100 μ L) foi tratados com 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugados a 900xg por 3 minutos. O sobrenadante obtido (100 μ L) foi adicionado a 2mL de tampão fosfato de sódio (NaH_2PO_4), pH 8,0, contendo EGTA 5mM. A essa solução foram adicionados 100 μ L de o-ftaldialdeído 1mg/mL (solubilizado em metanol) e a fluorescência foi medida após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, em um fluorímetro Hitachi, modelo F-2500 operando em 350 nm (excitação) e 420 nm (emissão). A concentração foi calculada de acordo com uma curva de calibração de GSH (0,5; 1,5; 7,5; 15; 30; 60; 150; 300 e 600 μ M).

7- Marcadores das vias de morte celular

Um dos rins de cada um dos animais tratados foi fixado com formol tamponado (4%, em solução de tampão fosfato 0,2M, pH 7,3) e incluído em parafina para posterior realização dos ensaios.

7.1- Ensaio de TUNEL

A fragmentação do DNA é uma característica morfológica presente na morte celular por apoptose. O ensaio de TUNEL tem como princípio a detecção da apoptose via fragmentação do DNA. As quebras na fita do DNA são detectadas por marcação enzimática da porção 3'-OH terminal livre. Esta nova porção final do DNA

é, geralmente, encontrada no núcleo celular e nos corpos apoptóticos (KRONING;LICHTENSTEIN;NAGAMI, 2000).

As secções do tecido renal (4µm) foram desparafinizadas, hidratadas e utilizadas para realização do ensaio de TUNEL (*“Terminal deoxytidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling”*), empregando-se kit comercial (TUNEL Apoptosis Detection Kit, Millipore®).

Após as secções serem desparafinizadas e hidratadas, 150 µL de proteinase K (20µg/mL) foram aplicados sobre o tecido por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS e a peroxidase endógena bloqueada com H₂O₂ 3% por 5 minutos. As lâminas foram lavadas novamente e incubadas com 17,5 µL do tampão de equilíbrio (*“equilibration buffer”*) por 10 minutos. O tampão de equilíbrio foi então removido com o uso de um pipetador automático e o tecido incubado com 12,5 µL da enzima TdT (*“terminal deoxynucleotidyl transferase”*) por 60 minutos em uma câmara umidificada em banho-maria a 37°C. A enzima foi também removida com o auxílio do pipeta automática para a adição de 100µL do tampão de parada (*“working strenght stop washing buffer”*). Após a adição do tampão, as lâminas foram gentilmente agitadas por 15 segundos, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente.

As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o conjugado anti-digoxigenina (*“anti-digoxigenin conjugate”*) por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi realizada outra lavagem e a cor foi então desenvolvida através de reação com DAB (3,3'-diaminobenzidina) por 5 minutos. A contra coloração foi realizada com hematoxilina por 1 minuto e as lâminas foram desidratadas e montadas para posterior leitura em microscópio óptico.

As lâminas foram escaneadas (x200) e a quantificação da marcação positiva para DAB correspondente à presença de apoptose foi realizada com o auxílio do *“Aperio ImageScope”* (San Diego, CA, USA). Foram quantificados 10 campos para cada lâmina e foi calculada a média da contagem de pixels positivos (*“positive pixel count”* – ppc).

7.2- Ensaio Imuno-histoquímicos

Os ensaios imuno-histoquímicos baseiam-se na marcação de um tecido ou antígenos celulares com um anticorpo e um cromógeno, o que possibilita a visualização, sob microscopia ótica, da localização exata do antígeno no tecido

corado. A ligação antígeno-anticorpo ocorre através de uma combinação de ligações iônicas, hidrofóbicas e reversíveis denominadas forças de Van der Waal's e pontes de hidrogênio. A técnica imuno-histoquímica é sensível e específica, podendo ser utilizada com uma ampla variedade de antígenos e em diferentes espécies animais (BRILLET et al., 1994; RAMOS-VARA, 2011).

7.2.1- Determinação imuno-histoquímica de caspase-3

As secções de tecido renal foram desparafinizadas e hidratadas.

A recuperação antigênica foi realizada com tampão Tris/EDTA (Tris 0,01M e EDTA 1µM) pH 8,8, em panela de pressão histológica (105 °C por 15 minutos). Após aguardar 20 minutos para o resfriamento, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 1% em PBS, por 10 minutos, seguida de lavagem das secções com PBS. Foram, então, adicionados 100 µL de soro de cabra (10%, 20 minutos) para evitar ligações não específicas do anticorpo secundário.

O anticorpo primário anti-caspase-3 clivada (Biocare Medical Rabbit anti-cleaved caspase-3, ASP175) foi diluído (1:120) em soro de cabra 10% e 50µL da solução foram acrescentados à cada secção após a remoção do excesso de soro de cabra, com o auxílio do pipeta automática e incubou-se por uma noite a temperatura ambiente.

No dia seguinte as secções foram lavadas com PBS e 50µL do polímero secundário (Vector Impress anti-rabbit HRP polymer) foram aplicados por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS e a cor foi desenvolvida através de reação com DAB por 5 minutos.

A contra coloração foi realizada com hematoxilina por 1 minuto e as lâminas foram desidratadas e montadas para posterior leitura em microscópio óptico (GOBE, 2009; MEMOS et al., 2009).

As lâminas digitalizadas em escâner (x200) e a quantificação da marcação positiva para DAB, correspondente à presença de caspase-3 clivada, foi realizada com o auxílio do programa "Aperio ImageScope" (San Diego, CA, USA). Foram quantificados 10 campos para cada lâmina e foi calculada a média da contagem de pixels positivos ("positive pixel count" – ppc).

7.2.2- Determinação imuno-histoquímica de Bax

As secções de tecido renal foram desparafinizadas e hidratadas.

A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (0,01M) pH 6,0, em panela de pressão histológica (125 °C, por 5 minutos). Após aguardar 20 minutos para o resfriamento, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 1,0% em PBS por 10 minutos, seguida de lavagem das secções em PBS. A redução de “background” foi realizada com a incubação dos tecidos com uma gota de Background Sniper (Biocare Medical®) por 15 minutos. O excesso de Sniper foi removido com auxílio de pipeta automática e as secções foram expostas a 100 µL de soro de burro (10%) por 20 minutos para evitar ligações não específicas do anticorpo secundário.

O anticorpo primário anti-Bax (Santa Cruz rabbit anti-human Bax, sc-526) foi diluído (1:100) em soro de burro (5% em PBS) e 50µL da solução foram adicionados à cada secção após a remoção do excesso de soro de burro com o auxílio da pipeta automática. Seguiu-se incubação por uma noite a temperatura ambiente.

No dia seguinte as secções foram lavadas com PBS e 50µL do polímero secundário (Vector Impress anti-rabbit HRP polymer) foram aplicados por 60 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS e a cor foi desenvolvida através de reação com DAB por 5 minutos. A contra coloração foi realizada com hematoxilina por 1 minuto e as lâminas foram desidratadas e montadas para posterior leitura em microscópio óptico (MEMOS et al., 2009).

As lâminas foram digitalizadas em escâner (x200) e a quantificação da marcação positiva para DAB correspondente à presença de Bax foram analisadas com o auxílio do programa “Aperio ImageScope” (San Diego, CA, USA). Foram quantificados 10 campos para cada lâmina e foi calculada a média da contagem de pixels positivos (“positive pixel count” – ppc).

7.2.3- Determinação imuno-histoquímica de Bcl-x_L

As secções de tecido renal foram desparafinizadas e hidratadas.

A recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato (0,01M) pH 6,0 em panela de pressão histológica (125 °C, 5 minutos). Após aguardar 20 minutos para o resfriamento, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 1% em PBS por 10 minutos, seguido de lavagem das secções em PBS/T (PBS acrescentado de 0,05% de Tween 20).

Foram adicionados às secções 100 µL de soro de cabra 10% (20 minutos) para evitar ligações não específicas do anticorpo secundário.

O anticorpo primário anti-Bcl-x_L (Santa Cruz rabbit anti-human Bcl-x_L, sc-634) foi diluído (1:300) em soro de cabra (10%) e 50µL da solução foram acrescentados à cada secção após a remoção do excesso de soro de cabra com pipetador automático. Em seguida as secções foram incubadas por uma noite à temperatura ambiente.

No dia seguinte as secções foram lavadas com PBS e 50µL do polímero secundário (Vector Impress anti-rabbit HRP polymer) foram aplicados. Após 60 minutos as lâminas foram lavadas com PBS e a cor foi desenvolvida através de reação com DAB por 5 minutos. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e incubadas com CuSO₄ por 10 minutos para intensificação da cor.

A contra coloração foi realizada com hematoxilina por 1 minuto e as lâminas foram desidratadas e montadas para posterior leitura em microscópio óptico (GOBE, 2009; MEMOS et al., 2009).

As lâminas foram digitalizadas em escâner (x200) e a quantificação da marcação positiva para DAB correspondente à presença de apoptose foram analisadas com o auxílio do programa “Aperio ImageScope” (San Diego, CA, USA). Foram quantificados 10 campos para cada lâmina e foi calculada a média da contagem de pixels positivos (“positive pixel count” – ppc).

8- Influência do carvedilol na atividade antitumoral de cisplatina

8.1- Determinação da platina

As amostras do córtex renal e do tumor foram removidas, liofilizadas e pesadas (15 a 85 mg) e colocadas em tubos cônicos estéreis de 15 mL. Foi adicionado 1 mL de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 50% e incubadas por 48 horas a temperatura ambiente. O volume desta solução foi completado para 15 mL com HNO₃ 1% e Triton X-100 0,01%. As amostras foram então diretamente analisadas através do monitoramento do isótopo ¹⁹⁵Pt por Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma (ICP-MS ELAN DRCII) e a quantificação foi realizada com base em uma curva de calibração contendo 2; 5; 10 e 20 ppb de platina (BATISTA et al., 2009).

8.2- Avaliação do desenvolvimento do tumor

8.2.1 – Peso do tumor

Após 72 horas de tratamento, como descrito anteriormente (item IV – Materiais e Métodos, subitem 4 – Tratamento dos Animais), os animais foram sacrificados, os tumores removidos cuidadosamente e separados de outros tecidos, lavados em solução de PBS, secos em papel de filtro e pesados em balança analítica.

8.2.2 – Avaliação da taxa de remissão do tumor

A taxa de remissão do tumor foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $(\%) = [(A-B)/A] \times 100$, sendo **A**: média de peso do tumor no grupo controle; **B**: média de peso do tumor em cada grupo tratado (GONZAGA et al., 2009).

8.3 – Sobrevida dos animais

Após os tratamentos os animais foram alojados em gaiolas mantidas em salas com temperatura ambiente entre 22 e 24°C e umidade entre 45 e 55%, com ciclos de 12 horas de claro/escuro. Água e ração padrão foram fornecidas *ad libitum* durante todo o período de observação que se estendeu por até 400 dias. Para a representação gráfica da sobrevida dos animais, a porcentagem de animais foi expressa no eixo “y” e o número de dias de vida no eixo “x”, sendo que cada ponto corresponde a morte de um animal (GONZAGA et al., 2009).

9- Influência do carvedilol na mutagenicidade induzida pela cisplatina

9.1- Teste do micronúcleo em sangue periférico

O ensaio do micronúcleo em sangue periférico dos camundongos foi realizado de acordo com método previamente descrito (HAYASHI, M. et al., 1990). O sangue foi coletado da veia caudal, 24 e 72 horas após o início do tratamento. O sangue foi gotejado diretamente sobre a lâmina e com uma lamínula foi feito o esfregaço. Após 24 horas, o material foi fixado em metanol por 10 minutos e seco à temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com Laranja de Acridina (125µg/mL, Sigma-Aldrich) 1 minuto antes da análise em microscópio de fluorescência Olympus BX 51 (luz azul 488nm e filtro amarelo, aumento 400x) (LYNCH et al., 2005).

Para a análise citológica das lâminas, foi observada a incidência de micronúcleos nos eritrócitos policromáticos (imaturos). Foram contadas duas lâminas de cada animal

e em cada lâmina foram contados 1000 eritrócitos policromáticos. Os resultados foram expressos em eritrócitos policromáticos micronucleados por 1000 eritrócitos policromáticos.

9.2- Determinação da Taxa de Eritrócitos Policromáticos em Medula Óssea (relação PCE/NCE)

Após 72 horas do início do tratamento, os fêmures dos animais foram removidos, e após a retirada das epífises, uma agulha contendo 2,0mL de soro fetal bovino foi introduzida no fêmur para a retirada da medula óssea e posterior homogeneização. O material foi centrifugado (576 x g por 5 minutos) e o sobrenadante foi desprezado, deixando-se apenas uma pequena quantidade remanescente, a qual foi misturada ao pellet com auxílio de uma pipeta Pasteur. Em seguida, o material foi gotejado no canto superior da lâmina e com uma lamínula realizou-se o esfregão. O material foi fixado em metanol absoluto por 5 minutos e no dia seguinte corado com Giemsa diluído (1:10) em tampão Sorensen (0,06 M de KH_2PO_4 e 0,06 M de NaH_2PO_4) pH 6.8 (5 minutos). Foi realizada a contagem de 500 eritrócitos, policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE), e empregada a seguinte fórmula: $\text{PCE/NCE} = \text{PCE} / (\text{PCE} + \text{NCE})$ (APARECIDA RESENDE et al., 2006).

10- Ensaios *in vitro*

Foram utilizadas células epiteliais tubulares renais isoladas de rim humano normal (HK-2), obtidas da ATCC (American Type Culture Collection). Apesar de ser uma linhagem celular imortalizada, as células HK-2 têm sido aceitas em numerosas publicações científicas como modelo de células normais do epitélio tubular renal, sendo especialmente sensíveis ao dano induzido pela cisplatina (DAVIDSON et al., 2005).

As células foram mantidas a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO_2 , em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mix de antibióticos (penicilina 1,000 U/ml e estreptomicina 1,000 µg/ml).

As células foram divididas em 4 grupos de tratamento similares aos dos ensaios *in vivo*: (I) grupo Controle, tratada com salina tamponada com fosfato (PBS); (II) grupo Cisplatina (Cisp), 25µM de cisplatina; (III) grupo Carvedilol+Cisplatina (CV+Cisp), 50µM de carvedilol e 25 µM de cisplatina; e (IV) grupo Carvedilol (CV),

50 μM de carvedilol. O tratamento foi iniciado 24 h após o plaqueamento das células e o período de incubação foi sempre de 24h.

As soluções de cisplatina e carvedilol utilizadas nos tratamentos das células foram preparadas e filtradas no dia do uso, sendo que a solução estoque de cisplatina foi preparada na concentração de 2mM em PBS estéril, enquanto a solução estoque de carvedilol (12,3 mM) foi solubilizada em DMSO e posteriormente diluída para 5mM em solução salina estéril.

Curvas dose-resposta de cisplatina (12,5; 25; 50 e 100 μM) e de carvedilol (5; 25 e 50 μM) foram realizadas para a avaliação da indução da apoptose nas células HK-2, determinada pela contagem de corpos apoptóticos após coloração com hematoxilina e eosina e utilizadas para a escolha das doses de trabalho. Essas curvas estão representadas na seção “Resultados”. Nas doses escolhidas (25 μM de cisplatina e 50 μM de carvedilol) não foram observados sinais de necrose, desta forma, foi feita apenas a contagem da apoptose.

Durante os tratamentos, o soro fetal bovino (FBS) foi substituído por 0,5% de soroalbumina bovina (BSA) (PAT et al., 2003). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

10.1 – Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de azul de Trypan. As células (2×10^5 células/mL/poço) foram incubadas em placas de 12 poços, tratadas como descrito anteriormente e tripsinizadas. A suspensão celular foi centrifugada a 349xg por 5 minutos a 4°C e o pellet foi retomado em 200 μL de PBS. Foram adicionados 50 μL de uma solução de azul de Trypan 0,4% a 50 μL da suspensão celular. As células viáveis (não coradas) e as células não viáveis (coradas em azul) foram contadas em câmara de Neubauer e os resultados expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao número total de células. Para contagem foi utilizado o microscópio óptico Olympus BH2 (x400) (STODDART, 2011).

10.2 – Análise da apoptose após coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)

As células foram colocadas em placas de 12 poços (2×10^5 células por poço), sendo que cada poço continha uma lamínula de vidro de 11 mm de diâmetro e posteriormente submetidas aos quatro tratamentos já descritos. Vinte e quatro

horas após o tratamento as lamínulas com as células aderidas foram lavadas gentilmente com PBS a 4°C, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, e então fixadas com solução de formaldeído 4% por uma hora. Após a fixação, as células foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), desidratadas em concentrações gradativas de álcool (etanol 70%, etanol 95%, etanol 100%) e xilol, e montadas sobre lâmina de vidro com DepEx® (Merck).

Para a quantificação da apoptose as lamínulas foram observadas sob microscopia óptica (microscópio Olympus BH2; x400 e as células apoptóticas e normais foram contadas em pelo menos 10 campos diferentes de cada lamínula. A taxa de apoptose foi calculada em relação ao número total de células por campo. A apoptose foi caracterizada pela presença de (i) células pequenas e fortemente coradas, com cromatina nuclear marginada e condensada e membranas intactas; (ii) corpos apoptóticos discretos contendo fragmentos nucleares vastos, densos e picnóticos, envoltos por uma estreita faixa citoplasmática; (iii) conjuntos de pequenos corpos apoptóticos que pareciam ter sido originados de uma única célula (DAVIDSON et al., 2005).

10.3 – Determinação de apoptose por citometria de fluxo

As células (2×10^6) foram colocadas em garrafas de 25 cm² e cultivadas por 2-3 dias até alcançar a confluência de 85-90%. Então, foram tratadas como descrito previamente, incubadas por 24h, tripsinizadas e centrifugadas (349xg, 5 minutos). O sobrenadante foi removido e as células foram fixadas com etanol 70% (1mL), transferidas para um tubo microtubo de 1,5 mL e mantidas a 4°C por 24 horas.

Após a fixação, as células foram lavadas com PBS estéril (três vezes), o pellet final foi retomado em 850 µL de PBS estéril, foram adicionados 100 µL de solução de RNAase A 10mg/mL e as células foram então incubadas a 37°C por 30 minutos. Posteriormente foram adicionados 50 µL de iodeto de propídeo 1mg/mL, as células foram incubadas à 0°C por 30 minutos e submetidas à citometria de fluxo (FACSCanto A Standard, Becton Dickinson – BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Os dados foram analisados utilizando-se o software FACSDIVA 5.0.1 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os resultados foram expressos como porcentagem de células presentes na região 2 (P2) correspondente aos corpos apoptóticos presentes no histograma (BRYSON;HARMON;COLLINS, 1994).

10.4 – Detecção de proteínas da via apoptótica por Western-blotting

As células foram cultivadas por 2-3 dias em placas de Petri na concentração de 2×10^5 células/mL (volume final 10 mL) e tratadas como descrito anteriormente. Vinte e quatro horas após o tratamento o meio de cultura foi removido e centrifugado a 349xg por cinco minutos para a coleta de possíveis células presentes no sobrenadante.

As células HK-2 que se encontravam aderidas foram lavadas gentilmente com PBS a 4°C por três vezes. As placas de Petri foram colocadas sobre um banho de gelo e 100 µL de tampão RIPA (150mM de NaCl, 25 mM de NaF, 0,5mM de EDTA, 0,1% SDS, 1% IGEPAL CA-630, 50mM de Tris, pH 7,5) adicionado de inibidores de proteases (ortovanato de sódio 1 mM, PMSF 2µg/mL, leupeptina 10 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL) foram adicionados à cada placa de Petri. Após 3-5 minutos, as células foram removidas com o auxílio de um “scraper” e coletadas em um microtubo de 1,5 mL.

A suspensão celular foi sonicada (três ciclos de 1 minuto cada com intervalos de 1 minuto em banho de gelo), e centrifugada a 16.000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, utilizado para dosagem de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (BCA, Pierce bicinchoninic protein assay kit; Thermo, Illinois, USA) , aliquotado, congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -70°C para posterior realização dos ensaios de Western-blotting.

Quantidades iguais de proteínas (20µg) foram submetidas à eletroforese em SDS-PAGE (“sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis”) em gel de acrilamida/bisacrilamida 8-10%. Em sequência as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana PVDF (“polyvinylidene difluoride”). Após a transferência as ligações inespecíficas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado 5% em PBS/T (Salina tamponada com tampão Tris ou “Tris buffered saline”, adicionado de 0,05% de Tween-20) por uma hora.

As membranas foram incubadas com os anticorpos primários para a determinação de caspase-3, caspase-9, Bax, Bcl-x_L e SIRT-1, os mesmos foram diluídos em leite em pó desnatado 1% em TBS/T como detalhado na Tabela 4 por 12 horas a 4°C.

Após a incubação com o anticorpo primário as membranas foram lavadas quatro vezes com PBS e incubadas por uma hora com o anticorpo secundário

(Secondary goat anti-rabbit IgG (H+L); Invitrogen G21234) de acordo com a diluição descrita na Tabela 4.

A presença e expressão das proteínas foram avaliadas utilizando-se o kit de quimioluminescência SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA).

A densitometria das bandas foi analisada e os anticorpos foram removidos das membranas utilizando o tampão de “stripping” (β -mercaptoetanol 100mM, SDS 2%, Tris-HCl 62,5mM, pH6.8) e o processo de “immunoblotting” foi repetido utilizando GAPDH (“Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase”) como anticorpo primário (1:20.000) a fim de detectar pequenas diferenças nas concentrações proteicas possivelmente presentes entre as bandas. A razão entre a proteínas de interesse e a GAPDH (anticorpo primário rabbit anti-GAPDH, Sigma; G9545) foi calculada através de densitometria, utilizando-se o programa “Scion Image” (Scion Corporation, MD, USA) (MORAIS et al., 2006).

Tabela 4: Detalhamento dos anticorpos primários e diluições dos anticorpos primários e secundário utilizados nos ensaio de Western-blotting

Anticorpo primário	Fabricante e código	% do gel	Diluição do anticorpo primário	Diluição do anticorpo secundário
Caspase-3	Santa Cruz; sc-7148	12%	1:700	1:7000
Caspase-9	Cell Signaling; 9502	10%	1:1000	1:5000
Bax	Santa Cruz; sc-526	12%	1:700	1:5000
Bcl-x _L	Santa Cruz; sc-7195	10%	1:1000	1:5000
SIRT-1	Santa Cruz; sc-15404	8%	1:1000	1:5000

11- Mecanismo de ação antioxidante do carvedilol

11.1 – Avaliação da atividade antioxidante do carvedilol por Ressonância Paramagnética Eletrônica

A técnica da ressonância paramagnética eletrônica (RPE) permite quantificar radicais livres por ter a capacidade detectar elétrons desemparelhados (BACIC et al., 2008).

Foi empregado o espectrômetro Jeol JES-FA200 Banda X equipado com uma cavidade cilíndrica (TE₀₀₁) com os seguintes parâmetros: potência 1mW, campo magnético central 349 mT, frequência de modulação 100 kHz, amplitude de modulação 0.1 mT. A atividade antioxidante do carvedilol (0, 5 µM e 5mM) foi avaliada na presença do radical DPPH (diphenyl-picrylhydrazyl) solubilizado em metanol na concentração de 500µM. O carvedilol (5mM) também foi avaliado na presença do radical TEMPOL (4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl) na concentração de 100µM em água.

Alíquotas de 40µL da solução de DPPH e TEMPOL foram adicionadas a alíquotas de mesmo volume das soluções do carvedilol, agitadas e transferidas para um tubo capilar, que por sua vez foi selado e inserido em um tubo de quartzo padrão com diâmetro interno de 3 mm. Todo o procedimento foi realizado à temperatura ambiente e em um período fixo de 3 minutos (SANTOS, A. B. et al., 2009).

11.2 – Capacidade de quelar íons ferrosos (Fe⁺²)

Foi utilizado ensaio colorimétrico baseado na reação da batofenantrolina com o íon ferro II, com formação de um complexo de coloração avermelhada, cuja intensidade depende da concentração do íon em questão.

Para tal, FeSO₄ na concentração final de 50µM foi incubado com concentrações crescentes de carvedilol (0, 50, 75, 100, 150 e 200µM) por 15 minutos. Na sequência foi adicionada solução de ácido dissulfônico da batofenantrolina (200µM), seguida de agitação e incubação por mais 15 minutos. A leitura da absorbância foi realizada nos comprimentos de onda 530 e 700nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-3000. Para a análise dos dados foi utilizada a diferença entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 530 e 700nm a fim de eliminar a interferência da turbidez gerada na reação (RANA et al., 2010).

RESULTADOS

V- RESULTADOS

Para determinação do nível de significância foram adotados os seguintes critérios:

- ◆ O grupo Cisp foi comparado ao grupo Controle comprovação dos efeitos nefrotóxicos e da atividade antitumoral da cisplatina;
- ◆ O grupo CV+Cisp foi comparado ao grupo Cisp para comprovar a nefroproteção e investigar a possível interferência do carvedilol na atividade antitumoral da cisplatina;
- ◆ O grupo CV foi comparado ao grupo Controle para verificar a ocorrência de efeitos diretos do carvedilol, além da nefroproteção.

Todos os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se testes não-paramétricos (Kruskal Wallis, seguido de Mann-Whitney Test) para os ensaios *in vivo* e o teste ANOVA com pós-teste de Bonferroni para os ensaios *in vitro*. Foi utilizado o programa “*GraphPad Prism for Windows*” (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, USA) e adotado $p < 0,05$ como nível de significância

As tabelas 5 e 6 apresentam os resultados de todos os parâmetros avaliados nos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* respectivamente, bem como os números das figuras correspondentes e os números das páginas em que se encontram.

Tabela 5: Quadro Geral dos resultados obtidos no modelo in vivo nos quatro grupos de tratamento (Controle, Cisp, CV+Cisp e CV).

Parâmetro	Unidade	Controle	Cisplatina	CV+Cisp	CV	Figura ou Tabela	Pág
Creatinina	mg/dL	0,30 ($\pm$ 0,03)	2,67* ($\pm$ 0,26)	0,78 [#] ($\pm$ 0,23)	0,36 ($\pm$ 0,23)	3	34
Uréia	mg/dL	50,41 ($\pm$ 2,20)	302,90* ($\pm$ 19,59)	97,81 [#] ($\pm$ 22,36)	50,49 ($\pm$ 3,53)	4	35
Danos- túbulos renais (HE)	%	0,50 ($\pm$ 0,27)	70,47* ($\pm$ 1,68)	11,90 [#] ($\pm$ 3,56)	0,73 ($\pm$ 0,23)	5	36
MDA	nmol/mg proteína	1,77 ($\pm$ 0,35)	3,13* ($\pm$ 0,44)	1,58 [#] ($\pm$ 0,34)	1,41 ($\pm$ 0,20)	6	37
GSH	nmol/mg proteína	1,42 ($\pm$ 0,08)	0,63* ($\pm$ 0,08)	1,05 [#] ($\pm$ 0,14)	1,19 ($\pm$ 0,05)	7	38
TUNEL	ppc	388,90 ($\pm$ 74,35)	62.347,40* ($\pm$ 11.014,30)	4.661,95 [#] ($\pm$ 4050,85)	198,39 ($\pm$ 31,13)	8	39
Caspase-3 (imuno-histoquímica)	ppc	546,13 ($\pm$ 173,97)	40.642,50* ($\pm$ 3677,67)	8.515,75 [#] ($\pm$ 4050,85)	198,39 ($\pm$ 31,13)	9	41
Bax (imuno-histoquímica)	ppc	616,60 ($\pm$ 157,10)	15.171,10* ($\pm$ 3178,81)	6.421,66 [#] ($\pm$ 1258,74)	629,62 ($\pm$ 238,74)	10	42
Bcl-x_L (imuno-histoquímica)	ppc	4.560,34 ($\pm$ 716,44)	4.580,34 ($\pm$ 1337,59)	6.572,96 ($\pm$ 1760,27)	4.174,86 ($\pm$ 897,50)	11	43
Pt rim	µg/g tecido	nd	36,36* ($\pm$ 4,57)	34,93 ($\pm$ 4,81)	0,41 ($\pm$ 0,09)	12	45
Pt tumor	µg/g tecido	nd	16,39* ($\pm$ 2,97)	20,12 ($\pm$ 2,68)	0,09 ($\pm$ 0,02)	13	45
Massa tumoral	g	0,46 ($\pm$ 0,06)	0,21* ($\pm$ 0,05)	0,17 [#] ($\pm$ 0,06)	0,45 ($\pm$ 0,09)	14	47
Taxa remissão tumor	%	-	63,04	69,57	2,17	Tab. 7	47
Sobrevida	-	-	-	-	-	15	48
Micronúcleo	PCMN/1000 PCE	1,75 ($\pm$ 1,01)	8,03* ($\pm$ 2,83)	7,40 ($\pm$ 1,11)	1,25 ($\pm$ 0,28)	16	49
Relação PCE/NCE	-	33,88 ($\pm$ 5,38)	2,33* ($\pm$ 0,93)	1,56 ($\pm$ 0,32)	39,52 ($\pm$ 5,80)	17	51

Os valores são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. nd: não detectado; * significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle); # significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Tabela 6: Quadro Geral dos resultados obtidos no modelo in vitro nos quatro grupos (Controle, Cisp, CV+Cisp e CV)

<i>Parâmetro</i>	<i>Unidade</i>	<i>Controle</i>	<i>Cisplatina</i>	<i>CV+Cisp</i>	<i>CV</i>	<i>Figura</i>	<i>Pág.</i>
Viabilidade	%	92,76 (± 1,27)	71,08* (± 2,97)	83,04 [#] (± 1,66)	90,17 (± 0,93)	20	53
Apoptose (HE)	%	6,88 (± 0,60)	24,37* (± 1,56)	16,33 [#] (± 0,97)	8,27 (± 0,63)	21	54
Apoptose (FACS)	%	5,25 (± 0,87)	14,60* (± 1,61)	8,67 [#] (± 0,64)	5,07 (± 0,58)	22	55
Pro-caspase 3 (Western-blotting)	Densitometria relativa	0,87 (± 0,05)	1,05* (± 0,03)	1,03 (± 0,05)	0,96 (± 0,05)	24 A,C	57
Caspase 3 cliv. (Western-blotting)	Densitometria relativa	0,71 (± 0,08)	1,01* (± 0,07)	0,73 [#] (± 0,06)	0,84 (± 0,05)	24 B,D	57
Pro-caspase 9 (Western-blotting)	Densitometria relativa	0,76 (± 0,05)	1,13* (± 0,12)	0,79 [#] (± 0,05)	0,75 (± 0,05)	25 A,C	58
Caspase 9 cliv. (Western-blotting)	Densitometria relativa	0,45 (± 0,08)	0,48 (± 0,07)	0,44 (± 0,10)	0,45 (± 0,12)	23 B,D	58
Bax (Western-blotting)	Densitometria relativa	1,03 (± 0,08)	1,66* (± 0,13)	1,15 (± 0,18)	1,32 (± 0,09)	26	59
Bcl-x_L (Western-blotting)	Densitometria relativa	0,95 (± 0,06)	0,96 (± 0,29)	1,06 (± 0,20)	0,99 (± 0,15)	27	60
SIRT (Western-blotting)	Densitometria relativa	0,70 (± 0,09)	0,96 (± 0,13)	1,5 [#] (± 0,16)	1,12* (± 0,16)	28	61
RPE - DPPH	-	-	-	-	-	29	62
RPE - TEMPOL	-	-	-	-	-	30	63
Sequestro de Fe2+	-	-	-	-	-	31	64

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. nd: não detectado; * significativo para $p < 0,05$ (em relação ao controle); # significativo para $p < 0,05$ (em relação ao grupo cisplatina)

Resultados *in vivo*

1- Avaliação da função renal e da morfologia renal

1.1- Creatinina e uréia plasmáticas

O grupo Cisp apresentou concentrações de uréia e creatinina plasmáticas ($302,93 \pm 55,42$ mg/dL e $2,67 \pm 0,78$ mg/dL, respectivamente) significativamente superiores às do grupo Controle ($50,41 \pm 6,96$ mg/dL e $0,30 \pm 0,07$ mg/dL, respectivamente), comprovando o dano renal induzido pela cisplatina e validando o modelo experimental de nefrotoxicidade proposto. Os valores de uréia e creatinina diminuiram significativamente no grupo CV+Cisp ($97,84 \pm 54,82$ mg/dL e $0,78 \pm 0,56$ mg/dL) em relação ao grupo Cisp. Não houve diferença significativa entre os grupos Controle e CV (Figuras 3 e 4).

Figura 3: Concentração plasmática de creatinina em camundongos portadores de S-180. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

Figura 4: Concentração plasmática de uréia em camundongos portadores de S-180. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

1.2- Morfologia renal – coloração com hematoxilina e eosina (H&E)

A porcentagem de túbulos renais danificados no grupo Controle foi próxima de zero ($0,41 \pm 0,16$ %). No grupo Cisp houve um aumento significativo na taxa da lesão tubular ($70,47 \pm 1,68$ %), com presença maciça de corpos apoptóticos e “casts” protéicos. Ao comparar o grupo Cisp com o grupo CV+Cisp uma significativa proteção foi verificada, já que apenas $11,90 \pm 3,56$ % dos túbulos apresentaram-se danificados no grupo CV+Cisp. O grupo CV ($0,72 \pm 0,23$ %) apresentou morfologia semelhante à do grupo Controle (Figura 5).

A **B**

Figura 5: Morfologia renal após coloração H&E. (A) Fotomicrografias (x200) e (B) Porcentagem de túbulos renais danificados. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

2. Marcadores de estresse oxidativo – MDA e GSH

A significativa formação do marcador de peroxidação lipídica, MDA, no rim dos animais tratados com cisplatina ($3,13 \pm 0,99$ nmol/mg de proteína) em relação ao grupo Controle ($1,77 \pm 0,86$ nmol/mg de proteína) indica que as células do tecido sofreram estresse oxidativo, o que foi prevenido pelo tratamento concomitante com carvedilol, como demonstrado pela concentração de MDA no grupo CV+Cisp ($1,58 \pm 0,91$ nmol/mg proteína), significativamente menor que no grupo Cisp (Figura 6).

A concentração de glutathiona no homogenato renal diminuiu significativamente no grupo Cisp ($0,63 \pm 0,18$ nmol/mg proteína) em relação ao grupo Controle ($1,42 \pm 0,16$ nmol/mg proteína). O grupo CV+Cisp, entretanto, não apresentou um decréscimo tão acentuado ($1,06 \pm 0,37$ nmol/mg proteína) (Figura 7).

Figura 6: Concentração de MDA no homogenato renal de camundongos portadores de S-180. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

Figura 7: Concentração de GSH no homogenato renal de camundongos portadores de S-180. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

3. Avaliação da morte celular por apoptose e suas vias

3.1- Ensaio de TUNEL

O ensaio de TUNEL foi utilizado para verificação de apoptose *in situ* no tecido renal. O tratamento dos animais com cisplatina induziu apoptose na grande maioria das células avaliadas, apresentando valores mais de cem vezes superiores ($62.347,40 \pm 10.014,00$ pixels positivos ou ppc) aos do grupo Controle ($388,89 \pm 74,35$ ppc). No grupo CV+Cisp a apoptose observada foi significativamente menor ($4.661,95 \pm 1.879$ ppc) que no grupo Cisp., indicando que a morte celular por apoptose foi inibida com o uso do carvedilol. No grupo CV ($520,00 \pm 76,50$ ppc) a contagem de pixels positivos para o marcador de apoptose foi semelhante à do grupo Controle (Figura 8).

A

B

Figura 8: Avaliação de apoptose in situ através do ensaio de TUNEL. (A) Fotomicrografias (x200) e (B) quantificação de pixels positivos correspondentes à marcação de apoptose. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

3.2- Ensaios imuno-histoquímicos – Caspase-3, Bax e Bcl-x_L

Para avaliação das vias apoptóticas envolvidas na lesão tubular renal induzida pela cisplatina e os mecanismos de proteção do carvedilol, avaliamos três importantes proteínas: Caspase-3, caspase executora da apoptose; Bax, proteína pró-apoptótica; e Bcl-x_L, proteína anti-apoptótica.

Confirmando os resultados encontrados no ensaio de TUNEL, a marcação para caspase-3 clivada, que também indica ocorrência de apoptose, apresentou uma intensidade média mais de 70 vezes maior no grupo Cisp ($40.642,50 \pm 3.677,67$ ppc) em relação ao grupo Controle ($546,12 \pm 173,97$ ppc). No grupo CV+Cisp a contagem de pixels positivos para caspase-3 foi significativamente menor ($5.015,08 \pm 2.496,40$ ppc) que no grupo Cisp, indicando que a apoptose foi inibida pelo carvedilol (Figura 9).

A Bax também foi ativada pelo tratamento com cisplatina. Enquanto no grupo Controle a contagem de pixels positivos foi de apenas $661,55 \pm 157,10$ ppc, no grupo Cisp foi $15.171,10 \pm 3.179,00$ ppc. O carvedilol foi capaz de inibir o aumento da Bax, como verificado pela expressão significativamente menor no grupo CV+Cisp ($5.419,35 \pm 1.436,00$ ppc). Não houve diferença significativa na expressão de caspase-3 e Bax entre os grupos CV e Controle (Figura 10).

A expressão da Bcl-x_L não apresentou diferença significativa entre nenhum dos grupos analisados (Controle: $4.560,87 \pm 716,44$ ppc; Cisp $4.580,34 \pm 1.337,59$ ppc; CV+Cisp $6.572,96 \pm 1.760,27$ ppc). No entanto, pode-se observar uma tendência de aumento (diferença não significativa) na expressão de Bcl-x_L no grupo CV+Cisp (Figura 11).

A

B

Figura 9: Imuno-histoquímica para caspase-3 clivada. (A) Fotomicrografias (x200) e (B) Quantificação de pixels positivos correspondentes à presença de caspase-3 clivada no tecido. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

A

B

Figura 10: Imuno-histoquímica para Bax. (A) Fotomicrografias (x200) e (B) Quantificação de pixels positivos correspondentes à presença de Bax no tecido. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

A

B

Figura 11: Imuno-histoquímica para Bcl-xL (A) Fotomicrografias (x200) e (B) Quantificação de pixels positivos correspondentes à presença de Bcl-xL no tecido. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). # Significativamente diferente em relação ao grupo Cisp ($p < 0,05$).

4. Influência do carvedilol na atividade antitumoral da cisplatina

4.1- Determinação da platina – córtex renal e tumor

Não foi detectada presença de platina no córtex renal do grupo Controle ($0,002 \pm 0,003 \mu\text{g/g}$ tecido). Como o fármaco acumula-se no tecido renal, a concentração de platina no grupo Cisp foi significativamente maior ($36,36 \pm 12,09 \mu\text{g/g}$ tecido). Não foi observada diferença significativa na concentração renal de platina entre os grupos Cisp e CV+Cisp ($34,93 \pm 14,42 \mu\text{g/g}$ tecido) (Figura 12).

O perfil da biodistribuição de platina no tumor foi semelhante ao renal. Os valores encontrados no grupos Cisp e significativamente maior ($17,65 \pm 8,20 \mu\text{g/g}$ tecido) do que no Controle ($0,002 \pm 0,005 \mu\text{g/g}$ tecido), enquanto no grupo CV+Cisp ($20,11 \pm 7,10 \mu\text{g/g}$ tecido) o valor foi semelhante ao do grupo Cisp (Figura 13).

As concentrações de platina no grupo CV foram: $0,41 \pm 0,24 \mu\text{g/g}$ tecido renal e $0,09 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$ tecido tumoral. Embora sejam valores muito baixos, foram significativamente maiores que os respectivos grupos controle. Esta variação poderia ser atribuída à algum tipo de contaminação entre os animais, uma vez que a platina não está presente no ambiente e só poderia chegar ao organismo dos animais através da administração da cisplatina.

Figura 12: Concentração de platina no homogenato renal de camundongos portadores de S-180. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$).

Figura 13: Concentração de platina na massa tumoral de camundongos portadores de S-180. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$).

4.2- Avaliação do desenvolvimento do tumor: massa tumoral e taxa de remissão do tumor

A massa tumoral foi significativamente menor no grupo Cisp ($0,17 \pm 0,09$ g/g tecido) quando comparado ao grupo Controle ($0,46 \pm 0,16$ g/g tecido). Não houve diferença significativa entre o grupo Controle e o grupo CV ($0,45 \pm 0,24$ g/g tecido) ou entre o grupo CV+Cisp ($0,14 \pm 0,06$ g/g tecido) e o grupo Cisp (Figura 14).

A taxa de remissão do tumor foi calculada a partir das médias da massa tumoral obtidas em cada grupo e considerando-se a massa tumoral do grupo controle como sendo 100% (taxa de remissão 0%). Nos grupos Cisp e CV+ Cisp a taxa de remissão do tumor foi maior que 60%, não havendo diferença significativa entre ambos. No grupo CV, a taxa de remissão foi de apenas 2%, sem diferença significativa em relação ao grupo Controle (Tabela 7).

4.3- Sobrevida dos Animais

Para analisar a sobrevida foi utilizado um gráfico com a porcentagem de camundongos vivos em função do número de dias de sobrevivência, sendo que cada ponto corresponde à morte de um animal, ou seja, ao número de dias que cada camundongo sobreviveu após o tratamento. Foi utilizado um número menor de amostras ($n=6$) neste experimento para minimizar o sofrimento dos animais. O grupo Controle e CV apresentaram traçados muito semelhantes; nestes grupos a morte dos animais se deu pelo aumento progressivo do tumor, começando em torno de 60 dias após o início do tratamento. Após aproximadamente 100 dias, todos os animais já haviam morrido.

Nos grupos Cisp e CV+Cisp a sobrevida foi maior. Enquanto alguns animais morreram nos primeiros dias após o tratamento, principalmente no grupo Cisp, os demais sobreviveram por períodos mais longos (maiores que 100 dias, podendo chegar a 400 dias), e apresentaram remissão completa ou quase completa da massa tumoral. (Figura 15).

Figura 14: Massa tumoral dos camundongos portadores de S-180 após 3 dias de tratamento. Os valores são expressos como média $\pm$ desvio padrão da média. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. * Significativamente diferente em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$).

Tabela 7: Taxa de remissão do tumor dos grupos de animais tratados em relação ao grupo Controle.

Grupo	Taxa de remissão (%)
Cisp	63,04
CV+Cisp	69,57
CV	2,17

As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos. A massa tumoral do Grupo Controle foi considerada 100%.

Figura 15: Curvas de sobrevivência dos quatro grupos de tratamento. As condições experimentais e analíticas estão descritas em Materiais e Métodos.

4.4 - Avaliação da mutagenicidade induzida pela cisplatina-Micronúcleo e Determinação da Taxa de Eritrócitos Policromáticos em Medula Óssea (relação PCE/NCE)

O teste do micronúcleo foi realizado em sangue periférico ao final das 72 horas de tratamento, entretanto, não foi possível contar 1000 eritrócitos policromáticos ou imaturos (PCE) no grupo Cisp. Na análise de três lâminas de animais diferentes foi encontrada uma média de 26,5 PCEs por lâmina do grupo Cisp (Figura 16) e optamos por avaliar, após 72 horas do início do tratamento, a toxicidade celular em medula óssea.

No teste de micronúcleo foram observados apenas $1,75 \pm 1,01$ e $1,25 \pm 0,28$ eritrócitos policromáticos micronucleados (PCMN) por 1000 eritrócitos policromáticos (PCE) nos grupos Controle e CV, respectivamente. No grupo Cisp a quantidade de PCMN foi significativamente maior ($8,03 \pm 1,16$ PCMN/1000 PCE) do que no grupo Controle. A quantidade de PCMN encontrada no sangue periférico dos animais do grupo CV+Cisp ($7,40 \pm 1,11$ PCMN/1000 PCE) foi semelhante à encontrada no grupo Cisp (Figura 17).

A relação PCE/NCE encontrada nas amostras de medula óssea após 72 horas de tratamento foi de $0,34 \pm 0,05$ para o grupo Controle; enquanto no grupo Cisp foi apenas $0,02 \pm 0,01$. A quantidade de eritrócitos policromáticos encontrada no esfregaço de medula óssea para o grupo CV+Cisp ($0,02 \pm 0,00$) não foi significativamente diferente da do grupo Cisp e também não houve diferença significativa entre os grupos CV ($0,40 \pm 0,06$) e Controle (Figura 18).

A

B

Figura 16: Teste de Micronúcleo. (A) Fotomicrografias de eritrócitos policromáticos (setas amarelas) e eritrócitos policromáticos micronucleados (asteriscos) sob microscopia de fluorescência (x1000) e (B) Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) por 1000 eritrócitos policromáticos (PCE). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

Figura 17: Fotomicrografia de esfregaço de sangue periférico após 72 horas de tratamento; corado com laranja de acridina e analisado sob microscopia de fluorescência (x1000). Eritrócitos policromáticos - PCE (setas amarelas). As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

A

B

Figura 18: (A) Eritrócitos policromáticos (setas azuis) e eritrócitos normocromáticos (setas vermelhas) avaliados em esfregaço de medula óssea corada com Giemsa, sob microscopia óptica (x1000) (B) Relação PCE/NCE após 72 horas de tratamento. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

Resultados *in vitro*

1- Determinação da concentração de cisplatina e carvedilol para ensaios com as células HK-2

As concentrações de trabalho da cisplatina e do carvedilol foram determinadas após contagem de células e corpos apoptóticos como descrito em no item 10.2- “Análise da apoptose após coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)” da seção IV- “Materiais e Métodos”.

Os testes iniciais foram realizados com as seguintes concentrações: 12,5; 25; 50 e 100µM de cisplatina e 5, 25 e 50µM de carvedilol. A menor concentração de cisplatina que induziu apoptose de forma significativa quando comparada ao grupo Controle ($8,43 \pm 1,10\%$ de apoptose) foi 25µM ($29,21 \pm 2,68\%$ de apoptose) e por esta razão foi utilizada nos ensaios *in vitro*. Nos ensaios com carvedilol, apesar de nenhuma das doses testadas ter induzido apoptose significativamente em relação ao Controle, a dose de 50µM se mostrou potencialmente protetora contra a apoptose induzida por 25µM de cisplatina (Cisp + CV 50µM: $19,11 \pm 1,11\%$ de apoptose), como mostra a Figura 19.

Figura 19: Efeito da cisplatina e do carvedilol na indução da apoptose em células HK-2 analisada por H&E. (A) Porcentagem de células apoptóticas na presença de diferentes concentrações de cisplatina; (B) Porcentagem de células apoptóticas na presença de diferentes concentrações de carvedilol e (C) Porcentagem de células apoptóticas na presença de diferentes concentrações de carvedilol (5, 25 e 50µM) combinadas com cisplatina 25µM. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

2- Viabilidade celular

Enquanto no grupo Controle a viabilidade foi de $92,76 \pm 1,27\%$, no grupo Cisp ($71,08 \pm 2,97\%$) houve uma diminuição significativa, de aproximadamente 20%, no número de células viáveis (não coradas pelo azul de Trypan). A viabilidade celular no grupo CV+Cisp ($83,04 \pm 1,66\%$) foi significativamente maior que no grupo Cisp. O carvedilol (CV $90,17 \pm 0,93\%$) não alterou a viabilidade quando comparado ao Controle (Figura 20).

Figura 20: Viabilidade celular determinada através da coloração com azul de Trypan. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

3- Avaliação da apoptose

3.1- Coloração com Hematoxilina e Eosina - HE

Um dos ensaios escolhidos para determinar apoptose induzida pela cisplatina e a possível proteção do carvedilol foi análise morfológica das células fixadas em lamínulas de vidro e posteriormente coradas com HE. Os parâmetros para análise estão descritos no item 10.2-“Análise da apoptose após coloração com Hematoxilina e Eosina (HE)” da secção IV- “Materiais e Métodos”.

As células HK-2 tratadas apenas com cisplatina apresentaram uma indução significativa da apoptose em relação ao grupo Controle (Controle $6,88 \pm 0,60\%$; Cisp $23,83 \pm 1,60\%$), confirmando os resultados obtidos na determinação da curva dose-resposta. No grupo CV+Cisp ($16,33 \pm 0,97\%$) a apoptose foi

significativamente menor que no grupo Cisp, enquanto o grupo CV ($8,27 \pm 0,63\%$) apresentou resultados semelhantes ao grupo Controle (Figura 21).

Figura 21: Determinação da apoptose baseada na análise da morfologia após coloração HE. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

3.2- Citometria de Fluxo (FACS)

A apoptose também foi avaliada através da coloração com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo. Foram demonstradas a indução da apoptose por cisplatina (Controle $5,25 \pm 0,87\%$; Cisp $14,60 \pm 1,61\%$) e a proteção resultante do tratamento concomitante com carvedilol (CV+Cisp $8,67 \pm 0,64\%$), como apresentado na Figura 22. A Figura 23 mostra o histograma das fases do ciclo celular obtidos pela citometria de fluxo e a região (P2) escolhida para quantificar a apoptose.

Figura 22: Porcentagem de células apoptóticas após coloração com iodeto de propídeo e análise por citometria de fluxo. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

Figura 23: Histograma obtido pelo citômetro de fluxo com indicação da região (P2) utilizado utilizada para quantificação das células apoptóticas. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

4- Avaliação de Caspase-3, Caspase-9, Bax, Bcl-x_L e SIRT-1 por Western-blotting

Os resultados estão expressos como relação da densitometria da proteína em análise e a densitometria da GAPDH, como descrito no item 10.4-“Detecção de proteínas da via apoptótica por Western-blotting” da seção IV-“Materiais e Métodos”.

4.1 – Avaliação da caspase-3

A densidade da pro-caspase 3 (32KDa) e da caspase-3 clivada (21KDa) estão representadas na Figura 24. As células HK-2 do grupo Cisp apresentaram expressão significativamente aumentada da pro-caspase-3 ($1,05 \pm 0,02$) em relação ao grupo Controle ($0,86 \pm 0,05$), entretanto não houve diferença entre os grupos Cisp e CV+Cisp ($1,03 \pm 0,05$). No entanto, ao analisar o pico de 21 kDa, os resultados observados demonstraram que houve significativa clivagem da caspase-3 o grupo Cisp ($1,01 \pm 0,07$) quando comparado ao grupo Controle ($0,71 \pm 0,08$), e adicionalmente, o grupo CV+Cisp ($0,73 \pm 0,06$) apresentou uma expressão da caspase-3 clivada significativamente menor do que o grupo Cisp e semelhante à do grupo Controle, indicando proteção contra a ativação da caspase-3.

Figura 24: Avaliação da caspase-3 em células HK-2 por Western-blotting. (A) Densitometria relativa para pro-caspase-3 e (B) Densitometria relativa para caspase-3 clivada. Representação das bandas correspondentes aos picos de (C) 32 KDa e (D) 21 KDa. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

4.2 – Avaliação da caspase-9

A expressão da caspase-9, proteína responsável pela ativação da via apoptótica mitocondrial também foi avaliada por Western-blotting. A densitometria relativa foi avaliada tanto para a pro-caspase-9 (45KDa) quanto para caspase-9 clivada (35KDa). A expressão da pro-caspase-9 aumentou significativamente no grupo Cisp ($1,12 \pm 0,12$) quando comparado ao grupo Controle ($0,76 \pm 0,05$); enquanto no grupo CV+Cisp ($0,79 \pm 0,05$) houve diminuição significativa com relação ao grupo Cisp. Não houve diferença significativa entre os grupos para a expressão da caspase-9 clivada (Figura 25).

Figura 25: Avaliação da caspase-9 em células HK-2 por Western-blotting. (A) Densitometria relativa para pro-caspase-9 e (B) Densitometria relativa para caspase-9 clivada. Representação das bandas correspondentes aos picos de (C) 45 KDa e (D) 35 KDa. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

4.3 – Avaliação da Bax

A expressão da Bax aumentou significativamente no grupo Cisp ($1,66 \pm 0,07$) quando comparado ao grupo Controle ($1,03 \pm 0,08$). Apesar dos valores observados no grupo CV+Cisp ($1,15 \pm 0,18$) serem menores do que os encontrados no grupo Cisp, a diferença não foi significativa, o que provavelmente ocorreu devido ao maior erro padrão da média (SEM) naquele grupo. Também não foram observadas diferenças entre os grupos Controle ($1,03 \pm 0,08$) e CV ($1,32 \pm 0,09$). Os resultados são apresentados na Figura 26.

Figura 26: Avaliação da proteína Bax em células HK-2 por Western-blotting. (A) Densitometria relativa para Bax e (B) Representação das bandas correspondentes ao pico de 23 KDa. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

4.4 – Avaliação da Bcl-x_L

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-x_L. A densitometria relativa encontrada em cada um dos grupos foi: $0,95 \pm 0,06$ para o grupo Controle; $0,96 \pm 0,12$ para o grupo Cisp; $1,01 \pm 0,19$ para o grupo CV+Cisp e $0,99 \pm 0,15$ para o grupo CV. Os resultados são apresentados na Figura 27.

Figura 27: Avaliação da proteína Bcl-x_L em células HK-2 por Western-blotting. (A) Densitometria relativa para Bcl-x_L e (B) Representação das bandas correspondentes ao pico de 30 KDa. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

4.5 – Avaliação da SIRT-1

A expressão da SIRT1 apresentou-se significativamente aumentada no grupo CV+Cisp ($1,50 \pm 0,16$), quando comparado ao grupo Cisp ($0,96 \pm 0,13$), porém não houve diferença significativa entre os grupos Cisp e Controle ($0,70 \pm 0,09$), ou entre os grupos CV ($1,12 \pm 0,16$) e Controle (Figura 28).

Figura 28: Avaliação da proteína SIRT-1 em células HK-2 por Western-blotting. (A) Densitometria relativa para SIRT-1 e (B) Representação das bandas correspondentes ao pico de 120 KDa. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos. *Significativamente diferente do grupo Controle ($p < 0,05$); # Significativamente diferente do grupo Cisp ($p < 0,05$).

5- Mecanismo antioxidante do carvedilol

5.1- Ressonância Paramagnética Nuclear (RPE)

A capacidade do carvedilol de sequestrar radicais livres foi avaliada por RPE na presença dos radicais livres DPPH e TEMPOL. O carvedilol não foi capaz de sequestrar os radicais livres analisados, mesmo quando adicionado em maior concentração (5mM). Apesar da diminuição observável no sinal do espectro na presença do DPPH, não se pode afirmar que o carvedilol possua boa capacidade sequestradora de elétrons livres, uma vez que o fármaco estava presente em concentração 10 vezes superior à do radical livre, o que deveria aniquilar o sinal e não simplesmente reduzi-lo. Quanto ao radical TEMPOL, não foi observada redução alguma do sinal, mesmo na presença de carvedilol em concentração 50 vezes superior à do radical livre. Como os resultados preliminares foram negativos, não foram avaliadas outras concentrações e não foi feita a curva cinética do carvedilol. Os resultados estão apresentados nas Figuras 29 e 30.

Figura 29: Espectro da ressonância paramagnética de elétrons (RPE) para o radical livre DPPH (500µM), na presença de veículo (DMSO), de carvedilol 5µM e carvedilol 5mM. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

Figura 30: Espectro da ressonância paramagnética de elétrons (RPE) para o radical livre TEMPOL (100μM) na presença de veículo (DMSO), de carvedilol 5μM e de carvedilol 5mM. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

5.2- Capacidade de quelar íons ferrosos

Apesar do carvedilol não ter sido capaz de sequestrar radicais livres, o fármaco se mostrou um eficiente quelante de íon ferrosos. A detecção do íon ferroso por reação de cor com a batofenantrolina e detecção por espectrofotometria mostrou uma diminuição linear na concentração inicial do íon ferroso, que foi de aproximadamente 40μM, após a correção feita pela curva de calibração de Fe^{2+} ($y=0,0194x + 0,3883$; $r^2=0,9787$). As concentrações carvedilol utilizadas foram: 50, 75, 100, 150 e 200 μM. A curva de decaimento dos íons ferrosos em função da concentração de carvedilol, bem como a equação da reta e o r-quadrado estão representados na Figura 31.

Figura 31: Relação entre a concentração de íon ferroso e concentração de carvedilol (0, 50, 75, 100, 150 e 200 μM) após reação com batofenantrolina e análise espectrofotométrica. As condições experimentais estão descritas em Materiais e Métodos.

DISCUSSÃO

VI- DISCUSSÃO

A cisplatina é um dos principais fármacos usados no tratamento de tumores sólidos, porém a nefrotoxicidade limita seu uso. Além de serem responsáveis por grande parte da excreção da cisplatina, os rins também são o sítio primário de acumulação da cisplatina. A cisplatina é responsável por vários efeitos adversos, como falência renal aguda e crônica, perda renal de magnésio e poliúria. Pacientes em tratamento com cisplatina perdem de 10 a 30% da função renal e aproximadamente 25% dos pacientes que recebem altas doses de cisplatina desenvolvem disfunção renal severa (YAO et al., 2007). Pesquisas têm demonstrado que a lesão renal causada pela cisplatina é um processo multifatorial, o qual é ativado por diversas vias, culminando em lesão dos túbulos proximais renais, principalmente da porção S3, com consequente perda da função renal (LIEBERTHAL; TRIACA; LEVINE, 1996; PABLA; DONG, 2008)

A integridade funcional dos rins é fundamental para a manutenção da homeostase corpórea, pois os rins exercem papel central na excreção de metabólitos, na regulação do volume de fluido extracelular, composição de eletrólitos e balanço ácido-básico. Além disso, os rins sintetizam e liberam hormônios e metabolizam a vitamina D. Efeitos tóxicos sobre os rins podem alterar algumas ou todas estas funções alterando profundamente o metabolismo geral (SCHENELLMANN, 2001).

Devido à importância da cisplatina no tratamento de diversos tipos de tumores, vários pesquisadores têm buscado formas de diminuir a nefrotoxicidade decorrente da sua administração, a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes e possibilitar o aumento da dose e consequentemente da eficácia terapêutica. Estudos experimentais têm demonstrado a eficiência de vários antioxidantes na minimização da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, como por exemplo, vitamina C (TARLADACALISIR; KANTER; UYGUN, 2008), vitamina E (AJITH et al., 2009), resveratrol (DO AMARAL et al., 2008), quercetina (FRANCESCATO et al., 2004), dimetiltiouréia (SANTOS, N. A. et al., 2008) N-acetilcisteína (DICKY et al., 2005). No entanto, a influência destes compostos na atividade antitumoral da cisplatina não foi ainda avaliada. Recentemente o nosso grupo demonstrou a eficácia nefroprotetora do carvedilol administrado a ratos saudáveis tratados com cisplatina (RODRIGUES et al., 2010; 2011). No presente estudo foi demonstrado o efeito nefroprotetor do carvedilol em camundongos

portadores de tumor e tratados com cisplatina, e mais importante, foi demonstrado que a nefroproteção do carvedilol não está associada à diminuição da atividade antitumoral da cisplatina, achado fundamental para uma futura utilização clínica do carvedilol como adjuvante na quimioterapia com cisplatina.

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

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

Nossos achados experimentais mostraram um aumento expressivo nos dois marcadores de função renal, ureia e creatinina, nos camundongos tratados com 25 mg/kg de cisplatina. Um aumento semelhante na concentração dos dois marcadores foi descrito em um estudo anterior, no qual os camundongos (sem tumores) foram tratados com 30mg de cisplatina/kg (i.p.) e as concentrações de uréia e creatinina aumentaram respectivamente de 50 mg/dL e 0,3mg/dL no grupo controle (tratado apenas com salina) para 180 mg/dL e 3,1 mg/dL no grupo tratado com cisplatina (WEI et al., 2007) .

No nosso estudo, o tratamento com carvedilol provocou uma redução significativa na concentração dos marcadores de função renal quando comparado ao grupo Cisp. Esses resultados são condizentes aos encontrados anteriormente por nosso grupo ao avaliar a nefroproteção do carvedilol frente à toxicidade induzida por cisplatina em ratos saudáveis tratados com 10 mg/kg de cisplatina (RODRIGUES et al., 2010; 2011). Nos dois modelos animais o carvedilol mostrou-se um potente nefroprotetor, sem alterar a função renal dos animais quando administrado isoladamente.

O ensaio histopatológico confirmou a lesão nos túbulos renais induzida pela cisplatina, bem como a proteção significativa exercida pelo carvedilol. O alvo primário da cisplatina é descrito como sendo a porção S3 dos túbulos proximais renais, porém, lesões nas porções S1, S2 e em outras estruturas renais como túbulos distais e glomérulos já foram descritas (SCHENELLMANN, 2001). Num estudo realizado em ratos, no terceiro dia após o tratamento com 6mg/kg de cisplatina, ficaram evidentes alterações no segmento S3 dos túbulos proximais, também foram observados: perda de porção hialina nos túbulos, intumescimento celular, condensação cromatínica do DNA e alguns focos de necrose (DOBYAN et al., 1980). A análise microscópica ótica e eletrônica de rins humanos provenientes de autópsia de pacientes em tratamento com cisplatina mostrou lesões renais em diversos estágios, sendo que as seguintes alterações foram comuns em quase todos pacientes: dilatação nos túbulos proximais e distais, com granulações no lúmen e “casts” protéicos; intumescimento celular; degeneração vacuolar; necrose; e descamação das células epiteliais nos túbulos proximais (TANAKA et al., 1986).

A morfologia renal de camundongos tratados com cisplatina tem sido descrita de forma semelhante por diversos autores, como uma degeneração nos túbulos proximais com perda de células epiteliais e formação de “casts” intraluminais (EL-BESHBISHY et al., 2011; FOUAD et al., 2010; MUKHOPADHYAY et al., 2011). Um estudo com camundongos albinos tratados com 4 doses de 12mg/kg de cisplatina e ácido alfa-lipóico (ALA) por 18 dias reporta degeneração tubular e o descolamento do epitélio tubular induzidos pela cisplatina, bem como o efeito protetor do ALA contra estas alterações histopatológicas (EL-BESHBISHY et al., 2011). Outro estudo com a mesma linhagem de camundongos apresentou morfologia renal semelhante após uma dose única de 5mg/kg de cisplatina e constata a proteção contra estas alterações conferida pela administração de coenzima Q10 (FOUAD et al., 2010).

Camundongos da linhagem C57Bl/6J foram tratados com a mesma dose de cisplatina que utilizamos em nosso trabalho (25mg/kg) e cujos tecidos foram submetidos à coloração de PAS (“periodic acid-Schiff”) também reportaram alterações histopatológicas semelhantes (MUKHOPADHYAY et al., 2011).

Uma importante via pela qual a cisplatina induz morte das células renais é a via apoptótica, que pode ser ativada durante o quadro de estresse oxidativo, que se estabelece tanto pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) como pela depleção do sistema antioxidante mitocondrial (SANTOS, N. A. et al., 2007).

Dentre os vários alvos biológicos do estresse oxidativo, os lipídeos constituem a classe de moléculas que mais sofrem danos e devido isto, a peroxidação lipídica é utilizada como marcador de estresse oxidativo. Peróxidos lipídicos derivados de ácidos graxos poliinsaturados são instáveis e se decompõem formando uma série de compostos carbonil reativos, dentre eles o MDA (malondialdeído). O malondialdeído (MDA) é um produto secundário da peroxidação lipídica e pode exacerbar o dano oxidativo ao se combinar a vários grupos funcionais de proteínas, lipoproteínas, DNA e RNA. Os aldeídos são potentes inibidores enzimáticos, pois podem se ligar aos grupos nucleofílicos de alguns aminoácidos (tirosina, cisteína, serina lisina, histidina), componentes críticos dos sítios ativos enzimáticos e necessários para a manutenção da estrutura terciária das enzimas (ESTERBAUER;SCHAUR;ZOLLNER, 1991). Assim, a determinação do MDA em amostras biológicas tem sido usada como indicador da peroxidação lipídica *in vivo* e *in vitro* desde a década de 1960 por diferentes métodos (BEYAERT;FIERS, 1994; DEL RIO;STEWART;PELLEGRINI, 2005)

No presente estudo a concentração de MDA foi determinada no homogenato renal através da detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e mostrou a proteção do carvedilol contra a lipoperoxidação induzida pela cisplatina.

A glutatona reduzida foi outro marcador utilizado para detectar o estresse oxidativo. A depleção da glutatona é um dos eventos iniciais e determinantes no mecanismo mitocondrial de estresse oxidativo. Os eventos que envolvem a citotoxicidade induzida pela cisplatina ocorrem após a depleção da GSH e a lipoperoxidação lipídica (KIM, S. H. et al., 2005).

A glutatona e o NADPH estão envolvidos na proteção da mitocôndria contra o estresse oxidativo, inibindo a lesão mediada por radicais livres através da conversão

do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e conseqüentemente da manutenção do ambiente celular reduzido (SOMANI et al., 2000; TURRENS, 2003). A glutathiona reduzida (GSH) pode ser oxidada pela ação da glutathiona peroxidase, formando glutathiona dissulfeto (GSSG) a qual é tóxica para a célula pela formação de derivados cisteinil, especialmente na presença de metais de transição (NAKAGAWA et al., 2000). A GSSG pode retornar à forma reduzida (GSH), por uma reação catalisada pela enzima glutathiona redutase, na presença de NADPH; entretanto, para que esse ciclo de reações ocorra, culminando na redução de peróxidos lipídicos e na conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à H_2O e, que adicionalmente ainda mantenha a capacidade antioxidante, é necessário que haja uma eficiente função bioenergética mitocondrial (STOWE;CAMARA, 2009). Achados que confirmam a indução do estresse oxidativo com indução de peroxidação lipídica e depleção da glutathiona em rins de animais não portadores de tumor, tratados com cisplatina, são comuns na literatura (DILLIOGLUGIL et al., 2005; KORKMAZ;KOLANKAYA, 2009; SANTOS, N. A. et al., 2007; SILICI et al., 2011). No presente estudo esses achados foram confirmados no modelo experimental portador de tumor; adicionalmente, foi demonstrado que o carvedilol reduziu a lipoperoxidação e preservou a glutathiona reduzida no grupo CV+Cisp quando comparado ao grupo tratado apenas com a cisplatina.

Estudos propõem a apoptose, particularmente aquela mediada pela via mitocondrial, como o principal mecanismo de morte celular associado à nefrotoxicidade induzida pela cisplatina (PABLA;DONG, 2008). No presente estudo o ensaio de TUNEL revelou um alto índice de apoptose nos animais tratados com cisplatina e uma redução significativa na marcação no grupo tratado com cisplatina e carvedilol. O resultado foi confirmado nos ensaios de determinação da caspase-3 clivada, o executor final da apoptose.

Para ativação da via apoptótica mitocondrial, a cisplatina recruta as proteínas Bax e Bak, que induzem dano à membrana mitocondrial levando à liberação do citocromo-c, formação do complexo Apaf-1/citocromo-c (apoptossomo), ativação da caspase-9 (iniciadora) e ativação da caspase-3 (CULLEN et al., 2007; KAUSHAL et al., 2001; LEE, R. H. et al., 2001; PARK;DE LEON;DEVARAJAN, 2002; WEI et al., 2007).

Por outro lado, proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, como a Bcl-2 e a Bcl-x_L, atuam preservando a integridade mitocondrial, prevenindo a liberação do citocromo-c e a ativação da via apoptótica mitocondrial (ADAMS;CORY, 2001).

A ativação da Bax na cascata apoptótica parece ter um importante papel na toxicidade renal da cisplatina *in vivo*, com uma contribuição de 30-40% na indução de apoptose. A expressão da proteína se inicia no primeiro dia após o tratamento com cisplatina, mesmo antes de evidências morfológicas de lesão renal. No entanto, o bloqueio da Bax apenas diminui a morte por apoptose, mas não é suficiente para inibi-la por completo, o que sugere a participação de outras vias (WEI et al., 2007). No presente estudo, o carvedilol foi capaz de diminuir a expressão da Bax de forma significativa, além de diminuir o total de células apoptóticas nos túbulos renais. O mecanismo pelo qual o carvedilol atua como protetor parece estar diretamente ligado à sua capacidade antioxidante, porém sua atividade nefroprotetora também pode estar associada à suas outras propriedades, tais como: anti-inflamatória, antagonista de cálcio, imunomoduladora e anti-fibrótica (PAUSCHINGER et al., 2005; STAFYLAS;SARAFIDIS, 2008). De maneira similar, o efeito protetor do ácido lipóico, que também tem propriedades antioxidantes, foi demonstrado em ratos tratados com cisplatina e foi associado à diminuição da apoptose das células tubulares renais, atenuação da translocação da Bax mitocondrial e diminuição da expressão das caspases 3 e 9 (LEE, Y. M. et al., 2009)(LEE, Y. M. et al., 2009)(LEE, Y. M. et al., 2009)(LEE, Y. M. et al., 2009).

A geração de espécies reativas de oxigênio leva não só a um aumento nos níveis de proteínas pró-apoptóticas, como Bax e Bak, mas também à diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-x_L (JIANG et al., 2006; LI et al., 2004). O tratamento com cisplatina sabidamente aumenta a geração de ERO; entretanto, não foi possível observar diminuição significativa de Bcl-x_L entre os animais tratados com cisplatina. Apenas o grupo CV+Cisp apresentou um pequeno aumento (não significativo) na expressão da Bcl-x_L. Há controvérsias nos resultados dos estudos com relação ao efeito da cisplatina na expressão da Bcl-x_L. O aumento da expressão da Bcl-x_L induzido pela cisplatina foi demonstrado em cultura de células tubulares proximais renais de camundongo (KIM, D. H. et al., 2011), porém não foi observado em um estudo *in vivo* com camundongos tratados com cisplatina (KANG et al., 2011).

Assim, com os ensaios acima descritos, foi possível demonstrar o potencial protetor do carvedilol contra a nefrotoxicidade da cisplatina em um modelo experimental portador de tumor, mas o objetivo principal do estudo era investigar se o carvedilol, quando administrado em doses nefroprotetoras, interferiria na atividade antitumoral do quimioterápico. Para isso utilizamos o mesmo modelo de tumor sólido (Sarcoma180 em camundongos) usado na década de 60 para demonstrar que cisplatina tinha atividade antitumoral (ROSENBERG et al., 1969). Para investigar a possível interferência do carvedilol na atividade antitumoral da cisplatina avaliamos: (i) a biodistribuição da platina nos rins e nos tumores, (ii) o desenvolvimento do tumor (massa tumoral e taxa de remissão do tumor), (iii) a sobrevida dos animais e (iv) a mutagenicidade da cisplatina.

Embora os efeitos nefrotóxicos e antitumorais da cisplatina não estejam associados à concentração de platina em si (TANAKA et al., 1986), a quantificação da platina foi usada em nosso estudo como meio de avaliar a concentração do fármaco nos rins e no tumor. A quantificação de platina em matrizes biológicas é considerada um pré-requisito para entender a farmacocinética dos agentes antitumorais que possuem platina em sua molécula (NISAR;FEINFELD, 2002).

O carvedilol não alterou a distribuição da platina nos rim e no tumor. Desta forma, pode-se inferir que o seu efeito protetor não depende da diminuição da concentração do fármaco nos rins e, por conseguinte que o carvedilol não impede a cisplatina de atingir o seu alvo, o tumor. Logo, o mecanismo protetor provavelmente não envolve a formação de complexos inativos, como ocorre, por exemplo, no caso dos compostos tiólicos (KRONING;LICHTENSTEIN;NAGAMI, 2000).

De acordo com nossos achados a concentração de platina nos rins foi quase duas vezes maior que aquela encontrada no tumor. Como a excreção da cisplatina é quase que exclusivamente renal, nossos resultados estão em linha com achados anteriores que indicam que a concentração de cisplatina nas células renais supera, inclusive, a sua concentração sérica (KUHLMANN;BURKHARDT;KOHLE, 1997).

Após apenas 72 horas de tratamento foi possível observar uma taxa de remissão da massa tumoral acima de 60% nos animais submetidos ao tratamento com cisplatina, na presença ou não do carvedilol, o que indica que o carvedilol não alterou o efeito antitumoral da cisplatina. Os dados de sobrevida também sugerem que o carvedilol não interfere na atividade antitumoral da cisplatina. Nos grupos não tratados com cisplatina (Controle e CV) todos os animais morreram em

aproximadamente 100 dias, em consequência do desenvolvimento do tumor. Nos dois grupos tratados com cisplatina (Cisp e CV+Cisp), parte dos animais não sobreviveu mais que 200 dias, porém outra parte sobreviveu por mais de 1 ano e teve remissão completa do tumor. Comparando-se os grupos Cisp e CV+Cisp, neste último, um menor número de animais morreu nos primeiros dias após o tratamento, o que poderia ser atribuído à nefroproteção exercida pelo carvedilol neste grupo.

O teste de micronúcleo (MN) é um ensaio capaz de detectar a capacidade mutagênica de agentes químicos e físicos. Embora a ação mutagênica da cisplatina também acarrete danos nas células saudáveis, seus efeitos nas células tumorais são mais pronunciados, uma vez que estas células se encontram em processo de divisão celular descontrolada. Há outros mecanismos envolvidos na ação citotóxica da cisplatina, particularmente aqueles relacionados à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), no entanto, acredita-se que a ação mutagênica seja o principal mecanismo envolvido na ação antitumoral da cisplatina e que as ERO sejam as principais responsáveis pela toxicidade sobre os tecidos saudáveis, particularmente a nefrotoxicidade (CAMPBELL;KINDLER, 2011; KADIKOYLU et al., 2004; SANTOS, N. A. et al., 2008).

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de micronúcleo, a cisplatina induziu mutagenicidade após 24 horas de tratamento e mielossupressão após 72 horas. O carvedilol não alterou tais efeitos. Contrariamente, outros antioxidantes como o ácido glicirrízico (CIARIMBOLI et al., 2010), resveratrol (TANIHARA et al., 2009) e ácido tânico (AHMAD;SULTANA, 2011) são capazes de inibir a mutagenicidade induzida pela cisplatina. No entanto, não há dados quanto à capacidade destes compostos de interferir na atividade antitumoral da cisplatina. O mesmo ocorre com relação a vários outros antioxidantes (N-acetilcisteína, glutathione, DMTU, licopeno, vitaminas C e E, glutamina, capsaicina, resveratrol) cujo potencial nefroprotetor tem sido sugerido, porém, os efeitos sobre atividade quimioterápica da cisplatina não foram estudados (PABLA;DONG, 2008).

Apenas alguns nefroprotetores foram avaliados em modelos tumorais. Um exemplo é a quercetina, que administrada em conjunto com a cisplatina em ratos portadores de adenocarcinoma de mama diminuiu os sinais de nefrotoxicidade e não alterou a atividade quimioterápica (BORCH;MARKMAN, 1989). Outro estudo avaliou a influência da fosfoquinase C (PKC δ) – uma enzima com um importante papel regulatório em uma variedade de processos celulares, incluindo a apoptose – na

modulação da nefrotoxicidade da cisplatina em modelos animal de camundongo inoculado com células de câncer de mama. Os animais que também receberam um inibidor da PKC δ (rottlerin) apresentaram menor nefrotoxicidade e não houve influência na atividade antitumoral da cisplatina (PABLA et al., 2011).

No presente estudo também foram realizados ensaios *in vitro* com células HK-2 a fim de delinear melhor os mecanismos de nefroproteção do carvedilol. Essa linhagem celular foi escolhida por se tratar de células normais do epitélio tubular renal humano, e, portanto, sensíveis ao dano induzido pela cisplatina (DAVIDSON et al., 2005). Os resultados obtidos nestes ensaios *in vitro*, confirmaram e deram maior suporte aos achados nos modelos *in vivo*, com e sem tumor.

Enquanto a morte de células HK-2 induzidas por cisplatina é um achado comum na literatura (DAVIDSON et al., 2005; MORAIS et al., 2006), a proteção contra tal dano pelo carvedilol foi descrita apenas por nosso grupo e publicada recentemente (CARVALHO RODRIGUES et al., 2012).

Um estudo *in vitro* clássico com cisplatina demonstrou que concentrações variando entre 2 a 8 μ M de cisplatina induzem apoptose em células epiteliais tubulares renais, enquanto concentrações maiores (200-800 μ M) de cisplatina induzem necrose (LIEBERTHAL; TRIACA; LEVINE, 1996). Resultados semelhantes foram observados em cultura de células tubulares renais primárias provenientes de rins de coelhos, ou seja, indução da apoptose associada à concentração menor de cisplatina (50 μ M) e indução de necrose em caso de concentração mais alta de cisplatina (2mM) (BAEK et al., 2003). A apoptose é um processo dependente de energia associado às alterações mitocondriais menos severas induzidas por doses terapêuticas de cisplatina (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; LIEBERTHAL; MENZA; LEVINE, 1998; UEDA; KAUSHAL; SHAH, 2000; WANG, D.; LIPPARD, 2005).

Para os ensaios *in vitro* a foi escolhida a menor concentração de cisplatina (25 μ M) capaz de induzir a apoptose de forma significativa em relação ao controle. A apoptose foi avaliada pela análise do ciclo celular através da ligação do iodeto de propídeo ao DNA celular e quantificação por citometria de fluxo.

Outros autores já descreveram a indução da apoptose por cisplatina em células HK-2 e outras linhagens celulares renais, bem como a citoproteção conferida por antioxidantes, inclusive em estudos combinando estudos *in vivo* e *in vitro*. Pongjit e colaboradores (2011) utilizaram células HK-2 para demonstrar o dano renal

induzido pela cisplatina e testar a proteção de dois extratos de plantas (*Glycine max* – GM e *Chrysanthemum indicum* – CI) contra a morte celular induzida pela cisplatina. A dose de cisplatina também foi escolhida pelos autores do trabalho após análise de apoptose, e mesmo tendo obtido uma diferença significativa com a concentração de 25µM os autores optaram por uma dose maior (50µM) para os ensaios posteriores. Os extratos avaliados pelos autores apresentaram proteção antioxidante contra o peróxido de hidrogênio e o radical superóxido produzidos pela cisplatina. Resultados de estudos *in vitro* com células HK-2 e *in vivo* com camundongos mostraram a ação protetora e o mecanismo de proteção da genisteína (SUNG et al., 2008) e do rosiglitazone (SKOVRONSKY;LEE;TROJANOWSKI, 2006) contra os danos induzidos pela cisplatina.

Em nosso estudo alguns mediadores da apoptose foram avaliados *in vivo* através de ensaios imunohistoquímicos. Para confirmar os achados *in vivo* e melhor delinear o mecanismo de inibição da cascata apoptótica pelo carvedilol, a atividade das proteínas pró-apoptóticas caspase-3, caspase-9 e Bcl-xL, e da proteína anti-apoptótica Bax foi avaliada *in vitro* por Western Blotting. As proteínas da família das caspases, como a caspase-3 e a caspase-9 possuem um papel fundamental na morte celular por apoptose. Elas são cisteíno-proteases que existem como zimógenos latentes. Em resposta a estímulos apoptóticos a proenzima é ativada através da clivagem em subunidades menores, geralmente com tamanho aproximado de 10 a 20KDa. Na técnica de Western-blotting são utilizados anticorpos específicos que permitem detectar as proenzimas e suas subunidades (WOLF;GREEN, 1999).

Nossos resultados *in vitro* com células HK-2 apresentaram-se em linha com os resultados dos ensaios *in vivo*. Assim como nos ensaios *in vivo*, as expressões da Bax e da caspase-3 foram aumentadas pelo tratamento com cisplatina, e inibidas pelo carvedilol, enquanto a Bcl-xL permaneceu inalterada em todos os grupos. Adicionalmente, a expressão da pro-caspase-9 mostrou-se aumentada no grupo tratado com cisplatina, o que não ocorreu no grupo tratado com carvedilol e cisplatina. Por outro lado, a expressão da caspase-9 clivada não foi diferente nos grupos avaliados e este resultado pode estar relacionado à duração do tratamento. Sabe-se que o aumento na expressão da caspase-9 clivada pode acontecer algumas horas após o aumento da expressão da pro-caspase-9 pela cisplatina,

como descrito por Stennicke et al. (1999). Neste estudo investigou-se se a clivagem da pro-caspase-9 era necessária para ativar a cascata apoptótica ou se a manutenção da pro-caspase-9 ligada à Apaf-1 seria importante para manter a atividade do complexo. Os autores concluíram que a pro-caspase-9 *per se* possui atividade significativa na presença de cofatores citosólicos como Apaf-1, e, portanto, a proteólise da caspase-9 não parece ser um requisito para a ativação da apoptose. Um estudo mais recente também sugeriu que a pro-caspase-9 possui uma maior afinidade pelo apoptossomo que a caspase-9 clivada, o que facilitaria um ciclo contínuo da pro-caspase-9 para recrutamento, ativação, processamento e liberação do pro-complexo formado (BRATTON;SALVESEN, 2010).

Dada a importância da via mitocondrial na geração de ERO e na ativação da cascata apoptótica induzidas por cisplatina, no presente estudo também avaliamos a expressão da sirtuína 1 (SIRT1). As sirtuínas compreendem uma família de proteínas com atividade de deacetilase dependentes de NAD^+ . As SIRTs desempenham papéis importantes em uma série de situações fisiológicas e patofisiológicas como: síndrome metabólica, envelhecimento, ciclo celular e longevidade mediada por restrição calórica através da deacetilação de vários substratos. Dentre as SIRTs, a SIRT-1 possui uma função especial na regulação da função mitocondrial e na ativação de sistemas antioxidantes por atuar na biogênese mitocondrial e na homeostase e energética por meio da ativação do PGC1 β (peroxisome proliferator-activated receptor β coactivator-1)(HAIGIS;SINCLAIR, 2010; MICHAN;SINCLAIR, 2007; SANDERS;JACKSON;MARMORSTEIN, 2010).

Os antioxidantes podem induzir um aumento na expressão de SIRT-1. O resveratrol, por exemplo, promove a biogênese mitocondrial e protege contra doenças metabólicas através da deacetilação da PGC1 β dependente de SIRT-1 (LAGOUGE et al., 2006). A atividade do resveratrol sobre o SIRT-1 também foi relacionada à proteção contra o dano oxidativo renal em camundongos submetidos à hipóxia (HE et al., 2010), e à proteção contra o dano renal induzido por cisplatina em células do túbulo proximal renal de camundongos (KIM, D. H. et al., 2011).

Outros antioxidantes, como o ácido lipóico (VALDECANTOS et al., 2012) e algumas isoflavonas, como genisteína, daidzenina e biochanina A (RASBACH;SCHNELLMANN, 2008) foram descritos recentemente como ativadores da SIRT-1. De acordo com nossos resultados, o carvedilol também foi capaz de aumentar a expressão da SIRT1 no grupo CV+Cisp. Surpreendentemente, o efeito

não foi observado no grupo tratado apenas com carvedilol, o que sugere que a ativação do SIRT1 possa estar relacionada à uma resposta ao dano oxidativo induzido pela cisplatina, não ocorrendo na ausência do dano.

O mecanismo pelo qual o carvedilol atua como antioxidante ainda não foi elucidado e há controvérsias na literatura científica. Dentre os mecanismos de ação propostos para a ação antioxidante do carvedilol e de seus metabólitos, estão: (i) o seqüestro de íons ferro, o que impediria a reação de Fenton e a produção do radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) e/ou (ii) o seqüestro de radicais livres (DANDONA;GHANIM;BROOKS, 2007; NOGUCHI;NISHINO;NIKI, 2000; YUE et al., 1992).

De acordo com nossos resultados o carvedilol não foi capaz de sequestrar os radicais TEMPOL e DPPH avaliados por RPE, no entanto mostrou-se eficiente no sequestro do íon ferro (II), o que corrobora os resultados publicados por outros grupos (NOGUCHI;NISHINO;NIKI, 2000; OETTL et al., 2001). Por outro lado, não se pode excluir a possibilidade de que o carvedilol possa atuar como sequestrador de radicais livres específicos que não foram avaliados em nossos ensaios de RPE. Um estudo recente sugere que o carvedilol é capaz de reduzir significativamente a produção do radical superóxido *in vitro* (HASSAN et al., 2012).

A presença do ferro livre é um importante modulador na geração dos radicais livres. Sabe-se que aproximadamente 2% do fluxo de elétrons que passa pela cadeia respiratória escapam, reduzindo o oxigênio molecular e levando à formação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), que é o precursor de outras ERO (FARISS et al., 2005). O radical superóxido pode formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). O peróxido de hidrogênio é menos tóxico por possuir certa estabilidade, e sua detoxificação é realizada pela catalase (citossol) e pela glutathione peroxidase (mitocôndria). Entretanto, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio podem gerar o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), que é altamente reativo. Esse radical pode ser formado durante a reação de Haber-Weiss (reação 1), que é uma reação lenta, mas que pode ser catalisada por metais de transição, principalmente o ferro. A reação de Haber-Weiss catalisada por ferro ocorre em duas fases: na primeira o íon férrico (Fe^{3+}) é reduzido ao íon ferroso (Fe^{2+}) pelo radical superóxido (reação 2); na segunda fase ocorre a reação de Fenton (reação 3) entre o Fe^{2+} e o peróxido de hidrogênio gerando o radical hidroxila

(Figura 30), que é altamente tóxico e não pode ser eliminado pela ação de enzimas (SIMUNEK et al., 2009).

Figura 32: Reações de Haber-Weiss (reações 1 e 2) e reação de Fenton (reação 3). Adaptado de Simunek et al.,(2009).

Em linha com nossos achados, o quelante de ferro deferoxamine, combinado ou não a outros antioxidantes, já foi sugerido por alguns autores como agente protetor contra o dano renal causado pela cisplatina em modelos *in vivo* e *in vitro*, (BALIGA et al., 1998; KADIKOYLU et al., 2004; OZDEMIR et al., 2002).

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o efeito nefroprotetor do carvedilol não está associado à diminuição do efeito antitumoral da cisplatina em camundongos inoculados com sarcoma -180. Tal achado sugere que o estresse oxidativo possa ser o principal mecanismo envolvido na nefrotoxicidade da cisplatina, enquanto outros mecanismos devem prevalecer na atividade antitumoral. Adicionalmente, estes achados dão suporte aos dados anteriores divulgados por nosso grupo de pesquisa (CARVALHO RODRIGUES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2010; 2011). Em conjunto, estes achados podem contribuir para uma futura utilização clínica do carvedilol como agente adjuvante na quimioterapia com cisplatina. Adicionalmente, este estudo pode ser usado como modelo para a investigação da influência de outros antioxidantes potencialmente nefroprotetores sobre o efeito antitumoral da cisplatina.

CONCLUSÕES

VII- CONCLUSÕES

De acordo com o presente estudo:

- O carvedilol protege eficazmente contra o dano oxidativo e a apoptose das células renais induzidos pela cisplatina em camundongos portadores de Sarcoma-180. A inibição da apoptose ocorre via inibição da (i) proteína pró-apoptótica Bax, (ii) da caspase-9 (mitocondrial) e da (iii) caspase-3, que são ativadas pela cisplatina. Cisplatina e carvedilol não tem efeito sobre a proteína anti-apoptótica Bcl-xL.
- O sequestro de íons ferro está envolvido no mecanismo de ação antioxidante do carvedilol, porém o carvedilol não é um eficiente sequestrador de radicais livres;
- Isoladamente, o carvedilol e a cisplatina não tem efeito sobre a expressão da SIRT-1, proteína relacionada à biogênese mitocondrial; porém a administração de ambos aumenta a expressão da SIRT-1;
- O carvedilol não altera a biodisponibilidade da cisplatina e não interfere na sua atividade antitumoral, o que sugere que mecanismos distintos desempenhem papel central na nefrotoxicidade e na atividade antitumoral da cisplatina.
- O presente estudo abre um precedente para a investigação de outros antioxidantes no mesmo modelo experimental.

REFERÊNCIAS

VIII - REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M. ;CORY, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. **Trends Biochem Sci**, v. 26, n. 1, p. 61-66, 2001
- AHMAD, S. ;SULTANA, S. Tannic acid mitigates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Hum Exp Toxicol**, v., n., p., 2011
- AJITH, T. A., et al. Co-supplementation of single and multi doses of vitamins C and E ameliorates cisplatin-induced acute renal failure in mice. **Exp Toxicol Pathol**, v. 61, n. 6, p. 565-571, 2009
- ALI, B. H. ;AL MOUNDHRI, M. S. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 8, p. 1173-1183, 2006
- APARECIDA RESENDE, F., et al. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life Sci**, v. 79, n. 13, p. 1268-1273, 2006
- ARMSTRONG, S. C. Anti-oxidants and apoptosis: attenuation of doxorubicin induced cardiomyopathy by carvedilol. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 4, p. 817-821, 2004
- ASNA, N., et al. Time dependent protection of amifostine from renal and hematopoietic cisplatin induced toxicity. **Life Sci**, v. 76, n. 16, p. 1825-1834, 2005
- ATESSAHIN, A., et al. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. **Toxicology**, v. 212, n. 2-3, p. 116-123, 2005
- BACIC, G., et al. Spin-trapping of oxygen free radicals in chemical and biological systems: new traps, radicals and possibilities. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 69, n. 5, p. 1354-1366, 2008
- BADARY, O. A., et al. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. **Life Sci**, v. 76, n. 18, p. 2125-2135, 2005
- BAEK, S. M., et al. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. **J Lab Clin Med**, v. 142, n. 3, p. 178-186, 2003

- BALIGA, R., et al. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Kidney Int**, v. 53, n. 2, p. 394-401, 1998
- BATISTA, B. L., et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Anal Chim Acta**, v. 646, n. 1-2, p. 23-29, 2009
- BEYAERT, R. ;FIERS, W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. **FEBS Lett**, v. 340, n. 1-2, p. 9-16, 1994
- BLOCK, K. I. ;GYLLENHAAL, C. Commentary: the pharmacological antioxidant amifostine -- implications of recent research for integrative cancer care. **Integr Cancer Ther**, v. 4, n. 4, p. 329-351, 2005
- BOISDRON-CELLE, M., et al. [Pharmacokinetic properties of platinum derivatives]. **Bull Cancer**, v. 88 Spec No, n., p. S14-19, 2001
- BOLLETER, W. T., et al. Spectrophotometric Determination of Ammonia as Indophenol. **Analytical Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 592-&, 1961
- BORCH, R. F. ;MARKMAN, M. Biochemical modulation of cisplatin toxicity. **Pharmacol Ther**, v. 41, n. 1-2, p. 371-380, 1989
- BOULIKAS, T. ;VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). **Oncol Rep**, v. 10, n. 6, p. 1663-1682, 2003
- BRATTON, S. B. ;SALVESEN, G. S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 19, p. 3209-3214, 2010
- BRILLET, G., et al. Long-term renal effect of cisplatin in man. **Am J Nephrol**, v. 14, n. 2, p. 81-84, 1994
- BRYSON, G. J., et al. A flow cytometric study of cell death: failure of some models to correlate with morphological assessment. **Immunol Cell Biol**, v. 72, n. 1, p. 35-41, 1994.
- BURMAN, A. C., et al. Anti-cancer activity of carvedilol and its isomers. <http://www.freepatentsonline.com/6632832.html>. D. R. Foundation. United States6632832 p. 2003

- CAIN, K. ;SKILLETER, D. N. (1987). Preparation and use of mitochondria in toxicological research. **Biochemical toxicology. A practical approach**. K. Snell and B. Mollock. Oxford, IRL Press. 1: 217-254.
- CAMPBELL, N. P. ;KINDLER, H. L. Update on malignant pleural mesothelioma. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 32, n. 1, p. 102-110, 2011
- CARVALHO RODRIGUES, M. A., et al. Carvedilol protects against apoptotic cell death induced by Cisplatin in renal tubular epithelial cells. **J Toxicol Environ Health A**, v. 75, n. 16-17, p. 981-990, 2012
- CIARIMBOLI, G., et al. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. **Am J Pathol**, v. 176, n. 3, p. 1169-1180, 2010
- CIARIMBOLI, G., et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. **Am J Pathol**, v. 167, n. 6, p. 1477-1484, 2005
- COHEN, S. M. ;LIPPARD, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 67, n., p. 93-130, 2001
- CULLEN, K. J., et al. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 1, p. 43-50, 2007
- CVITKOVIC, E. Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. **Cancer Treat Rev**, v. 24, n. 4, p. 265-281, 1998
- DANDONA, P., et al. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. **J Hypertens**, v. 25, n. 4, p. 731-741, 2007
- DAVIDSON, K., et al. Comparative analysis of caspase activation and apoptosis in renal tubular epithelial cells and renal cell carcinomas. **Nephron Exp Nephrol**, v. 99, n. 4, p. e112-120, 2005
- DEL RIO, D., et al. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005
- DICKEY, D. T., et al. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 3, p. 1052-1058, 2005

- DILLIOGLUGIL, M. O., et al. Protective effects of increasing vitamin E and a doses on cisplatin-induced oxidative damage to kidney tissue in rats. **Urol Int**, v. 75, n. 4, p. 340-344, 2005
- DO AMARAL, C. L., et al. Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 6, p. 363-370, 2008
- DOBYAN, D. C., et al. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 213, n. 3, p. 551-556, 1980
- DOS SANTOS, N. A., et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. **Arch Toxicol**, v., n., p., 2012
- EASTMAN, A. (1999). The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis. **Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug**. B. Lippert. New York, Wiley-VCH: 111-135.
- EL-BESHBISHY, H. A., et al. Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. **Eur J Pharmacol**, v. 668, n. 1-2, p. 278-284, 2011
- ESTERBAUER, H., et al. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991
- FARISS, M. W., et al. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Mol Interv**, v. 5, n. 2, p. 94-111, 2005
- FIELD, J. B. Tests of compounds against sarcoma 180 in a screening project in mice. **Cancer Res**, v. Suppl. 2, n., p. 3-52, 1955
- FIRST, M. R. (1996). Renal function. **Clinical chemistry. Theory, analysis and correlation**. L. A. Kaplan and A. J. Pesce. St Louis, Mosby: 346-358.
- FOUAD, A. A., et al. Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. **Toxicology**, v. 274, n. 1-3, p. 49-56, 2010
- FRANCESCATO, H. D., et al. Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. **Kidney Blood Press Res**, v. 27, n. 3, p. 148-158, 2004

- GERAN, R. I., et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. **Cancer Chemoter Rep**, v. 3, n. 2, p. 1-66, 1972
- GOBE, G. Identification of apoptosis in kidney tissue sections. **Methods Mol Biol**, v. 466, n., p. 175-192, 2009
- GONZAGA, M. L., et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1-->4)-glucan-beta-(1-->6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill. **Nat Med (Tokyo)**, v. 63, n. 1, p. 32-40, 2009
- GONZALEZ, V. M., et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Mol Pharmacol**, v. 59, n. 4, p. 657-663, 2001
- GORNALL, G. A., et al. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, n., p. 751 - 766, 1949
- GRADISHAR, W. J., et al. A Phase II trial of cisplatin plus WR-2721 (amifostine) for metastatic breast carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E8188). **Cancer**, v. 92, n. 10, p. 2517-2522, 2001
- HAIGIS, M. C. ;SINCLAIR, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. **Annu Rev Pathol**, v. 5, n., p. 253-295, 2010
- HALABE, A., et al. Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. **Nephron**, v. 57, n. 2, p. 197-200, 1991
- HAN, X., et al. Functional TauT protects against acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 6, p. 1323-1332, 2009
- HANIGAN, M. H. ;DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther**, v. 1, n., p. 47-61, 2003
- HARTMANN, A. E. (1994). Nitrogen metabolites and renal function. **Clinical laboratory medicine**. K. D. MacClatchey. Baltimore, Williams & Wilkins: 371-385.
- HASSAN, F., et al. Carvedilol Enhances Mesenchymal Stem Cell Therapy for Myocardial Infarction via Inhibition of Caspase-3 Expression. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 343, n. 1, p. 62-71, 2012

- HAYASHI, M., et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat Res**, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990
- HAYASHI, T., et al. Carvedilol protects tubular epithelial cells from ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress. **Int J Urol**, v. 17, n. 12, p. 989-995, 2010
- HE, W., et al. Sirt1 activation protects the mouse renal medulla from oxidative injury. **J Clin Invest**, v. 120, n. 4, p. 1056-1068, 2010
- HISSIN, P. J. ;HILF, R. A fluorimetric method for determination o oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, v. 74, n., p. 214-226, 1976
- INOUE, K., et al. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line in vivo and in vitro. **Am J Chin Med**, v. 36, n. 3, p. 625-634, 2008
- ISHIDA, S., et al. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 22, p. 14298-14302, 2002
- JIANG, M., et al. Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. **Oncogene**, v. 25, n. 29, p. 4056-4066, 2006
- KADIKOYLU, G., et al. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. **Hum Exp Toxicol**, v. 23, n. 1, p. 29-34, 2004
- KANG, K. P., et al. Luteolin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by regulation of p53-dependent renal tubular apoptosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 3, p. 814-822, 2011
- KARTALOU, M. ;ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat Res**, v. 478, n. 1-2, p. 23-43, 2001
- KATZENSTEIN, H. M., et al. Amifostine does not prevent platinum-induced hearing loss associated with the treatment of children with hepatoblastoma: a report of the Intergroup Hepatoblastoma Study P9645 as a part of the Children's Oncology Group. **Cancer**, v. 115, n. 24, p. 5828-5835, 2009

- KAUSHAL, G. P., et al. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. **Kidney Int**, v. 60, n. 5, p. 1726-1736, 2001
- KEMP, G., et al. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 7, p. 2101-2112, 1996
- KHAN, R., et al. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 258, n. 3, p. 315-329, 2012
- KIM, D. H., et al. SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 301, n. 2, p. F427-435, 2011
- KIM, H. J., et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. **J Neurosci**, v. 30, n. 11, p. 3933-3946, 2010
- KIM, S. H., et al. Xanthorrhizol has a potential to attenuate the high dose cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 43, n. 1, p. 117-122, 2005
- KINTZEL, P. E. Anticancer drug-induced kidney disorders. **Drug Saf**, v. 24, n. 1, p. 19-38, 2001
- KLEIN, R., et al. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC-12 cell model. **BMC Neurosci**, v. 8, n., p. 61, 2007
- KORKMAZ, A. ;KOLANKAYA, D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. **Ren Fail**, v. 31, n. 1, p. 36-43, 2009
- KOWALTOWSKI, A. J., et al. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca²⁺ ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, v. 271, n. 6, p. 2929-2934, 1996
- KRONING, R., et al. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 45, n. 1, p. 43-49, 2000

- KUHLMANN, M. K., et al. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. **Nephrol Dial Transplant**, v. 12, n. 12, p. 2478-2480, 1997
- LAGOUGE, M., et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109-1122, 2006
- LEE, R. H., et al. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 8, p. 1013-1023, 2001
- LEE, Y. M., et al. Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced tubulointerstitial injuries through inhibition of mitochondrial bax translocation in rats. **Nephron Exp Nephrol**, v. 113, n. 4, p. e104-112, 2009
- LI, D., et al. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. **Cancer Sci**, v. 95, n. 8, p. 644-650, 2004
- LIEBERTHAL, W., et al. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. F315-327, 1998
- LIEBERTHAL, W., et al. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. **Am J Physiol**, v. 270, n. 4 Pt 2, p. F700-708, 1996
- LIPPARD, S. J. Chemistry and molecular biology of cisplatin anticancer drugs. **Pure Appl. Chem.**, v. 59, n., p. 731-742, 1987
- LYNCH, E. D., et al. Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. **Hear Res**, v. 201, n. 1-2, p. 81-89, 2005
- MEMOS, N., et al. Administration of Human Protein-C concentrate prevents apoptotic brain cell death after experimental sepsis. **Brain Res**, v., n., p., 2009
- MICHAN, S. ;SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochem J**, v. 404, n. 1, p. 1-13, 2007

- MOCHIZUKI, M., et al. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca^{2+} leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 49, n. 16, p. 1722-1732, 2007
- MORAIS, C., et al. Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, n. 12, p. 3377-3388, 2006
- MUKHOPADHYAY, P., et al. Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy. **Free Radic Biol Med**, v., n., p., 2011
- NAIDU, P. S., et al. Carvedilol attenuates neuroleptic-induced orofacial dyskinesia: possible antioxidant mechanisms. **Br J Pharmacol**, v. 136, n. 2, p. 193-200, 2002
- NAKAGAWA, T., et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 98-103, 2000
- NISAR, S. ;FEINFELD, D. A. N-acetylcysteine as salvage therapy in cisplatin nephrotoxicity. **Ren Fail**, v. 24, n. 4, p. 529-533, 2002
- NOGUCHI, N., et al. Antioxidant action of the antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation. **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 9, p. 1069-1076, 2000
- OETTL, K., et al. Radical-scavenging and iron-chelating properties of carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidative activity. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 2, p. 241-248, 2001
- OLDHAM, H. G. ;CLARKE, S. E. In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol. **Drug Metab Dispos**, v. 25, n. 8, p. 970-977, 1997
- OLIVEIRA, P. J., et al. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 200, n. 2, p. 159-168, 2004
- OZDEMIR, E., et al. Experimental study on effects of deferoxamine mesilate in ameliorating cisplatin-induced nephrotoxicity. **Int Urol Nephrol**, v. 33, n. 1, p. 127-131, 2002

- OZEN, S., et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J Appl Toxicol**, v. 24, n. 1, p. 27-35, 2004
- PABLA, N., et al. Inhibition of PKCdelta reduces cisplatin-induced nephrotoxicity without blocking chemotherapeutic efficacy in mouse models of cancer. **J Clin Invest**, v. 121, n. 7, p. 2709-2722, 2011
- PABLA, N. ;DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney Int**, v. 73, n. 9, p. 994-1007, 2008
- PARK, M. S., et al. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 4, p. 858-865, 2002
- PAT, B. K., et al. Fibrogenic stresses activate different mitogen-activated protein kinase pathways in renal epithelial, endothelial or fibroblast cell populations. **Nephrology (Carlton)**, v. 8, n. 4, p. 196-204, 2003
- PAUSCHINGER, M., et al. Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response. **Eur J Heart Fail**, v. 7, n. 4, p. 444-452, 2005
- PLANTING, A. S., et al. Randomized study of a short course of weekly cisplatin with or without amifostine in advanced head and neck cancer. EORTC Head and Neck Cooperative Group. **Ann Oncol**, v. 10, n. 6, p. 693-700, 1999
- PONGJIT, K., et al. Protective effect of Glycine max and Chrysanthemum indicum extracts against cisplatin-induced renal epithelial cell death. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 12, p. 1931-1944, 2011
- RAMOS-VARA, J. A. Principles and methods of immunohistochemistry. **Methods Mol Biol**, v. 691, n., p. 83-96, 2011
- RANA, M. G., et al. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging studies of alcoholic extract of *Medicago sativa* L. **Romanian Journal of Biology – Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 15-22, 2010
- RASBACH, K. A. ;SCHNELLMANN, R. G. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 325, n. 2, p. 536-543, 2008

- RODRIGUES, M. A., et al. Carvedilol protects against the renal mitochondrial toxicity induced by cisplatin in rats. **Mitochondrion**, v. 10, n. 1, p. 46-53, 2010
- RODRIGUES, M. A., et al. Carvedilol protects against cisplatin-induced oxidative stress, redox state unbalance and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Chem Biol Interact**, v. 189, n. 1-2, p. 45-51, 2011
- ROSENBERG, B. Platinum Complexes for Treatment of Cancer. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. 3, n. 2, p. 134-147, 1978
- ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer**, v. 55, n. 10, p. 2303-2306, 1985
- ROSENBERG, B., et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-386, 1969
- RUFFOLO, R. R. ;FEUERSTEIN, G. Z. Carvedilol case history: the discovery and development of the first beta-blocker for the treatment of congestive heart failure. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 85-89, 2006
- SANDERS, B. D., et al. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. **Biochim Biophys Acta**, v. 1804, n. 8, p. 1604-1616, 2010
- SANTOS, A. B., et al. Antioxidant Properties of Plant Extracts: an EPR and DFT Comparative Study of the Reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 20, n. 8, p. 1483-1492, 2009
- SANTOS, N. A., et al. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 61, n. 1, p. 145-155, 2008
- SANTOS, N. A., et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 7, p. 495-504, 2007
- SASTRY, J. ;KELLIE, S. J. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. **Pediatr Hematol Oncol**, v. 22, n. 5, p. 441-445, 2005

- SATOH, M., et al. A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 305, n. 3, p. 1183-1190, 2003
- SCHENELLMANN, R. G. (2001). Toxic responses of the kidney. **Casarett & Doull's toxicology. The basic science of poisons**. C. D. Kalassen. New York, McGraw-Hill: 491-514.
- SCHILLER, J. H., et al. Amifostine, cisplatin, and vinblastine in metastatic non-small-cell lung cancer: a report of high response rates and prolonged survival. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 6, p. 1913-1921, 1996
- SENTHILKUMAR, N., et al. Synthesis of Active Metabolites of Carvedilol, an Antihypertensive Drug, . **Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry**,, v. 41, n. 2, p. 268-276, 2010
- SHERMANN, S. E. ;LIPPARD, S. J. Structural aspectsof platinum anticancer drug interaction with DNA. **Chem. Rev.**, v. 87, n., p. 1153-1181, 1987
- SHEU, S. S., et al. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 2, p. 256-265, 2006
- SILICI, S., et al. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. **World J Urol**, v. 29, n. 1, p. 127-132, 2011
- SIMUNEK, T., et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 1, p. 154-171, 2009
- SINGH, D., et al. Carvedilol attenuates ischemia-reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 18, n. 6, p. 627-634, 2004
- SKOVRONSKY, D. M., et al. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. **Annu Rev Pathol**, v. 1, n., p. 151-170, 2006
- SOMANI, S. M., et al. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. **Pharmacol Toxicol**, v. 86, n. 5, p. 234-241, 2000

- SPALLAROSSA, P., et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 4, p. 837-846, 2004
- STAFYLAS, P. C. ;SARAFIDIS, P. A. Carvedilol in hypertension treatment. **Vasc Health Risk Manag**, v. 4, n. 1, p. 23-30, 2008
- STENNICKE, H. R., et al. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. **J Biol Chem**, v. 274, n. 13, p. 8359-8362, 1999
- STOCK, C. C., et al. Sarcoma 180 inhibition screening data. **Cancer Res**, v. Suppl. 2, n., p. 179-331, 1955
- STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. **Methods Mol Biol**, v. 740, n., p. 1-6, 2011
- STOWE, D. F. ;CAMARA, A. K. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 6, p. 1373-1414, 2009
- SUGIURA, K. ;STOCK, C. C. Studies in a tumor spectrum. I. Comparison of the action of methylbis (2-chloroethyl)amine and 3-bis(2-chloroethyl)aminomethyl-4-methoxymethyl -5-hydroxy-6-methylpyridine on the growth of a variety of mouse and rat tumors. **Cancer**, v. 5, n. 2, p. 382-402, 1952
- SUNG, M. J., et al. Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. **Kidney Int**, v. 74, n. 12, p. 1538-1547, 2008
- TANAKA, H., et al. Histopathological study of human cisplatin nephropathy. **Toxicol Pathol**, v. 14, n. 2, p. 247-257, 1986
- TANIHARA, Y., et al. Protective effect of concomitant administration of imatinib on cisplatin-induced nephrotoxicity focusing on renal organic cation transporter OCT2. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 9, p. 1263-1271, 2009
- TARLADACALISIR, Y. T., et al. Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage: a light and electron microscopic study. **Ren Fail**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2008
- TOWNSEND, D. M., et al. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2003

- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-344, 2003
- UEDA, N., et al. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. **Am J Med**, v. 108, n. 5, p. 403-415, 2000
- VALDECANTOS, M. P., et al. Lipoic Acid Improves Mitochondrial Function in Nonalcoholic Steatosis Through the Stimulation of Sirtuin 1 and Sirtuin 3. **Obesity (Silver Spring)**, v., n., p., 2012
- WANG, D. ;LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005
- WANG, X., et al. The tumoricidal effect of sonodynamic therapy (SDT) on S-180 sarcoma in mice. **Integr. Cancer. Ther.**, v. 7, n. 2, p. 96-102, 2008
- WEI, Q., et al. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. **Kidney Int**, v. 72, n. 1, p. 53-62, 2007
- WERNER, M., et al. Nephrotoxicity of xenobiotics. **Clin Chim Acta**, v. 237, n. 1-2, p. 107-154, 1995
- WILCOX, A. A., et al. Use of Berthelot Reaction in Automated Analysis of Serum Urea Nitrogen. **Clinical Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 151-&, 1966
- WOLF, B. B. ;GREEN, D. R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. **J Biol Chem**, v. 274, n. 29, p. 20049-20052, 1999
- YAO, X., et al. Cisplatin nephrotoxicity: a review. **Am J Med Sci**, v. 334, n. 2, p. 115-124, 2007
- YUE, T. L., et al. Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 263, n. 1, p. 92-98, 1992
- ZWELLING, L. A. ;KOHN, K. W. Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum(II). **Cancer Treat Rep**, v. 63, n. 9-10, p. 1439-1444, 1979

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.848.53.0), intitulado "Avaliação da Interferência do Efeito Antioxidante do Carvedilol, um Potencial Agente Nefroprotetor, na Atividade Antitumoral da Cisplatina", de autoria de **Maria Augusta Carvalho Rodrigues** e de **Antonio Cardozo dos Santos** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 09/12/2009.

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.848.53.0), entitled: "Avaliação da Interferência do Efeito Antioxidante do Carvedilol, um Potencial Agente Nefroprotetor, na Atividade Antitumoral da Cisplatina", by **Maria Augusta Carvalho Rodrigues** and **Antonio Cardozo dos Santos**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, December 09, 2009.

Ribeirão Preto, 10 de dezembro de 2009.

Presidente da CEUA

Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro