



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Programa de Pós-graduação em Farmacologia



CAROLINA DE PAULA SOUZA JESUS

*Avaliação da proteção do nebivolol contra as alterações redox na
bexiga induzidas pela ciclofosfamida.*

Ribeirão Preto

2023

CAROLINA DE PAULA SOUZA JESUS

*Avaliação da proteção do nebivolol contra as
alterações redox na bexiga induzidas pela
ciclofosfamida.*

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.

Área de concentração:
Farmacologia Orientador: Prof.
Dr. Carlos Renato Tirapelli.

Ribeirão Preto

2023

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de
Ribeirão Preto/USP

JESUS, CAROLINA DE PAULA SOUZA

Avaliação da proteção do nebivolol contra as alterações redox na bexiga induzidas
pela ciclofosfamida.

Ribeirão Preto, 2023.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Carlos Renato Tirapelli

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Candidata: Carolina de Paula Souza Jesus

Título da Dissertação: Avaliação da proteção do nebivolol contra as alterações redox na bexiga induzidas pela ciclofosfamida.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli

A Comissão Julgadora do trabalho de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a// , considerou o candidato:

() Aprovado

() Reprovado

Examinador(a):

Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Examinador(a):

Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Presidente:

Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Dedico este trabalho à minha mãe, que me ensinou a ser forte e
buscar o melhor pra mim.

AGRADECIMENTOS

A primeira pessoa que eu quero agradecer é a minha mãe, Regina Helena, que enfrentou o mundo e a morte pra me criar até aqui. Por todo o seu amor, apoio, conselhos e ser o maior exemplo de força da natureza pra mim! Obrigada por abrir mão de tantas coisas para me proporcionar o melhor sempre. Essa dissertação é mérito NOSSO!

Sou extremamente grata ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Renato Tirapelli, que me aceitou e me acolheu em seu laboratório pós pandemia e foi fundamental para o meu desenvolvimento acadêmico. Com ele aprendi muito além dos livros e teoria. Aprendi sobre responsabilidade, ética e valores profissionais que aplicarei a onde for.

Agradeço toda a equipe do laboratório pela troca de conhecimento e colaboração. Não se faz pesquisa sozinho! Um agradecimento especial ao Gustavo, por toda sua paciência e disponibilidade de ensinar durante toda minha jornada; ao Victor, por antes mesmo de eu entrar no programa se disponibilizar a me ajudar e graças a ele, passei por todo o processo seletivo e ao Thales, por colaborar com o projeto e me ensinar todos os protocolos e metodologias necessários para a conclusão desse trabalho. Agradeço também a pesquisadora da Unicamp, Mariana Gonçalves de Oliveira Taranto, por participar desse projeto e compartilhar toda sua expertise conosco.

Agradeço também a minha família, sempre muito presente e carinhosa, que me acompanharam feriados e datas comemorativas no computador estudando, lendo e escrevendo para tornar esse trabalho possível. Principalmente minha avó Silvida, minha tia Silvia, meu primo Jonathas e sua esposa Kátia (que cuidaram de mim de formas que eu jamais poderei retribuir e sou extremamente grata).

Agradeço ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil pelo suporte financeiro para o desenvolvimento do trabalho. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O apoio do meu namorado Gabriel foi essencial para a conclusão desse trabalho. Ele me incentivou a melhorar e terminar o que eu comecei com o mesmo pique inicial. Ele me fez rir quando eu estava exausta e relaxar nos maiores momentos de ansiedade. Você é meu raio de sol. E finalizo agradecendo aos meus amigos, que me proporcionaram momentos de descontração durante esses dois anos, me lembraram de não levar a vida tão a sério e que nem tudo é o fim do mundo. Em especial a Gabriela, a Giulia, Torrado, Dudu, Guilherme e Mylena.

“Não podemos controlar o vento, mas podemos ajustar as velas.”
Aristóteles

RESUMO

JESUS, CPS. **Avaliação da proteção do nebivolol contra as alterações redox na bexiga induzidas pela ciclofosfamida.** Tese de mestrado em Farmacologia- Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2023.

A ciclofosfamida é um medicamento antitumoral da classe das mostardas nitrogenadas. É um pró-fármaco que, ao ser metabolizado no fígado, torna-se ativo. No entanto, o metabolismo hepático dessa mostarda nitrogenada também gera a acroleína, um metabólito tóxico que é responsável pela toxicidade da ciclofosfamida em diferentes órgãos, incluindo a bexiga onde promove cistite hemorrágica. Por esse motivo, o tratamento com a ciclofosfamida requer o uso prévio de um agente citoprotetor. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) com consequente desequilíbrio redox é o principal mecanismo pelo qual a acroleína promove seus efeitos citotóxicos. O nebivolol é um β -bloqueador de terceira geração amplamente utilizado no tratamento da hipertensão arterial. Esse fármaco possui efeitos adicionais ao bloqueio seletivo dos receptores β_1 que incluem ações antioxidantes. Uma vez que o aumento do estresse oxidativo é o mecanismo central pelo qual a ciclofosfamida promove seus efeitos citotóxicos e considerando que o nebivolol atua como antioxidante, a hipótese deste estudo é a de que o nebivolol irá prevenir as alterações do estado redox promovidas pela ciclofosfamida na bexiga. Camundongos machos C57BL/6 adultos (20-25 g) com idades entre 6 a 8 semanas foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: controle, ciclofosfamida, nebivolol e nebivolol-ciclofosfamida. Os camundongos foram tratados por 5 dias com o nebivolol (10 mg/kg/dia, gavagem) sendo que a última dose do β -bloqueador foi administrada 1h antes da injeção de ciclofosfamida (300 mg/kg, i.p.). Após as 24h da administração da ciclofosfamida, os animais foram eutanasiados para a coleta da bexiga, rins, timo e sangue. O nebivolol preveniu o aumento da produção de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) induzido pela ciclofosfamida na bexiga. Resultado semelhante foi obtido no córtex renal e timo, que são órgãos alvo dos efeitos tóxicos promovidos pela ciclofosfamida. A ciclofosfamida induziu aumento da lipoperoxidação na bexiga, córtex renal e timo, sendo essas respostas prevenidas pelo tratamento com o nebivolol. No entanto, a ciclofosfamida não promoveu lipoperoxidação sistêmica. Houve redução nos níveis de glutathiona (GSH) reduzida na bexiga dos animais tratados com ciclofosfamida, mas o tratamento com nebivolol não preveniu essa resposta. Ocorreu aumento nos níveis de nitrito na bexiga dos animais tratados

com nebivolol e não houve diferença entre os grupos tratados com ciclofosfamida. Houve aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na bexiga dos animais tratados com nebivolol e redução nos tratados com ciclofosfamida em relação ao grupo controle, contudo o nebivolol preveniu a redução causada pela ciclofosfamida. O nebivolol não preveniu a redução do volume urinário e a alteração do perfil miccional induzidas pela ciclofosfamida. A ciclofosfamida promoveu aumento da razão bexiga/peso corporal evidenciando edema, mas essa resposta não foi reduzida pelo nebivolol. Ao fazer a curva concentração resposta com carbacol, foi observado o aumento da contração na bexiga apenas no grupo ciclofosfamida, demonstrando a proteção do nebivolol. Não houve diferença entre os grupos após a administração do KCl. Somente o grupo ciclofosfamida teve uma contração acentuada com o estímulo de campo elétrico. Em relação a cistometria, pudemos observar o aumento da contratilidade da bexiga somente no grupo ciclofosfamida, a partir traçado cistométrico associado a elevação na frequência miccional e a diminuição entre intervalos de micção, que o nebivolol preveniu com sucesso, ao normalizar esse padrão em relação aos controles. O grupo tratado com ciclofosfamida também teve a perda da complacência da bexiga e a perda da pressão para urinar. O nebivolol potencializou a pressão limiar no grupo NEB+CYP em relação aos demais grupos. As tiras utilizadas nos experimentos foram pesadas mas não tiveram diferenças significativas. Concluímos que o nebivolol preveniu o aumento da produção de ERO, da lipoperoxidação e contração induzidos pela ciclofosfamida na bexiga e em outros tecidos (rim e timo) que são alvos dos efeitos citotóxicos promovidos pela ciclofosfamida. A reatividade a cistometria na bexiga nos mostrou que os tecidos lesados pela ciclofosfamida tem uma maior contração em relação aos controles e o nebivolol conseguiu prevenir essa ação. No entanto, o β -bloqueador não preveniu o edema e as alterações do padrão miccional induzidas pela ciclofosfamida, sugerindo que essas respostas ocorrem por mecanismos independentes da produção de ERO.

Palavras-chave: EROS; Nebivolol; Ciclofosfamida; Cistite; Bexiga.

ABSTRACT

JESUS, CPS. **Evaluation of nebivolol protection against redox changes in the bladder induced by cyclophosphamide.** Master's thesis in Pharmacology - Faculty of Medicine, University of São Paulo. Ribeirão Preto, 2023.

Cyclophosphamide is an antitumor drug belonging to the class of nitrogen mustards. It is a prodrug that becomes active after metabolism in the liver. However, hepatic metabolism of this nitrogen mustard also generates acrolein, a toxic metabolite responsible for cyclophosphamide toxicity in various organs, including the bladder, where it induces hemorrhagic cystitis. For this reason, cyclophosphamide treatment requires prior use of a cytoprotective agent. The increase in reactive oxygen species (ROS) production with consequent redox imbalance is the main mechanism by which acrolein promotes its cytotoxic effects. Nebivolol is a third-generation β -blocker widely used in the treatment of hypertension. This drug has additional effects beyond selective β_1 receptor blockade, including antioxidant actions. Since increased oxidative stress is the central mechanism by which cyclophosphamide promotes its cytotoxic effects, and considering that nebivolol acts as an antioxidant, the hypothesis of this study is that nebivolol will prevent the redox state alterations promoted by cyclophosphamide in the bladder. Adult male C57BL/6 mice (20-25 g) aged 6 to 8 weeks were randomly assigned to 4 groups: control, cyclophosphamide, nebivolol, and nebivolol-cyclophosphamide. The mice were treated for 5 days with nebivolol (10 mg/kg/day, gavage), with the last dose of the β -blocker administered 1 hour before the cyclophosphamide injection (300 mg/kg, i.p.). After 24 hours of cyclophosphamide administration, the animals were euthanized for bladder, kidney, thymus, and blood collection. Nebivolol prevented the increase in superoxide ($O_2^{\cdot-}$) production induced by cyclophosphamide in the bladder. A similar result was obtained in the renal cortex and thymus, which are target organs of the toxic effects promoted by cyclophosphamide. Cyclophosphamide induced an increase in lipid peroxidation in the bladder, renal cortex, and thymus, and these responses were prevented by treatment with nebivolol. However, cyclophosphamide did not promote systemic lipid peroxidation. Reduced glutathione (GSH) levels in the bladder of cyclophosphamide-treated animals were reduced, but nebivolol treatment did not prevent this response. There was a reduction in nitrite levels in the bladder of cyclophosphamide-treated animals, and nebivolol did not prevent this effect. There was an increase in superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in the bladder of nebivolol-treated animals and a reduction in those treated with cyclophosphamide compared to the control

group; however, nebivolol prevented the reduction caused by cyclophosphamide. Nebivolol did not prevent the reduction in urinary volume and the alteration of micturition profile induced by cyclophosphamide. Cyclophosphamide induced an increase in bladder/body weight ratio, indicating edema, but this response was not reduced by nebivolol. When constructing the concentration-response curve with carbachol, an increase in bladder contraction was observed only in the cyclophosphamide group, demonstrating the protection of nebivolol. There was no difference between the groups after the administration of KCl. Only the cyclophosphamide group exhibited a pronounced contraction with electrical field stimulation. Regarding cystometry, we were able to observe an increase in bladder contractility only in the cyclophosphamide group, as evidenced by the cystometric tracing associated with an elevation in micturition frequency and a decrease in micturition intervals, which nebivolol successfully prevented by normalizing this pattern compared to the controls. The cyclophosphamide-treated group also experienced a loss of bladder compliance and a loss of pressure to urinate. Nebivolol enhanced the threshold pressure in the NEB+CYP group compared to the other groups. The strips used in the experiments were weighed but showed no significant differences.

In conclusion, nebivolol prevented the increase in ROS production and lipid peroxidation induced by cyclophosphamide in the bladder and in other tissues (kidney and thymus) that are targets of the cytotoxic effects promoted by cyclophosphamide. The reactivity and cystometry in the bladder revealed that the tissues damaged by cyclophosphamide exhibited higher contractions compared to the controls, and nebivolol was able to prevent this effect. However, the β -blocker did not prevent the edema and micturition pattern alterations induced by cyclophosphamide, suggesting that these responses occur through mechanisms independent of ROS production.

Keywords: EROS; Nebivolol; Cyclophosphamide; Cystitis; Bladder.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismo de ação das mostardas Nitrogenadas.....	15
Figura 2 - Metabolismo da ciclofosfamida.....	16
Figura 3 - Mecanismo de ação do Nebivolol nas células endoteliais e do músculo liso pelos receptores beta-adrenérgicos.....	21
Figura 4- Modelo experimental.....	25
Figura 5- Efeitos do tratamento com ciclofosfamida e nebivolol sobre a produção de O ₂ •- em bexiga, córtex renal e timo.....	30
Figura 6 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida e nebivolol sobre a lipoperoxidação tecidual e sistêmica.....	31
Figura 7- Efeito do tratamento com ciclofosfamida e nebivolol sobre a concentração de GSH reduzida na bexiga.....	32
Figura 8 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida e nebivolol sobre a concentração de nitrito na bexiga.....	33
Figura 9 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida e nebivolol sobre a atividade da SOD na bexiga.....	34
Figura 10 - Efeito da ciclofosfamida no perfil urinário dos animais.....	35
Figura 11- Efeito da ciclofosfamida na razão peso da bexiga/peso corporal.....	36
Figura 12 - Curva concentração-resposta em tiras de bexigas isoladas ao carbacol (A), ao cloreto de potássio (KCl; B) e estimulação de campo elétrico (EFS; C).....	37
Figura 13 - Parâmetros cistométricos em camundongos.....	39
Figura 14 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida no consumo e peso dos animais.....	40
Figura 15 - Esquema da proposta de mecanismo do efeito protetor do nebivolol em relação ao estresse oxidativo causado pela ciclofosfamida.....	46

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	14
2.OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVOS GERAIS:	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	23
3.MÉTODOS	24
3.1. ANIMAIS:	24
3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS:	24
3.3. DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE O ₂ ^{•-} :.....	25
3.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MALONDIALDEÍDO (MDA):.....	26
3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA (GSH) REDUZIDA:	26
3.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO:	26
3.7. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD):.....	27
3.8. AVALIAÇÃO DO PERFIL MICCIONAL:	27
3.8.1. <i>Teste de mancha de micção em papel filtro:</i>	27
3.8.2. <i>Análise cistométrica:</i>	27
3.9. AVALIAÇÃO DE EDEMA:.....	28
3.10. ENSAIO FUNCIONAL <i>IN VITRO</i> NA BEXIGA:.....	28
3.11 CAMPO DE ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA (EFS):.....	29
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA:.....	29
4.RESULTADOS	30
4.1. DETERMINAÇÃO DA GERAÇÃO DE O ₂ ^{•-} NA BEXIGA, CÓRTEX RENAL E TIMO	30
4.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE MDA NA BEXIGA, CÓRTEX RENAL E TIMO.....	30
4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH REDUZIDA NA BEXIGA.....	31
4.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE NITRITO	32
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	33
4.6. AVALIAÇÃO DO PERFIL MICCIONAL E EDEMA	34
4.7. AVALIAÇÃO DA CONTRAÇÃO DA BEXIGA	36
4.8. AVALIAÇÃO DA CISTOMETRIA DA BEXIGA	37
4.9. AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E CONSUMO (ÁGUA E RAÇÃO).....	40
5.DISSCUSSÃO	41
6.CONCLUSÃO	46
7.REFERÊNCIA:	47
ANEXO	61

1.Introdução

O câncer compreende um grupo de mais de 100 doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado de células capazes de se espalhar entre tecidos e órgãos adjacentes às estruturas inicialmente afetadas em humanos (BATISTA,2015). Uma neoplasia ocorre devido a eventos moleculares de várias etapas, multifatoriais que envolvem interações entre os genes e o ambiente de um organismo por meio de um processo chamado carcinogênese (BLACKADAR, 2016).

Os fármacos antineoplásicos são classificados de duas maneiras principais: de acordo com sua estrutura química e função em nível celular, e de acordo com suas características específicas do ciclo celular. A primeira os divide em seis grupos: agentes alquilantes (ciclofosfamida, dacarbazina, ifosfamida); antimetabólitos (metrotexato e mercaptopurina); antibióticos anticancerígenos (doxorubicina e bleomicina); alcalóides vegetais (vincristina e paclitaxel); muitos agentes (hidroxicarbamida) e hormônios e antagonistas hormonais (estrogênios e antiestrogênios) (SOARES,2010).Os quimioterápicos têm como objetivo atacar as células cancerígenas, mas devido à sua baixa especificidade e alta toxicidade, podem atingir tanto regiões-alvo quanto outras não afetadas pela doença, originando um número de efeitos colaterais associados ao fármaco (SILVA,2010).Dentre eles, os mais comuns são: dor, náuseas e vômitos, queda de cabelo, alterações de peso, fadiga e ansiedade (SALCI,2009).

Os agentes alquilantes são fármacos antineoplásicos independentes do ciclo celular que atuam sobretudo pela ligação de grupos alquilo a várias partes do DNA. Isto resulta na formação de ligações cruzadas no DNA, levando à inibição da replicação e a danos no DNA. O efeito geral é a morte das células cancerígenas. Um dos principais fármacos utilizados na classe de alquilantes, é a ciclofosfamida, que também aparece como medicamento de escolha em imunossupressores e imunoterápicos (RENAME,2022).

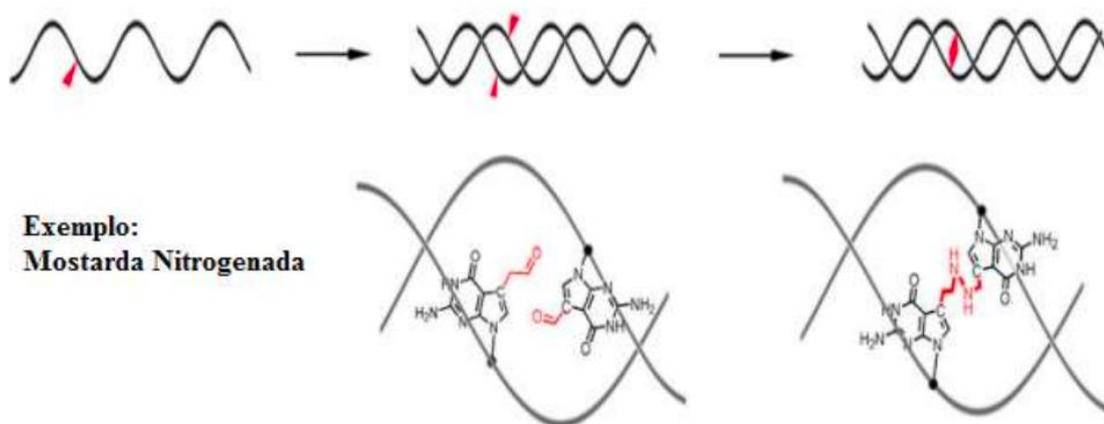


Figura 1- Mecanismo de ação das mostardas Nitrogenadas.

As mostardas nitrogenadas tal qual outros agentes alquilantes têm como principal sítio de alquilação no DNA a posição N7 da guanina, porém outras bases podem ser menos extensivamente alquiladas, como a adenina nas posições N1 e N3, a citosina no N3 e a guanina no O6, assim como grupos fosfatos e proteínas associadas ao DNA (MORAES,2016)

O mecanismo de ação da ciclofosfamida envolve a alquilação do DNA da célula ao se vincular com o átomo de nitrogênio que ocupa a posição 7 da guanina, passível à formação de ligação covalente, interferindo na sua divisão celular. A ciclofosfamida é um pró-fármaco, pois precisa passar por oxidação hepática no carbono de posição 4 (P-N) para formar o metabólito intermediário 4-hidroxíciclofosfamida através da isoenzima do citocromo P450, também resultando na produção da aldofosfamida, tornando-se ativa. A aldofosfamida é quimicamente instável, passa pela eliminação do grupo fosforil a partir da enzima aldeído desidrogenase, formando a carboxifosfamida, que apresentam atividade antitumoral (mostarda nitrogenada) (SANTOS,2017). Porém essa reação também gera produtos tóxicos como a acroleína, que está diretamente relacionada ao desequilíbrio redox, causando danos ao aumentar os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) na bexiga assim como em outros tecidos (KORKMAZ et al., 2007; IQUBAL et al., 2019).

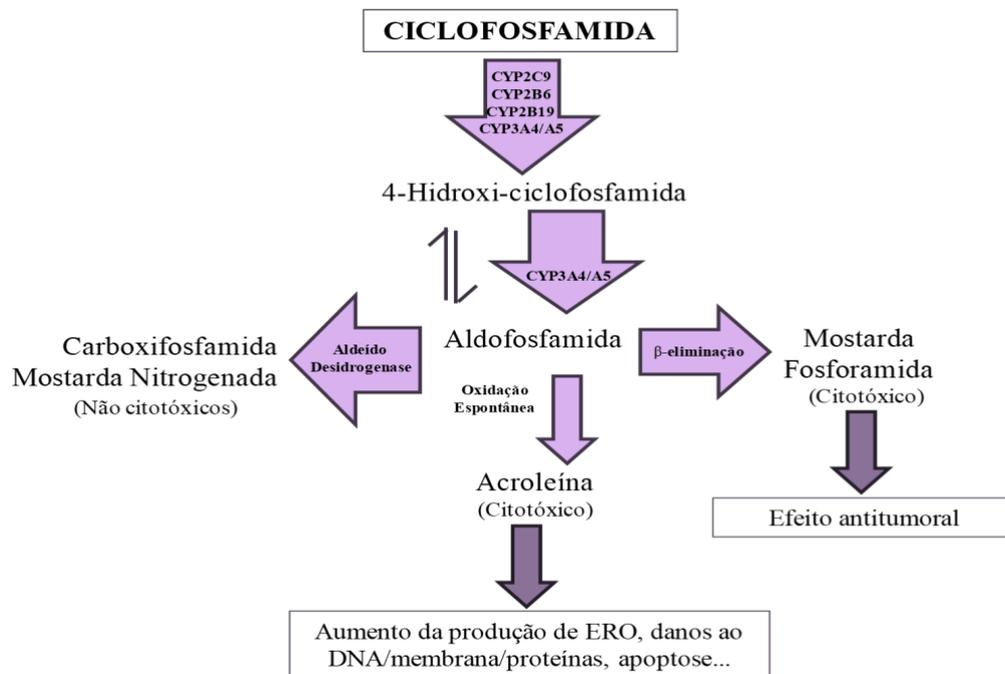


Figura 2 - Metabolismo da ciclofosfamida.

O metabolismo hepático da ciclofosfamida é complexo e envolve vários passos reacionais que geram intermediários tóxicos e atóxicos. Na primeira etapa do metabolismo as CYPs convertem a ciclofosfamida em 4-hidroxi-ciclofosfamida que é em seguida transformada em aldofosfamida pelas CYP3A4/A5. A partir da aldofosfamida é formada a mostarda fosforamida que apresenta ação farmacológica. A aldofosfamida pode ainda gerar produtos não tóxicos (carboxifosfamida e mostarda nitrogenada) e produtos tóxicos (acroleína) (adaptado de Iqbal et al., 2019). CYP: enzimas da família do citocromo P450; ERO: espécies reativas de oxigênio.

As células possuem mecanismos para manter a homeostase redox entre a produção de ERO e as defesas antioxidantes (BURTON; JAUNIAUX, 2011; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013). As ERO em condições fisiológicas são geradas principalmente no metabolismo oxidativo das células, formando o ânion superóxido ($O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$) que pode reagir com o óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), o peróxido de hidrogênio ($O_2 + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$) e a hidroxila ($H_2O_2 + e^- \rightarrow OH + OH$) (SILVA,2010). As defesas antioxidantes incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutatiónaperoxidase (GPx) e catalase, e outras não enzimáticas, como a glutatiónareduzida (GSH) (SILVA,2010). A enzima SOD é a primeira a combater os radicais livres, ela age dismutando o ânion superóxido a H_2O_2 (BARBOSA,2010). As enzimas catalase e GPx se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 , que possibilita, por meio das reações de Fenton e Haber- Weiss, a geração do radical hidroxila ($OH\cdot$) contra o qual não existe defesa enzimática. A GPx reduz o peróxido de hidrogênio à

água, no entanto o faz à custa da conversão da glutatona reduzida em oxidada. Assim, é fundamental a ação da glutatona redutase, responsável pela recuperação da GSH, possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutatona e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de proteção enzimático (ROVER et al, 2001). No entanto, quando a produção de ERO supera a capacidade antioxidante da célula, radicais livres modificam e prejudicam diversas moléculas celulares, como DNA, RNA, proteínas e lipídios (VERBEKE, 2011). A peroxidação lipídica aumenta a permeabilidade das membranas celulares, podendo levar a apoptose. A oxidação do DNA gera a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, gerando mutações e promovendo o processo de carcinogênese (SOSA et al., 2013).

É importante ressaltar que a enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NAD(P)H] oxidase desempenha importante função na mediação dos efeitos tóxicos da ciclofosfamida na bexiga, já que foi identificado um aumento da expressão de suas subunidades, que atuam como fonte de geração de ERO (CHEN et al., 2010). A NADPH oxidase (NOX) é utilizada por enzimas como doadora de elétrons para gerar superóxidos ao catalisar a produção de $O_2^{\cdot-}$ pela redução de O_2 , ($2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$) (SALAZAR, 2018). A NOX, possui sete membros envolvidos em diversas funções fisiológicas humanas essenciais que se diferem de acordo com sua distribuição celular e tecidual, mecanismo de ativação ou sistema regulatório. As subunidades catalíticas são classificadas em Nox1, Nox2 (ou gp91phox), Nox3, Nox4, Nox5 e Duox1 e Duox2 (RODIÑO-JANEIRO et al., 2013; VERMOT et al., 2021). A via PI3K / AKT / mTOR é uma via de sinalização intracelular importante na regulação do ciclo celular. Portanto, está diretamente relacionado à quiescência celular, proliferação e câncer. A ativação do PI3K fosforila e ativa o AKT, localizando-o na membrana plasmática. Em estudos abordando a disfunção da bexiga, a via de sinalização PI3K/Akt mediou a ativação de Nox2 induzida pelo fator de interação com TG e o aumentou a produção de superóxido (SHIMADA et al., 2012; ALEXANDRE et al., 2016; SUNG et al., 2016; VERMOT, 2021). A acroleína, teve sua participação aparente no desequilíbrio redox pelo seu poderoso efeito depletor sobre as enzimas antioxidantes, incluindo glutatona-S-transferase (GST), SOD e catalase (MOGHE ET AL., 2015). Weietal (2012) demonstrou que ciclofosfamida (100 mg/kg) induz estresse oxidativo por meio do aumento de malondialdeído e de óxido nítrico e, diminuição da atividade da catalase e da SOD em camundongos. A ciclofosfamida também induz cardiotoxicidade, urotoxicidade e genotoxicidade em camundongos, além de

induzir aberrações cromossômicas (ŞEKEROĞLU V.; AYDIN; ŞEKEROĞLU Z, 2011).

O aumento do estresse oxidativo regula direta e/ou indiretamente a expressão, estrutura e localização subcelular de genes pró-inflamatórios. Esse cenário é observado no efeito tóxico da ciclofosfamida em vários tecidos nos quais o aumento da produção de ERO foi concomitante ao aumento da expressão de proteínas pró-inflamatórias (TRIPATHI e JENA, 2010; CHEN et al., 2014). O radical $\text{OH}\cdot$ é capaz de ativar o fator o NF- κ B, envolvido na cascata de sinalização da inflamação ao se ligar a regiões específicas do DNA e induzir a transcrição de vários genes de proteínas pró-inflamatórias, o que potencializa o efeito da acroleína na lesão da bexiga urinária (KORKMAZ et al., 2007; SAEIDNIA; ABDOLLAHI, 2013). O peróxido de hidrogênio também age controlando a sinalização e a proliferação celular, porém, quando produzido em altas concentrações pode dar início a apoptose e necrose celular (ABDOLLAHI, 2012).

De acordo com Germanas e Pandya (2002), a cistite hemorrágica é um efeito colateral bastante conhecido e o principal sintoma de intoxicação por ciclofosfamida. O urotélio é uma barreira entre a urina e a bexiga urinária que adquire enorme importância devido ao seu papel de destaque na fisiopatologia da disfunção da bexiga (BURY MI, 2014). Como a acroleína interage diretamente com as células uroepiteliais, provocando aumento de EROs e/ou NF- κ B, ela eleva também a expressão de citocinas e de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) local. A iNOS produz grande quantidade de NO favorecendo a produção de peroxinitrito (ONOO-) potente oxidante capaz de oxidar lipídeos de membrana e causar dano ao DNA da célula (KORKMAZ et al., 2007). Essas reações criam uma condição de inflamação da parede da bexiga com hemorragia, danificando o músculo detrusor ao induzir a apoptose urotelial (HALDAR, 2014). Seus principais sintomas são caracterizados pela presença de macro e micro hematúria, dor suprapúbica e aumento da frequência urinária (bexiga hiperativa) (MANIKANDAN et al., 2010). Além de danos diretos ao urotélio, outros estudos demonstraram que o aumento de ERO causa modificações nas fibras colágenas, elevando sua presença e espessamento na camada muscular da bexiga e aumentando a densidade do tecido neural (VALE, 2019). O aumento da síntese de proteínas pró-inflamatórias como iNOS, IL-6 e TNF- α também é um mecanismo pelo qual a ciclofosfamida induz cistite (YILDIRIM et al., 2004; TOPAL et al., 2005; TRIPATHI e JENA, 2010; CHEN et al., 2014). Assim como as infiltrações de macrófagos cooperariam para o processo inflamatório descrito na bexiga, uma vez que aumento dessas células foi relatado em outros tecidos em resposta à ciclofosfamida (ABRAHAM e RABI, 2011; ABRAHAM e ISAAC, 2011b; GOUDARZI et al.,

2017). O músculo detrusor é um músculo liso da parede da bexiga urinária que durante a micção, tem atuação da acetilcolina nos receptores muscarínicos M2 e M3, que geram a contração expulsando a urina da bexiga (ANDERSSON, 2004; VALE, 2019). As fibras nervosas simpáticas presentes na bexiga liberam noradrenalina que atua nos receptores β 2 e β 3 adrenérgicos, induzindo o relaxamento do músculo detrusor (YAMAGUCHI et al., 2007). A ativação dos receptores β 3 adrenérgicos gera relaxamento da bexiga, secundária à ativação da adenilciclase e formação de monofosfato cíclico de adenosina (NOMIYA,2014). Os fármacos α -bloqueadores apresentam efeito de melhora dos sintomas relacionados à bexiga hiperativa, porém com poucos estudos que justifiquem sua aplicação clínica(CHANG, 2008). Camundongos expostos a ciclofosfamida sofrem alterações no comportamento miccional, caracterizado por um grande número de pontos urinários e pequenos volumes urinários, o que é consistente com os registros cistométricos mostrando aumentos na frequência miccional e contrações não miccionais, comprovando uma disfunção do trato urinário (EVERAERTS et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2018). Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da bexiga hiperativa são os da classe farmacológica dos anticolinérgicos, cujas reações adversas mais comuns são a xerostomia e a constipação, que terminam por prejudicar a adesão ao tratamento. Atualmente no Brasil, também é utilizado o mirabegrona, um agonista dos receptores adrenérgicos do tipo beta-3 indicado para o tratamento sintomático da urgência miccional, aumento da frequência de micções e incontinência de urgência em adultos com síndrome da bexiga hiperativa (BH).

Do ponto de vista teórico, um agente citoprotetor ideal seria aquele que pudesse manter a intensidade relativa da dose quimioterápica, protegendo um espectro mais amplo de órgãos e tecidos do maior número possível de agentes quimioterápicos, mantendo a atividade antitumoral e apresentando a menor toxicidade intrínseca. Os agentes quimioterápicos podem afetar muitos órgãos e tecidos. A toxicidade desses quimioterápicos pode ser considerada o principal fator limitante no tratamento do câncer. Atualmente, três medicamentos citoprotetores estão disponíveis no Brasil: dois deles são específicos, um para a proteção ao coração (Dexrazoxane- reduzindo a incidência e severidade da cardiopatia associada à administração da doxorubicina) e outro, de vias urinárias (Mesna- Profilaxia da cistite hemorrágica induzida pela ifosfamida e ciclofosfamida) ; e um de amplo espectro de proteção (Amifostina- Para reduzir a toxicidade cumulativa associada à administração de cisplatina e alquilantes) (SOUZA,2000).

O mesna reduz a incidência da cistite hemorrágica induzida pela ciclofosfamida

e ifosfamida, porém ele não previne ou reduz outras reações adversas relacionadas a estes agentes alquilantes. O mecanismo de proteção está associado à reação de um radical sulfidríla livre do mesna com a acroleína, dando origem a um produto estável e não tóxico que pode ser eliminado pela urina. O mesna é capaz ainda, de bloquear e estabilizar a metabolização do alquilante na bexiga, prevenindo assim, a formação adicional de acroleína. A dose de mesna utilizada é, em geral, 20% da dose de ifosfamida e 100% da ciclofosfamida (BATISTA,2002). No entanto, o mesna não evita ou diminui as ações tóxicas da ciclofosfamida em outros órgãos (MATZ e HSIEH, 2017), tornando-se pertinente a avaliação de fármacos que possuam ação citoprotetora de amplo espectro.

O desenvolvimento de agentes citoprotetores tem permitido a elevação das doses terapêuticas quimio e/ou radioterápicas, sem comprometer a ação anti-tumoral, melhorando a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes. Trata-se de uma nova modalidade terapêutica, ainda com muitos elementos a serem desenvolvidos, mas que, certamente, poderá dar suporte às terapêuticas mais intensas e, potencialmente, mais tóxicas (SOUZA, 2000).

O nebivolol é um antagonista dos receptores β -adrenérgicos de terceira geração com alta seletividade para os receptores β_1 -adrenérgicos, que previne a agregação plaquetária e adesão de monócitos devido à sua atividade vasodilatadora resultante da estimulação da secreção de NO pelo endotélio vascular. Ao diminuir a resistência vascular, o nebivolol induz um aumento do volume sistólico, o que possibilita a retenção do débito cardíaco apesar do efeito ino- e cronotrópico negativo. Este fármaco é amplamente utilizado na farmacoterapia da hipertensão grave e seu metabolismo por hidroxilação aromática é condicionado ao polimorfismo genético oxidativo dependente CYP2D6 (WRÓBEL, 2019).

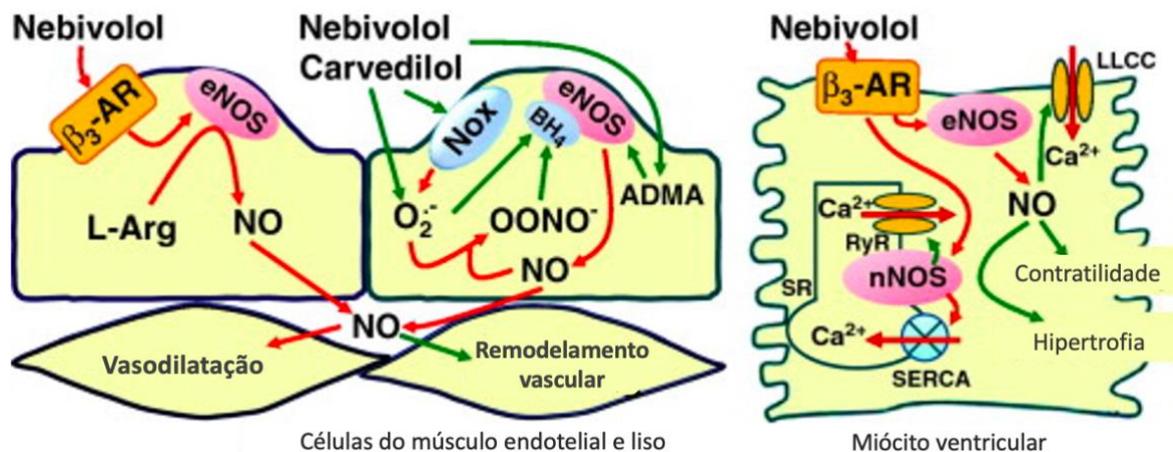


Figura 3 - Mecanismo de ação do Nebivolol nas células endoteliais e do músculo liso pelos receptores beta-adrenérgicos.

Na vasculatura (esquerda), a ativação de $\beta_{1,2,3}$ -ARs estimula a conversão de óxido nítrico (NO) de L-arginina (L-Arg) por eNOS nas células endoteliais. A ativação de $\beta_{1,2,3}$ -ARs nas células musculares lisas estimula a adenil ciclase resultando na elevação de AMPc e na ativação de PKA. A PKA também pode causar vasodilatação ao diminuir $[Ca^{2+}]_i$. Nos miócitos cardíacos (direita), a ativação de $\beta_{1,2}$ -ARs estimula a contratilidade via sinalização cAMP-PKA. A PKA pode aumentar a $[Ca^{2+}]_i$ estimulando o canal de cálcio dependente de voltagem do tipo L (LTCC) na membrana celular e ativando o receptor de rianidina (RyR) no retículo sarcoplasmático (SR). A ativação mediada por PKA da ATPase de cálcio SR (SERCA) aumenta a carga de armazenamento de SR e, assim, aumenta a contração (adaptado de VANHOUTTE, 2012).

O nebivolol possui efeitos adicionais como a produção de NO via ativação de receptores β_3 -adrenérgicos, inibição da NADPH oxidase e eliminação direta de O_2^- , reduzindo a produção de ERO, diminuindo o grau de lipoperoxidação e dano tecidual (OELZE et al., 2006; MAFFEI, 2009; SERG et al., 2012; WANG et al., 2017; CERON et al., 2013; DO VALE et al., 2018). Ao diminuir a degradação do NO, contribui assim para o aumento da sua biodisponibilidade, complementando a ação antioxidante (IGNARRO, 2004). Esse fármaco possui alta lipofilicidade e centros quirais, ou seja, seu princípio ativo existe como L- e D-enantiômeros. O D-nebivolol tem uma afinidade 175 vezes maior pelos receptores β_1 do que o L-nebivolol e, portanto, é o principal responsável pelos efeitos cardíacos. Enquanto o L-nebivolol medeia principalmente a liberação de NO derivado do endotélio. Sua atividade anti-hipertensiva é eficaz e possui meia vida longa em comparação com outros medicamentos, como o atenolol. Isso contribui para uma maior adesão do paciente

pela menor administração do fármaco (OLAWI,2019). Em um trabalho publicado por Altunkaynak-Camca (2020), ratos pré- tratados com nebivolol (0,4 mg/kg) tiveram citoproteção por supressão do aumento ERO e de níveis de IL-6, melhorando então a resposta contrátil a vários estimulantes nas tiras da bexiga isoladas de ratos expostos a lesão de lesão de reperfusão. Ilhan et al. (2004) relataram que o tratamento com nebivolol preveniu significativamente a depleção da atividade da SOD e ativou enzimas antioxidantes, demonstrando um efeito considerável do nebivolol como um potente eliminador de radicais livres, no estado neurológico, bioquímico e histopatológico na medula espinhal em coelhos. Rakhmatullaeva et al. (2003) avaliaram a influência do nebivolol nos processos de peroxidação lipídica e metabolismo lipídico em pacientes com hipertensão arterial. A peroxidação lipídica foi determinada nos eritrócitos, os níveis lipídicos foram definidos no sangue da veia pérvia antes e após a terapia com nebivolol. Eles demonstraram que a terapia com nebivolol suprimiu a peroxidação lipídica e ativou as enzimas antioxidantes.

A terapia oncológica tem característica intervencionista onde doses de quimioterápicos (isolados ou combinados) cada vez maiores tem sido usadas na tentativa de vencer a resistência primária das neoplasias. Nesse contexto, a toxicidade e os efeitos colaterais associados ao uso dos antitumorais passam a ter um papel importante, podendo comprometer a sobrevida e a qualidade de vida do paciente. O uso de agentes citoprotetores permite o aumento das doses terapêuticas dos quimioterápicos sem comprometer a ação antitumoral desses fármacos, melhorando assim a sobrevida e a qualidade de vida dos pacientes. Trata-se de uma modalidade terapêutica, ainda com muitos elementos a serem desenvolvidos, mas que, certamente, poderá contribuir para a terapia com quimioterápicos. Dessa forma a avaliação de fármacos com potencial citoprotetor é de interesse. Considerando que o efeito citotóxico da ciclofosfamida tem como mecanismo central a geração de ERO e que o nebivolol possui ação antioxidante atuando por um mecanismo diferente do mesna, a hipótese do presente estudo é de que o nebivolol irá prevenir as alterações do estado redox vesical causadas pela ciclofosfamida por meio de seus efeitos pleiotrópicos.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais:

O presente estudo foi delineado de forma a investigar os mecanismos envolvidos na ação citoprotetora do nebivolol em relação aos danos causados pela ciclofosfamida na bexiga.

2.2 Objetivos específicos:

- 1- Avaliar o aumento da produção de ERO na bexiga, rim e timo causado pela ciclofosfamida e o possível efeito antioxidante do nebivolol.
- 2- Avaliar se o nebivolol previne os danos causados pela ciclofosfamida nas defesas antioxidantes.
- 3- Avaliar se o nebivolol previne o edema induzido pela ciclofosfamida
- 4- Avaliar se o nebivolol previne as alterações miccionais induzidas pela ciclofosfamida.
- 5- Avaliar se o nebivolol atua como citoprotetor prevenindo a perda da funcionalidade da bexiga após as lesões causadas pela ciclofosfamida.

3. Métodos

3.1. Animais:

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 adultos, com idades médias entre 6 e 8 semanas (20-22 g), provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Durante o tratamento os animais permaneceram no Biotério de Manutenção da EERP/USP que possui temperatura controlada por ar condicionado tipo split (20-22°C), ciclo automático claro/escuro de 12h com livre acesso à água e ração. Os camundongos permaneceram em rack ventilada (AL21, Alesco, Brasil) mantidos em grupos de 8 em mini-isoladores de polissulfona (modelo Ventlife, ALESCO, Brasil) com área de 1.632 cm² (48 cm x 34 cm x 21 cm) tendo cama de maravalha trocada 2 vezes por semana. Os animais foram pesados no início e término do protocolo experimental, assim como o consumo de água e ração. Os procedimentos e protocolos estão em acordo com a legislação vigente do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da EERP/USP (protocolo 20.1.304.22.2).

3.2. Grupos Experimentais:

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos: 1) Controle: animais receberam gavagem de solução de carboximetil celulose (veículo do nebivolol) por 5 dias e injeção intraperitoneal de salina (veículo da ciclofosfamida); 2) Ciclofosfamida: animais receberam gavagem da solução de carboximetil celulose (veículo do nebivolol) por 5 dias e dose única de ciclofosfamida (300 mg/kg; i.p.); 3) Nebivolol: animais receberam nebivolol (10 mg/kg/dia; gavagem) por 5 dias e receberão injeção intraperitoneal de salina (veículo da ciclofosfamida); 4) Ciclofosfamida-nebivolol: animais receberam nebivolol (10 mg/kg/dia; gavagem) por 5 dias sendo que a última dose de nebivolol foi administrada 1 h antes da injeção de ciclofosfamida (300 mg/kg; i.p.) (Figura 1). Vinte e quatro horas após a administração de ciclofosfamida os animais foram anestesiados intraperitonealmente com uretana 1,25g/kg em solução de 25% [5 ml/kg] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mortos por exsanguinação seguida de rompimento do diafragma. A bexiga, sangue, timo e o córtex renal foram coletados e armazenadas em ultrafreezer -80°C. O esquema de tratamento

com ciclofosfamida (dose e via de administração) teve como base estudos da literatura onde foi descrito que essa droga induziu dano vesical em camundongos (EVERAERTS *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2016, 2018). A dose e regime de administração do nebivolol tiveram como base estudos nos quais esse fármaco teve efeito antioxidante (TOPRAK *et al.*, 2008; CERON ET AL., 2013; EL-NAGGAR *et al.*, 2015; DO VALE *et al.*, 2017).

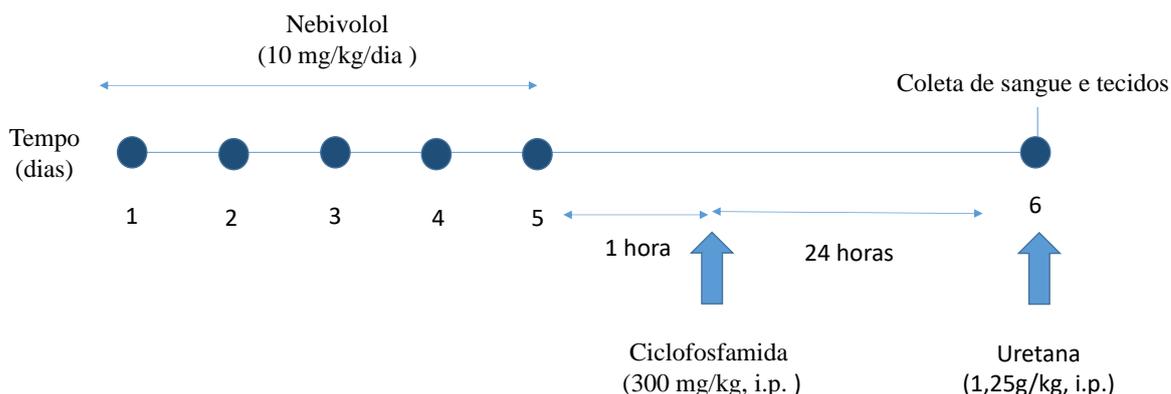


Figura 4- Modelo experimental.

Para avaliação do efeito citoprotetor do nebivolol, os animais foram tratados por 5 dias (10 mg/kg/dia, gavagem) sendo que a última dose de nebivolol foi administrada 1 h antes da injeção de ciclofosfamida (300 mg/kg, i.p.). Os animais receberam dose única de ciclofosfamida e 24 h após injeção foram mortos para isolamento da bexiga.

3.3. Determinação da geração de $O_2^{\cdot-}$:

Os tecidos (bexiga, córtex renal e timo) foram homogeneizados em tampão fosfato pH 7,4 (20 mmol/l de KH_2PO_4 , 1 mmol/l de EGTA e 150 mmol/l de sacarose). A reação foi iniciada pela adição do substrato NADPH (0,1 mmol/l) a uma suspensão (com volume final de 300 μ l) contendo amostra (50 μ l), lucigenina (5 μ mol/l) e tampão fosfato pH 7,4. Os valores de luminescência foram obtidos a partir da subtração do valor basal (obtido pela medida da amostra, tampão fosfato contendo lucigenina) pelo valor obtido após adição de NADPH. Foram realizados 30 ciclos de leitura em um luminômetro Orion II (Berthold detection systems, Pforzheim, Alemanha). Em todos os protocolos experimentais, o conteúdo proteico das amostras foi analisado pelo método de Lowry (Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA, EUA). Os resultados foram normalizados pela concentração proteica de cada amostra e expressos como URL (unidades relativas de luz)/mg de proteína.

3.4. Determinação da concentração de malondialdeído (MDA):

Os tecidos (bexiga, córtex renal e timo) foram homogeneizados em tampão Tris HCl (10 mmol/l; pH 7,4) e centrifugados ($1.600 \times g$, 10 min, 4°C). As amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas ($1.600 \times g$, 10 min, 4°C). Após centrifugação, 100 μ l do sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5 ml aos quais foram posteriormente adicionados 100 μ l de água Milli-Q®, 100 μ l de dodecil sulfato de sódio (SDS 8,1%), 350 μ l de tampão ácido acético pH 3,5 e 350 μ l de ácido tiobarbitúrico 0,6%. Uma curva padrão de malondialdeído (MDA) foi preparada a partir de volumes crescentes de MDA (0,03 mol) sendo as concentrações finais de 22,5, 15, 7,5, 3,75 e 0 mol/l. Em seguida as amostras foram deixadas em banho de aquecimento (95°C, 1 h) e em seguida centrifugadas ($1.600 \times g$, 10 min, 4°C), 150 μ l do sobrenadante foi transferido para uma microplaca de 96 poços e a concentração de MDA foi determinada colorimetricamente em comprimento de onda de 532 nm utilizando a curva para MDA como referência. Os resultados foram expressos em mol/ml para soro e em mol/mg de proteína para os tecidos.

3.5. Determinação da concentração de glutathiona (GSH) reduzida:

A bexiga foi homogeneizada em 200 μ l de PBS (68,9 mmol/l de NaCl, 4,08 mmol/l de Na_2HPO_4 , 0,73 mmol/l de KH_2PO_4 e 1,34 mmol/l de KCl, pH 7,4). Ácido tricloroacético 12,5% (1v/1v) foi adicionado aos homogenatos que permaneceram 30 min em gelo. As amostras foram centrifugadas ($10.000 \times g$, 15 min, 4 ° C) e 100 μ l de sobrenadantes foram analisados espectrofotometricamente a 415 nm. A concentração de GSH reduzida foi determinada com base em sua interação com 5,5'-ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) que forma o produto amarelo 5'-tio-2-nitrobenzóico (TNB). Os resultados foram expressos como $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína.

3.6. Determinação da concentração de nitrito:

Foi preparado 5 mL de reagente Griess em um tubo falcon de 15 mL colocando 1,25

mL do ácido fosfórico 5% + 1,25 mL de sulfanilamida 2% + 1,25 mL de NEED 0,2% + 1,25 mL de dH₂O. As amostras de bexiga foram homogeneizada com 200 µL de PBS 1x (pH 7.4) e foi centrifugada a 10.000 g, 4°C por 20 minutos. Foi pipetada em placa com a curva e lida em em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados foram expressos como µmol/mg de proteína.

3.7. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD):

A bexiga foi homogeneizada em PBS pH 7,4, sendo o homogenato centrifugado a (1.500 × g, 12 min, 4°C). Em seguida, 20 µl de sobrenadante foram adicionados a microplaca para iniciar a reação com o tetrazólio (solução de trabalho) (#19160, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Quanto menor a atividade da SOD, maior a concentração de O₂^{•-} na amostra, que por sua vez reagiu com o tetrazólio levando a formação do formazam, que possui coloração amarela. Os resultados foram expressos em % de inibição, ou seja, a capacidade da SOD em inibir a reação do O₂^{•-} com o tetrazólio.

3.8. Avaliação do perfil miccional:

3.8.1. Teste de mancha de micção em papel filtro:

Os animais foram acondicionados individualmente em gaiolas forradas com papel filtro (26 x 16 cm) durante 3h com livre acesso a água. Após este período, os papéis foram secos naturalmente por 24h (EVERAERTS et al., 2010). As imagens foram obtidas em fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories, CA, EUA) por meio da exposição do papel à luz ultravioleta. O número de micções foi avaliado e a área de micção foi quantificada utilizando-se o programa ImageJ (ImageJ Software, NIH, MA, EUA). Para determinação do volume de micção, foi utilizada uma curva de calibração com volumes conhecidos de urina aplicados no papel filtro e relativizados com a área obtida.

3.8.2. Análise cistométrica:

Os animais foram anestesiados com isoflurano. A bexiga urinária foi exposta e

canulada utilizando um scalp n°25 conectado a uma bomba de infusão de salina e um transdutor de pressão acoplado a um sistema PowerLab 4/30 para aquisição de dados (ADInstruments, Sidney, Austrália). Após canulação a bexiga foi esvaziada e estabilizada por 5 min. Em seguida será iniciada infusão de salina a temperatura ambiente em velocidade constante de 0,6 ml/h por período de 45 min (LEIRIA *et al.*, 2014). Os parâmetros avaliados foram: pressão basal, pressão limiar (pressão intravesical imediatamente antes da primeira micção), capacidade (volume intravesical até a primeira micção), complacência (razão entre a capacidade e a pressão durante o enchimento vesical), pressão de micção (pressão máxima atingida durante a micção), pressão pós-miccional (pressão imediatamente após o fim do esvaziamento vesical), frequência de micções, intervalo de micções (média dos intervalos de tempo entre as micções durante 45 minutos) e frequência de contrações não miccionais (contrações involuntárias da bexiga maiores que 4 mmHg que não resultam em micção).

3.9. Avaliação de edema:

Após 24 horas da injeção de ciclofosfamida, os animais foram pesados e, em seguida eutanasiados. As bexigas foram retiradas e pesadas para posterior avaliação de edema, a qual se baseia na razão entre peso úmido da bexiga (mg) e o peso total do animal (g).

3.10. Ensaio funcional *in vitro* na bexiga:

Após a eutanásia, as bexigas foram retiradas e duas tiras longitudinais de músculo liso da bexiga com as mucosas intactas foram obtidas de cada animal. Os tecidos foram colocados em banhos de órgãos com Krebs-Henseleit e a solução borbulhou com 95% O₂/5% CO₂. Os tecidos eram conectados a um transdutor de força e mudanças na isometria da força foram registradas usando o sistema PowerLab (ADInstruments, Inc, Sydney, AU). A tensão de repouso foi ajustada para 5 mN para bexigas no início das experiências e foram deixadas em equilíbrio durante 1 hora. As curvas de concentração- resposta (CRCs) para o agente contrátil carbacol (1 nM-100 µM) foram obtidas nas tiras de bexiga. O respostas máximas (E_{max}) e potência (pEC₅₀) foram calculado usando GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA). As respostas contráteis serão determinadas em mN e expressas pela razão mN/peso da respectiva tira de tecido (mg).

3.11 Campo de estimulação elétrica (EFS):

A partir das amostras de bexiga, foram preparadas tiras de músculo medindo aproximadamente 7 mm por 1,5 mm, não esticadas, utilizando um microscópio cirúrgico para possibilitar o corte de tiras com bom alinhamento longitudinal das fibras musculares. Fios de seda finos foram amarrados em cada extremidade da tira que foi então montada em um banho de órgãos especialmente construída com capacidade de 0,2 ml e continuamente perfundida com solução de Krebs entre 34,5 e 36,5 °C em um aparelho de superfusão. Dentro do banho de órgãos, a tira muscular foi montada entre eletrodos de anel de platina separados por 1 cm de distância. As tiras foram deixadas em equilíbrio durante pelo menos 1 h, durante a qual uma tensão de repouso de 0,5 g foi aplicada. As alterações de tensão isométrica foram medidas utilizando transdutores de tensão UF 1 e, após amplificação, as contrações foram registradas em um gravador de caneta multicanal. Os impulsos elétricos para estimulação de campo foram dados a bexiga entre dois eletrodos de anel de platina conectados a um estimulador (Grass Technologies, RI). A EFS foi conduzida a 80 V, largura de pulso de 1 ms e com estímulos de 10 segundos de duração em frequências variadas (1-32 Hz).

3.12. Análise estatística:

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). Análise de variância de duas vias (two-way ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey foi realizada para detectar as diferenças entre os valores em estudo. $P < 0,05$ foi considerado significativo. As análises foram realizadas usando o programa GraphPadPrism 8.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

4. Resultados

4.1. Determinação da geração de $O_2^{\bullet-}$ na bexiga, córtex renal e timo

O estresse oxidativo causados pela CYP em diversos órgãos já foi muito bem descrito na literatura, principalmente sua fonte de $O_2^{\bullet-}$ vinda do complexo da NADPH oxidase. Para avaliar os efeitos preventivos do nebivolol e sua participação nessa via, utilizamos o protocolo da Lucigenina que, por meio da quimioluminescência, interage com o ânion super óxido. Quando adicionamos NADPH como substrato conseguimos quantificar a origem do $O_2^{\bullet-}$. A ciclofosfamida aumentou a produção de $O_2^{\bullet-}$ na bexiga (Fig. 5A), córtex renal (Fig. 5B) e timo (Fig. 5C). Essas respostas foram prevenidas pelo tratamento com nebivolol corroborando com a hipótese do seu efeito antioxidante.

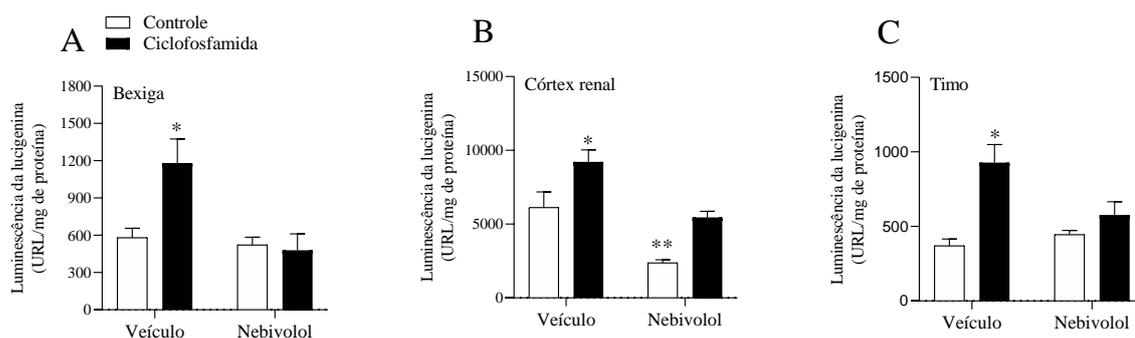


Figura 5- Efeitos do tratamento com ciclofosfamida e nebivolol sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ em bexiga, córtex renal e timo.

Os níveis de $O_2^{\bullet-}$ foram avaliados na bexiga (n=7-13; A); córtex renal (n= 5-8; B); e timo (n= 5-6; C) de camundongos pelo método de quimioluminescência da lucigenina. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM. *Comparado ao controle, nebivolol e nebivolol-ciclofosfamida; **Comparado ao controle e nebivolol-ciclofosfamida ($p < 0,05$; two-way ANOVA seguida de Tukey).

4.2. Determinação da concentração de MDA na bexiga, córtex renal e timo

O burst oxidativo é um processo fisiológico em que as células, especialmente as do sistema imunológico, produzem uma grande quantidade de ERO como parte de sua resposta a estímulos patológicos. Porém ele também pode resultar no aumento da oxidação dos lipídios presentes nas membranas, provocando alterações na capacidade de permitir a passagem de

substâncias e na fluidez dessas membranas. Uma forma de avaliar esse fenômeno é através da quantificação das espécies químicas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são compostos gerados durante a oxidação dos lipídios, incluindo o MDA.

O neбиволол preveniu o aumento da concentração de MDA promovido pela ciclofosfamida na bexiga (Fig. 6A), córtex renal (Fig. 6B) e timo (Fig. 6C). Não houve alteração da concentração de MDA no soro após o tratamento com ciclofosfamida (Fig. 6D).

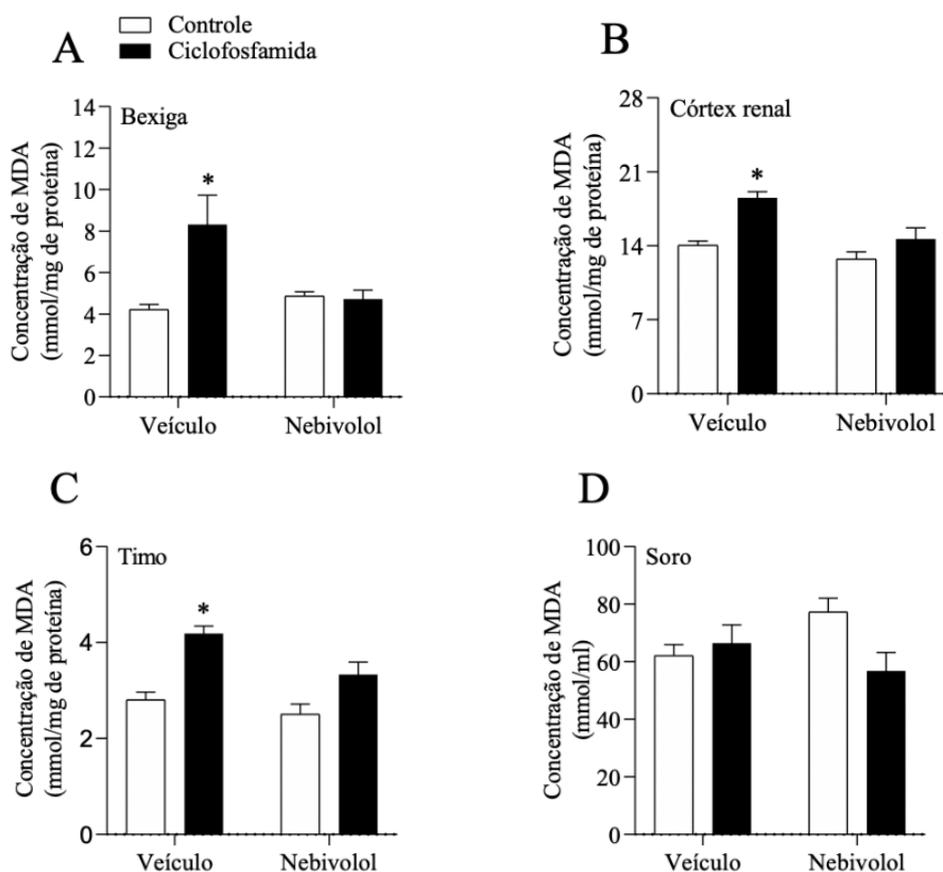


Figura 6 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida e neбиволол sobre a lipoperoxidação tecidual e sistêmica.

A concentração de MDA foi determinada colorimetricamente na bexiga (n=6-8; A), córtex renal (n=5-6; B), timo (n=8; C) e soro (n=8; D) de camundongos após o tratamento com neбиволол e a administração de ciclofosfamida.

Os resultados são apresentados como a média \pm EPM. *Comparado ao controle, neбиволол e neбиволол-ciclofosfamida ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

4.3. Determinação da concentração de GSH reduzida na bexiga

O GSH é um dos principais antioxidantes endógenos presentes nas células ao

desempenhar um papel fundamental na neutralização de espécies reativas de oxigênio (ERO) e outros radicais livres. Durante o estresse oxidativo, o equilíbrio redox pode ser perturbado, levando à diminuição dos níveis de GSH. Então ao medi-los, conseguimos informações sobre a capacidade antioxidante da bexiga em resposta ao estresse oxidativo causado pela ciclofosfamida e se o nebivolol atuaria como antioxidante. A ciclofosfamida promoveu redução das concentrações de GSH reduzida na bexiga em ambos os grupos e o tratamento com nebivolol não preveniu essa resposta (Fig. 7).

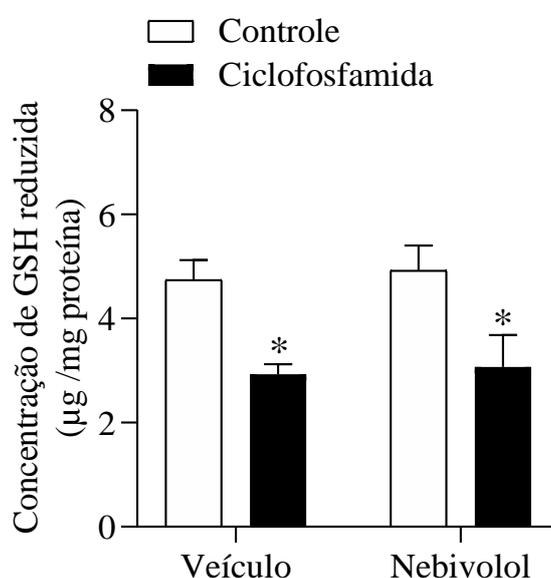


Figura 7- Efeito do tratamento com ciclofosfamida e nebivolol sobre a concentração de GSH reduzida na bexiga.

A concentração de GSH reduzida foi determinada colorimetricamente na bexiga (n=8) de camundongos após o tratamento com nebivolol e a administração de ciclofosfamida. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM. * Comparado ao controle e nebivolol ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

4.4. Determinação da concentração de nitrito

O nitrito (NO_2^-) é um metabólito do óxido nítrico (NO), que é uma molécula importante no sistema de sinalização celular e na regulação de várias funções fisiológicas. Durante o estresse oxidativo, ocorre a produção excessiva de ERO, o que pode resultar na oxidação do NO em níveis elevados de NO_2^- . Portanto, a determinação da concentração de nitrito pode servir como um marcador de estresse oxidativo. A ciclofosfamida não alterou os níveis de nitrito na bexiga. O aumento dos níveis de nitrito pode ser um sinal de que a

função do sistema de óxido nítrico está sendo preservada ou até mesmo potencializada com o uso do neбиволол.

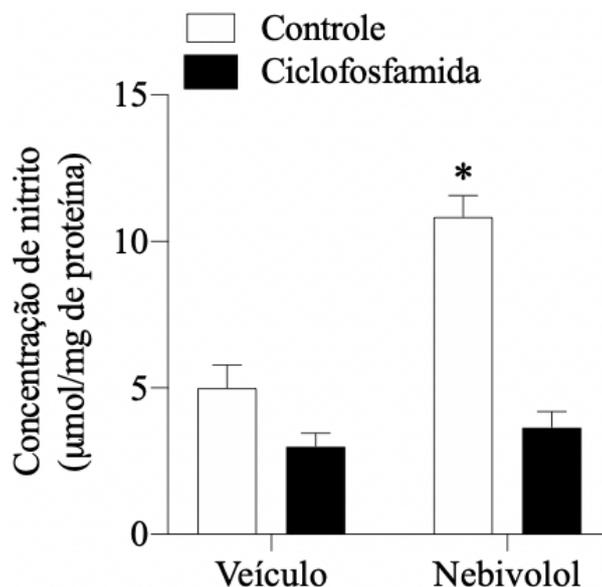


Figura 8 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida e neбиволол sobre a concentração de nitrito na bexiga.

A concentração de nitrito foi determinada colorimetricamente na bexiga (n=6-8) de camundongos após o tratamento com neбиволол e a administração de ciclofosfamida. Os resultados são apresentados como a média \pm EPM. * Comparado ao demais grupos ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

4.5 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A determinação da atividade da SOD fornece informações sobre a capacidade das células de lidar com o superóxido. A ciclofosfamida promoveu redução da atividade da SOD na bexiga e o tratamento com neбиволол preveniu essa resposta. O aumento de NO causado pelo neбиволол tem a capacidade de modular a atividade da superóxido dismutase. Ele pode estimular diretamente a atividade da SOD ou induzir a expressão da enzima, aumentando, assim, sua atividade.

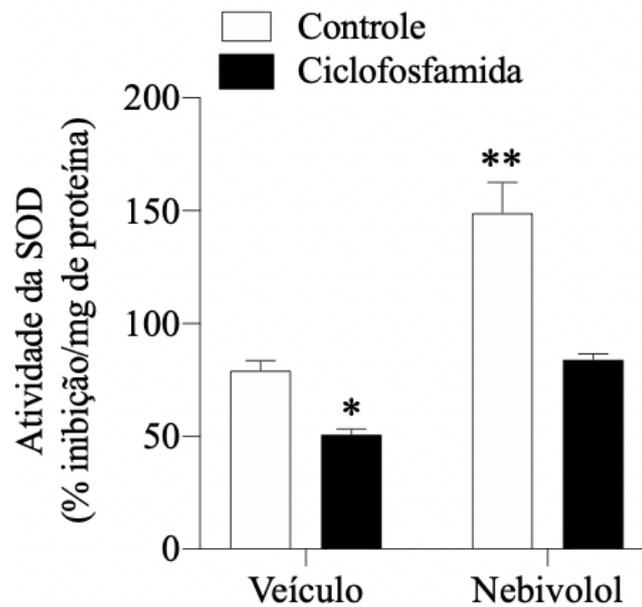


Figura 9 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida e nebivolol sobre a atividade da SOD na bexiga.

A atividade da SOD foi determinada colorimetricamente na bexiga (n=6-8) de camundongos após o tratamento com nebivolol e a administração de ciclofosfamida. Os resultados foram expressos em % de inibição, ou seja, a capacidade da SOD em inibir a reação do $O_2^{\bullet-}$ com o tetrazólio e o apresentados como a média \pm EPM. * Comparado ao demais grupos; ** Comparado ao nebivolol ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

4.6. Avaliação do perfil miccional e edema

O estresse oxidativo pode desempenhar um papel na inflamação e no dano tecidual do trato urinário. A cistite intersticial, por exemplo, está associada a bexiga hiperativa e o estresse oxidativo pode contribuir para essa condição. A análise do perfil miccional fornece informações sobre a presença e a gravidade desses danos. O tratamento com ciclofosfamida promoveu aumento do número de poças de urina (Fig. 10A e B), e diminuiu o volume de micção (Fig. 10C). O tratamento com nebivolol não preveniu esses efeitos.

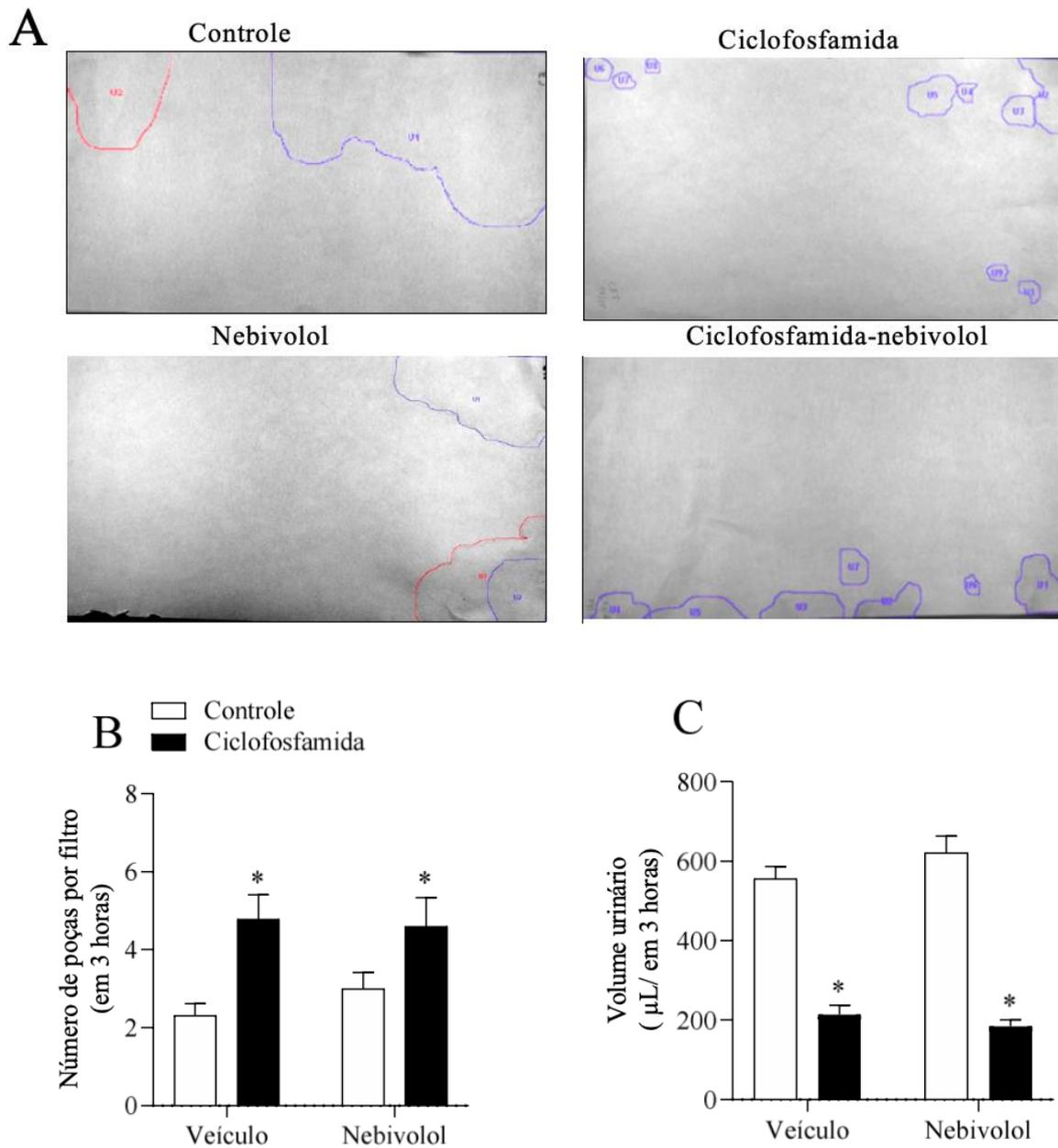


Figura 10 - Efeito da ciclofosfamida no perfil urinário dos animais.

Os camundongos foram acondicionados individualmente em gaiolas forradas com papel filtro durante 3h com livre acesso a água, os papéis foram secos naturalmente por 24h e fotografados em fotodocumentador por meio da exposição do papel à luz ultravioleta. A área de micção foi quantificada (A) e o número de micções foi avaliado (B e C). Os resultados representam a média \pm EPM de $n=13-15$ animais. *Comparado ao controle e nebivolol ($p<0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

A ciclofosfamida promoveu aumento da razão entre o peso úmido da bexiga e o peso corporal, sugerindo a ocorrência de edema. O tratamento com nebivolol não preveniu essa resposta (Fig. 8A e B).

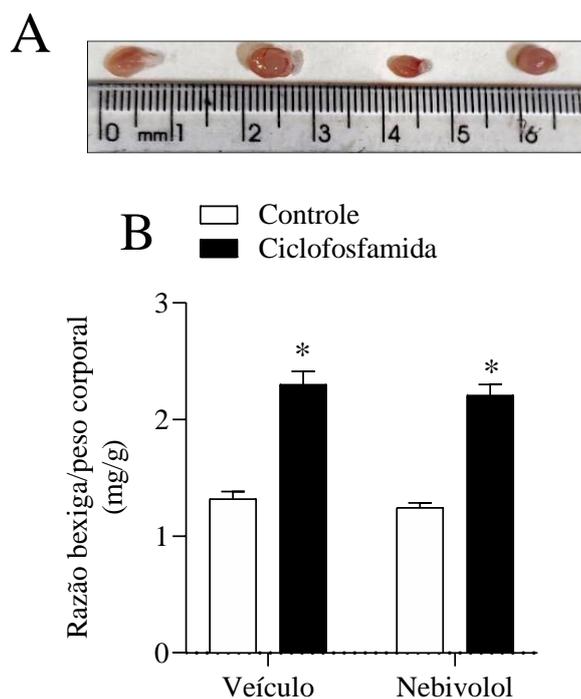


Figura 11- Efeito da ciclofosfamida na razão peso da bexiga/ peso corporal.

As bexigas foram retiradas, pesadas e fotografadas para avaliação de edema (A), baseado na razão entre o peso úmido da bexiga (mg) e o peso corporal (g) (B). Os resultados representam a média \pm EPM de n=24-27 animais.

*Comparado ao controle e nebivolol ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

4.7. Avaliação da contração da bexiga

Para avaliar a funcionalidade da bexiga foi utilizado o carbacol (Fig. 12A), o KCl (Fig. 12B) e a estimulação de campo elétrico (Fig. 12C). Ao utilizar o carbacol para a contração da bexiga, buscou-se estimular os receptores muscarínicos localizados nas células musculares da parede da bexiga e foi demonstrado que no grupo CYP houve uma maior contração com a administração do carbacol e o fornecimento prévio do nebivolol preveniu esse aumento. O potássio é um íon que desempenha um papel essencial na regulação das funções celulares, incluindo a contração muscular. A presença de K^+ extracelular, como no caso do KCl, pode ativar os canais iônicos e promover a despolarização das membranas celulares musculares, levando à contração do músculo detrusor da bexiga. Não houve diferença na contração entre os grupos administrados com KCl. A Estimulação de Campo Elétrico demonstrou que apenas o grupo Ciclofosfamida teve alteração na contração. Essa técnica é comumente utilizada em testes urodinâmicos para avaliar a função da bexiga em situações controladas, fornecendo

informações importantes para diagnóstico e tratamento de distúrbios urológicos.

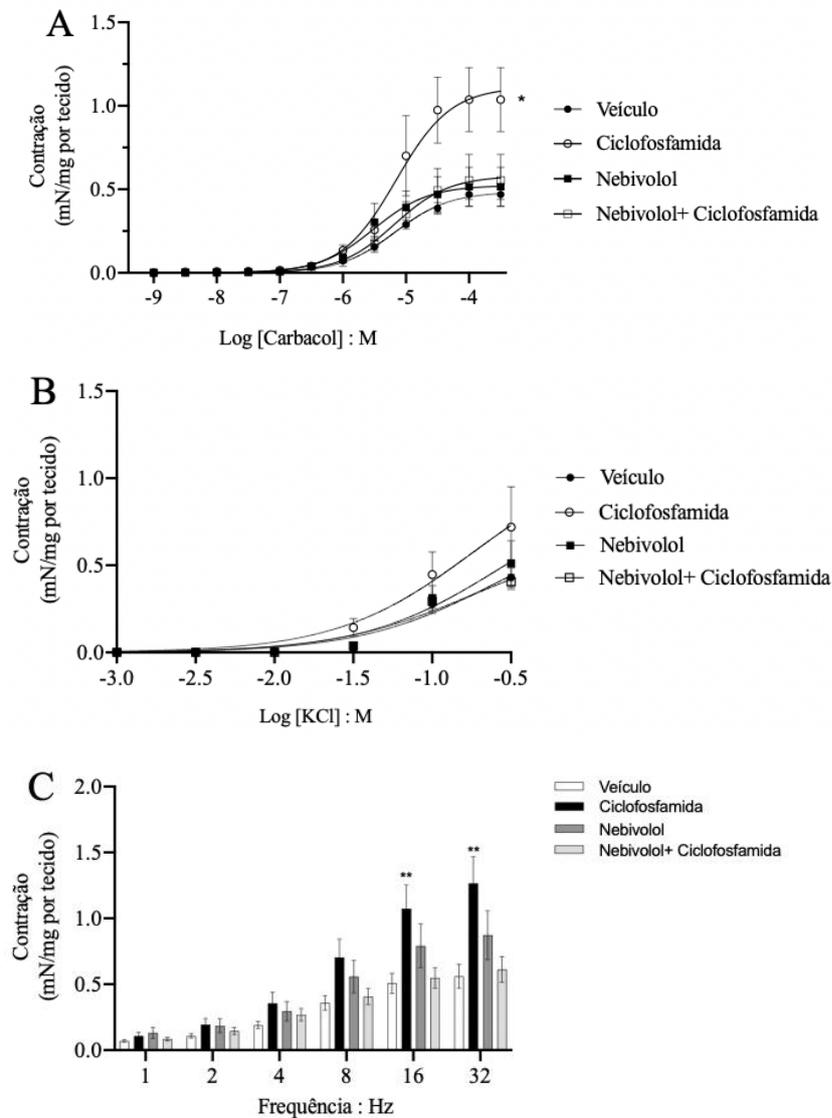


Figura 12 - Curva concentração-resposta em tiras de bexigas isoladas ao carbacol (A), ao cloreto de potássio (KCl; B) e estimulação de campo elétrico (EFS; C).

Após a eutanásia, as bexigas foram retiradas e duas tiras longitudinais de músculo liso da bexiga com as mucosas intactas foram obtidas de cada animal para os testes. Comparado ao controle e nebivolol; **Comparado aos demais grupos. Os resultados representam a média \pm EPM de n=5-7 animais ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

4.8. Avaliação da cistometria da bexiga

A cistometria é um teste urodinâmico utilizado para avaliar a função da bexiga e do

esfíncter urinário. Esse procedimento fornece informações importantes sobre como a bexiga armazena e esvazia a urina, sendo útil para o diagnóstico e tratamento de diversas condições urológicas. Na figura 13A podemos observar o aumento da contratilidade da bexiga no grupo ciclofosfamida a partir dos representativos do traçado cistométrico, caracterizada também pelo aumento na frequência miccional (Fig. 13B) e a diminuição entre intervalos de micção (Fig. 13C), que o nebivolol preveniu com sucesso, ao normalizar esse padrão em relação aos controles. O grupo tratado com CYP também teve a perda da complacência da bexiga (Fig. 13D) e a perda da pressão para urinar (Fig. 13F). O nebivolol potencializou a pressão limiar (Fig. 13E) no grupo NEB+CYP em relação aos demais grupos. As tiras utilizadas nos experimentos foram pesadas, mas não tiveram diferenças significativas (Fig. 13G).

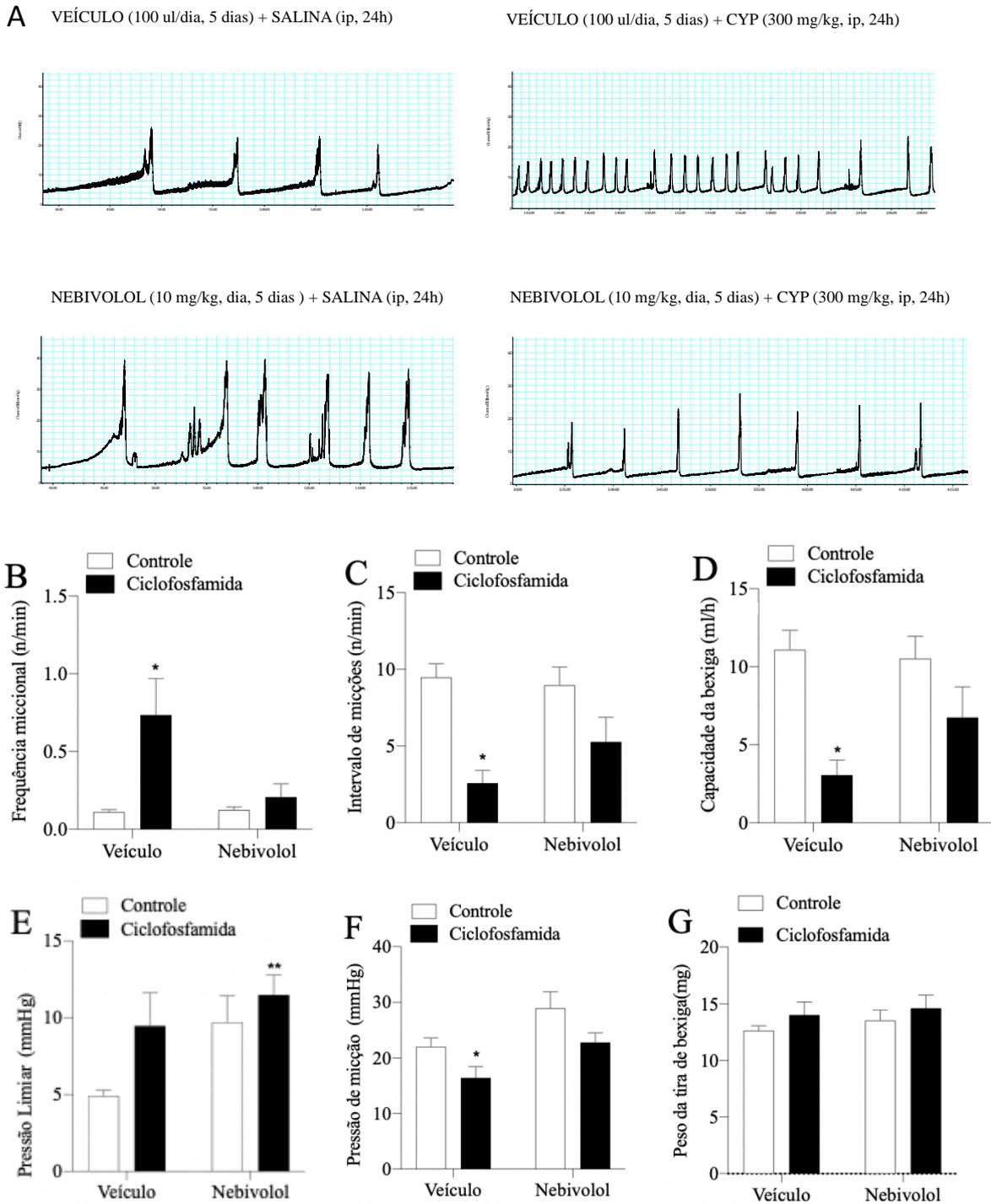


Figura 13 - Parâmetros cistométricos em camundongos.

Foi feita uma incisão abdominal de 1 cm para expor a bexiga e uma cânula de 25 g foi inserida na cúpula da bexiga. Os seguintes parâmetros foram avaliados: frequência miccional (B), intervalo de micções (C), capacidade (D) que equivale ao volume necessário para induzir a primeira micção, pressão limiar (E) que é a pressão imediata antes de esvaziar a bexiga, pressão de pico (F) pressão atingida durante a micção e o peso entre as tiras das bexigas. Um camundongo foi utilizado para cada cistometrograma e eutanasiado imediatamente após o protocolo experimental. *Comparado aos demais grupos, ** Comparado ao controle Os resultados representam a média \pm EPM de n=4-5 animais ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

4.9. Avaliação do peso corporal e consumo (água e ração)

O consumo de água e alimento podem influenciar os resultados de experimentos em várias áreas, incluindo nutrição, toxicologia e farmacologia. Monitorar essas variáveis ajuda a garantir que os resultados do estudo sejam precisos e confiáveis. A ciclofosfamida promoveu redução no peso dos animais ao final do estudo em relação ao grupo controle e neбиволол. Em relação ao consumo de água, os animais que receberam tratamento com neбиволол tiveram diferença estatística em relação ao controle assim como o neбиволол/ciclofosfamida teve com o grupo ciclofosfamida.

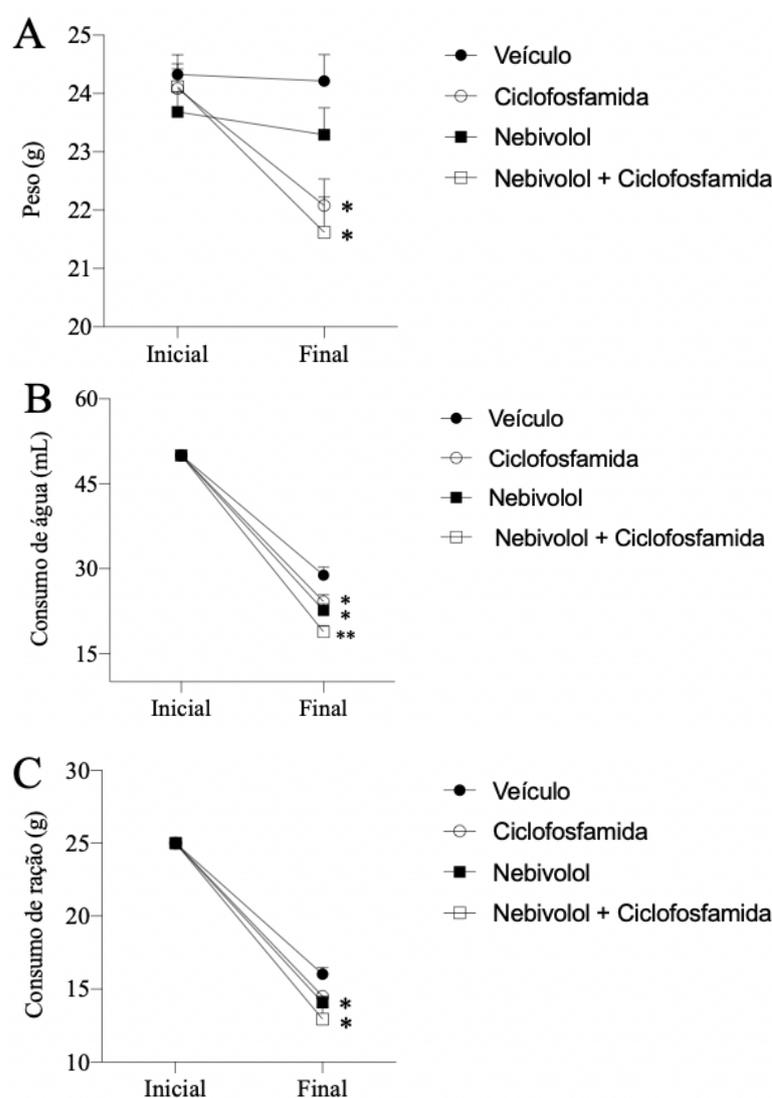


Figura 14 - Efeito do tratamento com ciclofosfamida no consumo e peso dos animais.

A diferença (Δ) entre o inicial para o final foi feita com o peso corporal dos animais (g) (A), consumo de água (mL) (B) e ração (g) (C). Os resultados representam a média \pm EPM de $n=20-25$ animais. * Comparada ao grupo veículo, ** Comparado aos grupos veículo e ciclofosfamida, ($p < 0,05$; *two-way* ANOVA seguida de Tukey).

5. Discussão

O modelo experimental e nossos resultados reforçam a literatura ao comprovar que a disfunção miccional induzida pela ciclofosfamida em camundongos é acompanhada pela modificação dos padrões de resposta antioxidante, lipoperoxidação e conseqüentemente, aumento de ERO nos tecidos (DE OLIVEIRA et al., 2016, 2018; IQUBAL et al. 2019; SOUSA et al., 2021;). A quimioluminescência da lucigenina foi determinada ao detectar a produção de $O_2^{\cdot-}$ pela enzima NAD(P)H oxidase, sugerindo que a ciclofosfamida promove aumento da geração de $O_2^{\cdot-}$ ao ativar essa enzima. Observamos que o tratamento com nebivolol preveniu o aumento de $O_2^{\cdot-}$ induzido pela ciclofosfamida na bexiga, rim e timo, caracterizando a ação antioxidante citoprotetora desse fármaco. Esse mecanismo pode ocorrer com a redução da produção de ERO ao promover ação sequestradora direta do $O_2^{\cdot-}$ e por induzir redução da atividade/expressão da enzima NAD(P)H oxidase (GROOT et al., 2004; OELZE et al., 2006; ZHOU et al., 2010; SORRENTINO et al., 2011; CERON et al., 2013; WANG et al., 2017). O nebivolol age como um agonista parcial nos receptores beta-3 adrenérgicos presentes nos vasos sanguíneos, resultando na liberação de óxido nítrico (NO) pelas células endoteliais. Ao promover a liberação de NO, o nebivolol pode reduzir a formação de $O_2^{\cdot-}$, reduzindo assim a sinalização da lucigenina e permitindo a quantificação da sua ação antioxidante (BUENO-PEREIRA et al., 2022).

O superóxido possui a capacidade de alterar os lipídeos das membranas celulares, com conseqüente perda das propriedades da função, tornando-as menos rígidas e criando fendas iônicas que alteram a sua permeabilidade, favorecendo a passagem indiscriminada de metabólitos celulares e seus resíduos, provocando sua lise e morte celular. Esse processo recebe o nome de peroxidação lipídica (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000). Os níveis da peroxidação lipídica podem ser estimados de acordo com a detecção dos produtos primários ou ainda com os produtos finais da peroxidação, como por exemplo, o malondialdeído (MDA) que é produto secundário dessa reação, estudado com o ácido tiobarbitúrico (TBA) e expresso em substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (RICE-EVANS et al., 1991; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Assim, utilizando o MDA com o biomarcador (GROTTO et al, 2008), foi observado aumento no estresse oxidativo e da lipoperoxidação na bexiga e no timo, tal qual a prevenção do nebivolol nesses dois tecidos. Esses achados corroboram resultados prévios da literatura (DE OLIVEIRA et al., 2016, 2018; SOUSA et al.,

2021), e mostram que o modelo experimental empregado no presente estudo é efetivo em promover aumento do estresse oxidativo. Não houve alteração nos valores de MDA no córtex renal nem no soro após o tratamento com ciclofosfamida e/ou neбиволол, contrariando alguns estudos em que a administração da ciclofosfamida resultou em aumentos no MDA renal (REHMAN, 2012) e outros que o neбиволол diminuiria o MDA no soro (ERDAMAR,2009). Ilhan et al. (2004) relataram anteriormente que o neбиволол reduziu o aumento da concentração de MDA no tecido isquêmico/reperfundido da medula espinhal e sugeriram que possivelmente decorria de sua capacidade de eliminação de ERO. Ao estimular a liberação de NO, o neбиволол ajuda a reequilibrar o sistema redox, reduzindo a produção de EROs e, conseqüentemente, a reduzir a peroxidação lipídica e preservar a integridade das membranas celulares, diminuindo a formação de MDA.

Em situações onde o estresse oxidativo está envolvido, como em tratamentos de quimioterapia, a medição da concentração de nitrito pode ser usada para avaliar a eficácia das intervenções e a capacidade das células de manter a homeostase oxidativa. Apesar de não termos uma diferença em nossos resultados, a ciclofosfamida pode afetar a atividade da enzima óxido nítrico sintase (eNOS), que é responsável pela síntese de óxido nítrico impactando diretamente na produção de nitrito (AKAMO et al., 2021). Em contrapartida, o neбиволол pode aumentar a atividade da eNOS, a partir de precursores no endotélio vascular aumentando a liberação de NO que pode ser convertido em nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) no organismo, já demonstrado em outros modelos experimentais, como o em animais infundidos com angiotensina II (Oelze et al., 2002), podendo justificar os aumentos observados apenas no grupo neбиволол.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo com um grupo sulfidríla reativo que reage com compostos eletrofílicos, elimina radicais livres e reduz peróxidos. A GSH pode remover ERO das células no processo de desintoxicação e também pode conjugar agentes anticancerígenos eletrofílicos para a eliminação dos conjugados de GSH resultantes das células de uma maneira dependente de ATP. Assim, GSH desempenha um papel importante na desintoxicação celular de drogas e oxidantes para modular a resistência das células cancerígenas a agentes anticancerígenos (WANG,2011). A GSH pode atuar tanto como um antioxidante não enzimático por interação direta do grupo $-\text{SH}$ com as ERO quanto pode estar implicada na reação de desintoxicação enzimática das ERO, como cofator ou coenzima. A depleção do conteúdo de GSH pode ser atribuída à conjugação direta da ciclofosfamida e seus metabólitos

com grupos –SH livres ou ligados a proteínas e reduções significativas na atividade da glutathiona peroxidase (SELVAKUMAR,2005). Em nossos estudos, os grupos tratados com ciclofosfamida apresentaram diferença em relação ao controle e neбиволol, mostrando que o neбиволol não preveniu a depleção dessa enzima. Portanto, embora o Neбиволol possa ter efeitos antioxidantes benéficos, ele pode não ser completamente eficaz em todos os cenários de estresse oxidativo, podendo ele atuar em outros componentes do sistema antioxidante ao invés da GSH.

A GSH protege o citoesqueleto das células e macromoléculas intracelulares contra oxidação e lesão celular, reagindo e eliminando ERO, controlando a transcrição de SOD e reativando GST e GSPx (AKAMO et al., 2021). A atividade da superóxido dismutase (SOD) é importante na avaliação do estresse oxidativo, já que ela catalisa a conversão do superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que posteriormente é neutralizado por outras enzimas antioxidantes. Em situações de aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, as células frequentemente aumentam a atividade da SOD como parte de sua resposta de defesa antioxidante. A ciclofosfamida promoveu redução da atividade da SOD na bexiga e o tratamento com neбиволol preveniu essa resposta. Esses resultados sugerem que com a dose de ataque e o tempo de 24h pós administração da CYP, não foi um período suficiente uma resposta de adaptação do sistema antioxidante em decorrência do aumento de $O_2^{\cdot-}$. O óxido nítrico tem a capacidade de modular a atividade da superóxido dismutase. Ele pode estimular diretamente a atividade da SOD ou induzir a expressão da enzima, aumentando, assim, sua atividade.

O uso da ciclofosfamida como modelo experimental de bexiga hiperativa é comumente utilizada, já que ao ser metabolizada pelo fígado, gera seu metabólito tóxico, a acroleína, que se acumula na bexiga resultando em cistite hemorrágica (COX, 1979; REYNOLDS,1969). Estudo recente de Oliveira et al. (2022) evidenciou que o exame histológico das bexigas urinárias expostas a ciclofosfamida induz aumento da relação bexiga/peso corporal, edema grave, desorganização do músculo liso detrusor e extenso desnudamento urotelial. O estudo mostra ainda que o prejuízo da integridade da função da barreira da bexiga tem sido associado à expressão do fator antiproliferativo, que pode retardar a cicatrização urotelial, favorecendo doenças urinárias. Após as 24h da administração da ciclofosfamida, encontramos diferenças na relação bexiga/peso corporal, sugerindo edema inflamatório e/ou hipertrofia. O comportamento miccional nos camundongos tratados com

ciclofosfamida foi caracterizado por aumento de pontos urinários e diminuição do volume de micção em comparação aos seus controles, mostrando que o tratamento com o neбиволол não preveniu os danos funcionais (como a cistite) causados pela administração de ciclofosfamida, talvez porque essas alterações não decorram apenas de ERO.

Um mecanismo que justificaria esse edema seria ativação de fatores de transcrição (por exemplo, NF- κ B e AP-1). NF- κ B e AP-1 ativados causam expressão gênica de citocinas (TNF- α , IL-1 β), indução de iNOS e novamente produção de ROS. A citocina produzida se espalha para outras células uroepiteliais, a corrente sanguínea e o músculo liso detrusor. ROS e NO formam peroxinitrito tanto no uroepitélio quanto no detrusor, levando à peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danos ao DNA. Danos no DNA causam ativação de PARP e crise de energia e, eventualmente, necrose celular.

Os testes funcionais foram realizados para avaliar a funcionalidade da bexiga utilizando o carbacol, KCl e estimulação do campo elétrico. A ciclofosfamida é um agente alquilante que age interferindo na replicação do DNA das células, incluindo as células musculares da bexiga. Essas alterações podem afetar a regeneração e o reparo das células musculares, contribuindo para mudanças na estrutura. Isso explicaria as mudanças estruturais na bexiga observadas nos dois grupos ciclofosfamida que o neбиволол não protegeu. O modelo de cistite provocada pela ciclofosfamida, o qual demonstrou modificações urodinâmicas hiperativas e reações mais intensificadas do detrusor tanto ao Estímulo de Campo Elétrico (EFS) quanto ao carbacol, que revelou ser uma representação consistente de uma bexiga hiperativa em outros estudos (WANG,2021). A Estimulação de Campo Elétrico e o carbacol demonstraram que apenas o grupo ciclofosfamida teve alteração na contração. Podemos supor que o neбиволол atua como um agonista parcial nos receptores beta-3 adrenérgicos presentes nas células musculares da bexiga. A ativação desses receptores leva à liberação de óxido nítrico (NO) e o subsequente relaxamento do músculo da bexiga, antagonizando o efeito do estímulo elétrico que normalmente causaria uma contração. Não houve diferença na contração entre os grupos administrados com KCl. O cloreto de potássio não age diretamente nos receptores muscarínicos ou em outros receptores de acetilcolina. Em vez disso, o ele atua aumentando a concentração de íons potássio no ambiente extracelular, o que despolariza as células musculares, levando à contração. As células musculares da bexiga podem ter diferentes sensibilidades aos estímulos químicos (como carbacol) e aos estímulos eletrofisiológicos (como KCl). Portanto, é possível que as células musculares da bexiga respondam de forma mais vigorosa ao estímulo químico específico proporcionado pelo

carbacol.

O traçado cistométrico é uma ferramenta importante em estudos científicos que investigam a função da bexiga e do trato urinário. Ele consiste em registrar graficamente as mudanças na pressão vesical e o volume de fluido na bexiga ao longo do tempo durante o processo de enchimento e esvaziamento. A partir dos nossos resultados podemos observar o aumento da contratilidade da bexiga no grupo ciclofosfamida em comparação com os demais grupos. Esse resultado casa com os outros que demonstram que o nebivolol conseguiu prevenir o desenvolvimento de sintomas da bexiga hiperativa ao normalizar o padrão miccional dos animais. Além de sua ação nos receptores beta-3 adrenérgicos, o Nebivolol pode ter efeitos moduladores na função neuromuscular, que podem ser benéficos para a bexiga hiperativa.

A perda de peso dos animais observada nos camundongos tratados com ciclofosfamida foi descrita em outros estudos (IQUBAL et al, 2020; BRISEÑO-BUGARÍN et al., 2021). Nossos resultados mostram que o nebivolol não preveniu a redução de massa corporal. A perda de peso pode ser atribuída à redução do consumo de água e ração desses grupos após o tratamento (ELANGO VAN et al, 2006; VERA, 2008). Em um estudo de revisão, altas doses ciclofosfamida possuem alto potencial emetogênico, podendo ocasionar perda de apetite, náuseas e vômitos, mesmo após um dia do tratamento (MITCHELL, 2006). Também foi descrito que após a administração da ciclofosfamida, são possíveis notar sinais comportamentais de dor e atividade de locomoção reduzida, que também justificam a baixa procura por água e alimento (BOUDES, 2011)

6. Conclusão

Concluimos que o nebivolol preveniu o aumento da produção de ERO e da lipoperoxidação induzidos pela ciclofosfamida na bexiga e em outros tecidos (timo e rim), que são alvos dos efeitos citotóxicos promovidos pela ciclofosfamida. E, apesar do β -bloqueador não ter prevenido o edema, ele ajudou a preservar a funcionalidade da bexiga indicando que essas respostas ocorrem por mecanismos independentes da produção de ERO. Isso nos mostra um potencial uso do nebivolol como agente citoprotetor ao ter ações benéficas antioxidantes tanto na bexiga como em outros tecidos que sofrem com as ações tóxicas da ciclofosfamida e seus metabólitos.

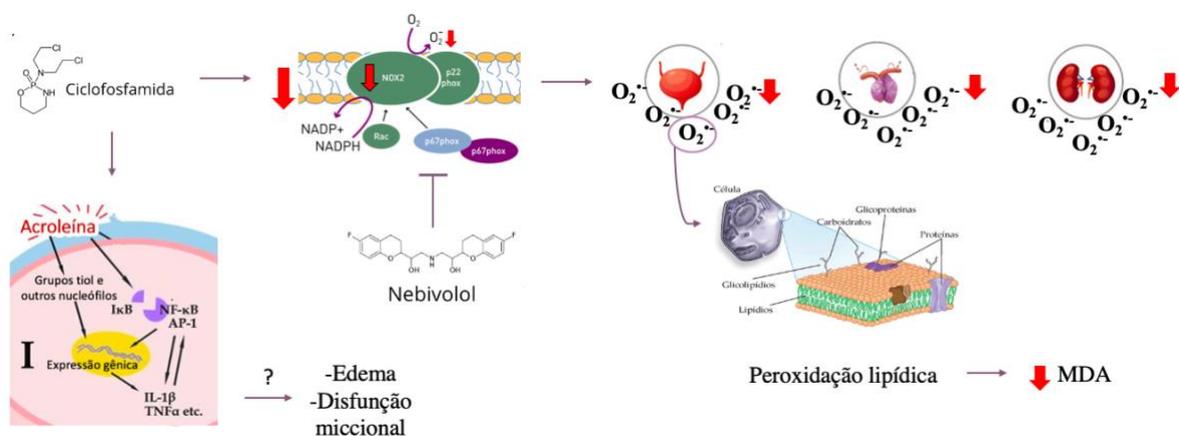


Figura 15 - Esquema da proposta de mecanismo do efeito protetor do nebivolol em relação ao estresse oxidativo causado pela ciclofosfamida.

O nebivolol teve efeito antioxidante ao reduzir a produção excessiva de ERO e aumentando atividade da SOD (Adaptado de Korkmaz et al, 2007).

7.Referência:

AKAMO AJ, Akinloye DI, Ugbaja RN, Adeleye OO, Dosumu OA, Eteng OE, Antiya MC, Amah G, Ajayi OA, Faseun SO. Naringin prevents cyclophosphamide-induced erythrocytotoxicity in rats by abrogating oxidative stress. *Toxicol Rep.* 2021 Oct 25;8:1803-1813. doi: 10.1016/j.toxrep.2021.10.011. PMID: 34760624; PMCID: PMC8567332.

ALEXANDRE EC, Calmasini FB, de Oliveira MG, Silva FH, da Silva CPV, André DM, Leonardo FC, Delbin MA, Antunes E. 2016. Chronic treatment with resveratrol improves overactive bladder in obese mice via antioxidant activity. *Eur. J. Pharmacol.* 788: 29-36.

ALLEN, T. M., &Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science* (New York, N.Y.), 303(5665), 1818–1822. <https://doi.org/10.1126/science.109583>

ALTUNKAYNAK-Camca, H. O., &Yazihan, N. (2020). The pretreatment of rats with nebivolol ameliorates bladder contractile dysfunction caused by ischemia-reperfusion injury. *LUTS: Lower Urinary Tract Symptoms.* doi:10.1111/luts.12338

ANDERSSON, K. E., Martin, N., & Nitti, V. (2013). Selective β_3 -adrenoceptor agonists for the treatment of overactive bladder. *The Journal of urology*, 190(4), 1173–1180. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.02.104>

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição [online]*. 2010, v. 23, n. 4 [Acessado 5 Agosto 2022] , pp. 629-643. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>>. Epub 10 Dez 2010. ISSN 1678-9865. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

BATISTA, C. K. L. P. Modelo de cistite hemorrágica induzida por injeção intravesical de acroleína: efeito uroprotetor de compostos tióis (mesna, glutatona e amifostina). 2002. 189 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

BATISTA, D. R. R., Mattos, M. de, & Silva, S. F. da. (2015). Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. *Revista De Enfermagem Da UFSM*, 5(3), 499–510. <https://doi.org/10.5902/2179769215709>

BLACKADAR CB. Historical review of the causes of cancer. *World J ClinOncol*. 2016;7(1):54–86. <https://doi.org/10.5306/wjco.v7.i1.54>

BORTOLOTTTO, Luiz Aparecido; CONSOLIM-COLOMBO, Fernanda M. Betabloqueadores adrenérgicos. *RevBrasHipertens*, v. 16, n. 4, p. 215-220, 2009.

BOUDES, Mathieu et al. Functional characterization of a chronic cyclophosphamide-induced overactive bladder model in mice. *Neurourologyandurodynamics*, v. 30, n. 8, p. 1659-1665, 2011.

BREHM BR, Wolf SC, Bertsch D, et al. Effects of nebivolol on proliferation and apoptosis of human coronary artery smooth muscle and endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2001 Feb 1; 49(2): 430–9

BUENO-PEREIRA, THAINA OMIA; NUNES, PRISCILA REZECK ; MATHEUS, MARIANA BERTOZZI ; VIEIRA DA ROCHA, ANANDA LINI ; SANDRIM, VALERIA CRISTINA . Nebivolol Increases Nitric Oxide Synthase via β_3 Adrenergic Receptor in Endothelial Cells Following Exposure to Plasma from Preeclamptic Patients. *Cells JCR*, v. 11, p. 883, 2022.

BURCHAM PC, Thompson CA, Henry PJ, Invited review: acrolein and the lung: chemical, molecular, and pathological aspects, *Advances in Molecular Toxicology* 4:1–36, 2010.

BURTON, G.J; JAUNIAUX E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 25, p. 287–299, 2011.

BURY MI, Fuller NJ, Meisner JW, et al. The promotion of functional urinary bladder

regeneration using anti-inflammatory nanofibers. *Biomaterials*. 2014;35(34):9311–9321. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.07.057

CADEDDU Dessalvi, C., Deidda, M., Mele, D., Bassareo, P. P., Esposito, R., Santoro, C., Lembo, M., Galderisi, M., & Mercuro, G. (2018). Chemotherapy-induced cardiotoxicity: new insights into mechanisms, monitoring, and prevention. *Journal of cardiovascular medicine (Hagerstown, Md.)*, 19(7), 315–323. <https://doi.org/10.2459/JCM.0000000000000667>

CERON, C.S., Rizzi, E., Guimaraes, D.A., Martins-Oliveira, A., Gerlach, R.F., Tanus-Santos, J.E., 2013. Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF-beta and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* 65, 47–56.

CHANG SJ, Chiang IN, Yu HJ. The effectiveness of tamsulosin in treating women with voiding difficulty. *Int J Urol*. 2008;15:981-5.

CHEN, L MENG, Q.; PENG, Z., Nuclear Factor- κ B modulates cellular glutathione and prevents oxidative stress in cancer cells. *Cancer Lett.*, v.299, p.45-53, 2010.

CHEN, Yen-Ta et al. Melatonin treatment further improves adipose-derived mesenchymal stem cell therapy for acute interstitial cystitis in rat. *Journal of pineal research*, v. 57, n. 3, p. 248-261, 2014

COCKCROFT J. Nebivolol: a review. *Expert OpinPharmacother* 2004 Apr; 5(4): 893–9

COX PJ. Cyclophosphamide cystitis--identification of acrolein as the causative agent. *BiochemPharmacol*. 1979 Jul 1;28(13):2045-9. doi: 10.1016/0006-2952(79)90222-3. PMID: 475846.

DIORI KARIDIO, I., & Sanlier, S. H. (2021). Reviewing cancer's biology: an eclectic approach. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 33(1), 32.

<https://doi.org/10.1186/s43046-021-00088-y>

DO VALE GT, Ceron CS, Gonzaga NA, Simplicio JA, Padovan JC. Three Generations of β -blockers: History, Class Differences and Clinical Applicability. *Curr Hypertens Rev.* 2019;15(1):22-31.

DO VALE GT, Gonzaga NA, Simplicio JA, Tirapelli CR. Nebivolol prevents ethanol-induced reactive oxygen species generation and lipoperoxidation in the rat kidney by regulating NADPH oxidase activation and expression. *Eur J Pharmacol.* 2017 Mar 15;799:33-40.

DO VALE, GT, Sousa, A. H., Gonzaga, N. A., De Oliveira, M. G., Justo, A. F. O., Alexandre, E. C., ... Tirapelli, C. R. (2019). Chronic ethanol consumption induces micturition dysfunction and alters the oxidative state of the urinary bladder. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* doi:10.1139/cjpp-2019-0143

DOLL, Donald C.; RINGENBERG, Q. Scott; YARBRO, J. W. Vascular toxicity associated with antineoplastic agents. *Journal of Clinical Oncology*, v. 4, n. 9, p. 1405-1417, 1986.

EL-NAGGAR SA, Alm-Eldeen AA, Germoush MO, El-Boray KF, Elgebaly HA. Ameliorative effect of propolis against cyclophosphamide-induced toxicity in mice. *Pharm Biol.* 53(2):235-41, 2015.

ERDAMAR, Husamettina; Sen, Nihatb; Tavail, Yusufb; Yazc, Huseyin Ugurbu; Turfan, Muratb; Poyraz, Fatihb; Topal, Salihb; Okuyan, Hzrbu; Cemri, Mustafab; Cengel, Atiyeb. The effect of nebivolol treatment on oxidative stress and antioxidant status in patients with cardiac syndrome-X. *Coronary Artery Disease* 20(3):p 238-244, May 2009. | DOI: 10.1097/MCA.0b013e32830936bb

EVERAERTS W, Zhen X, Ghosh D, Vriens J, Gevaert T, Gilbert JP, Hayward NJ, McNamara CR, Xue F, Moran MM, Strassmaier T, Uykal E, Owsianik G, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Fanger CM, Voets T. Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc Natl Acad Sci*

USA 107: 19084–19089, 2010. doi:10. 1073/pnas.1005333107. [SEP]

FILIP-CIUBOTARU, Florina et al. NADPH oxidase: structure and activation mechanisms (review). Note I. The Medical-Surgical Journal, v. 120, n. 1, p. 29-33, 2016.

GAO YS, Nagao T, Bond RA, et al. Nebivolol induces endothelium-dependent relaxations of canine coronary arteries. J CardiovascPharmacol 1991 Jun; 17(6): 964–9

GERMANAS, J.; PANDYA, A.G. Alkylating agents. Dermatologic Therapy, Copenhagen, v. 15, p. 317-324, 2002.

HALDAR S, Dru C, Bhowmick NA. Mechanisms of hemorrhagic cystitis. Am j ClinExp Urol. 2014;2(3):199–208

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. 3. ed. New York: Oxford University Press, 1999.

HANSEN TW, Staessen JA, Torp-Pedersen C, et al. Prognostic value of aortic pulse wave velocity as index of arterial stiffness in the general population. Circulation 2006 Feb 7; 113(5): 664–70

HENSLEY ML, Hagerty KL, Kewalramani T, Green DM, Meropol NJ, Wasserman TH, Cohen GI, Emami B, Gradishar WJ, Mitchell RB, Thigpen JT, Trotti A 3rd, von Hoff D, Schuchter LM. American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. J Clin Oncol. 27(1):127-45, 2009.

HUANG H.-S., Liu Z.-M., Chen P.-C., Tseng H.-Y., Yeh B.-W. TG-interacting factor-induced superoxide production from NADPH oxidase contributes to the migration/invasion of urothelial carcinoma. Free Radic. Biol. Med. 2012;53:769–778.

HUYAN X.-H., Y.-P. Lin, T. Gao, R.-Y. Chen, Y.-M. Fan, Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from

peripheral blood of Balb/c mice, *Int. Immunopharmacol.* 11:1293–1297, 2011.

IGNARRO LJ. Experimental evidences of nitric oxide-dependent vasodilatory activity of nebivolol, a third-generation β -blocker. *BloodPressSuppl* 2004 Oct; 13 Suppl. 1: 2–16

ILHAN A, Yilmaz HR, Armutcu F, Gurel A, Akyol O. The protective effect of nebivolol on ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2004 Nov;28(7):1153-60. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.06.023. PMID: 15610928.

INCA, Instituto Nacional do Câncer (org.). Estimativa 2020. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/introducao>. Acesso em: 01 ago. 2022.

IQUBAL, Ashif et al. Molecular mechanism involved in cyclophosphamide-induced cardiotoxicity: Old drug with a new vision. *Life Sciences*, v. 218, p. 112-131, 2019

JANSSENS WJ. Pharmacology of nebivolol. *J Pharm Belg* 1992 Jul–Aug; 47(4): 323–7

JOSEPHY, P.D. *Molecular Toxicology*. New York: Oxford University Press, 1997.

KORKMAZ, A; TOPAL, T; OTER, S. Pathophysiological aspects of cyclophosphamide and ifosfamide induced hemorrhagic cystitis; implication of reactive oxygen and nitrogen species as well as PARP activation. *Cell Biol. Toxicol.*, v. 23 (5), p. 303-312, 2007.

KORKMAZ, A.; REITER, R.J.; TOPAL, T. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol. Med.*, v.15(1-2), p.43-50, 2009

KUROEDOV A, Cosentino F, Lüscher TF. Pharmacological mechanisms of clinically favorable properties of a selective β 1-adrenoceptor antagonist, nebivolol. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22(3): 155–68

LINKS M, Lewis C. Chemoprotectants: a review of their clinical pharmacology and therapeutic efficacy. *Drugs* 57(3):293-308, 1999.

LIU Y, Yang A, Qu Y, Wang Z, Zhang Y, Liu Y, Wang N, Teng L, Wang D, Ameliorative effects of *Antrodia cinnamomea* polysaccharides against cyclophosphamide-induced immunosuppression related to Nrf2/HO-1 signaling in BALB/c mice. *Int J Biol Macromol.* 116:8–15, 2018.

MAFFEI, A., & Lembo, G. (2009). Nitric oxide mechanisms of nebivolol. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, 3(4), 317–327. <https://doi.org/10.1177/1753944709104496>

MANIKANDAN, R.; KUMAR, S.; DORAIRAJAN, L. N. Hemorrhagic cystitis: A challenge to the urologist. *Indian Journal of Urology*, v. 26, n. 2, p. 159-66, 2010.

MATZ EL, Hsieh MH. Review of Advances in Uroprotective Agents for Cyclophosphamide- and Ifosfamide-induced Hemorrhagic Cystitis. *Urology* 100:16-19, 2017.

MEINARDI, Martin Theodoor et al. Long-term chemotherapy-related cardiovascular morbidity. *Cancer treatment reviews*, v. 26, n. 6, p. 429-447, 2000.

MERWID-Ląd, A., Ziółkowski, P., Szandruk-Bender, M., Matuszewska, A., Szelağ, A., & Trocha, M. (2021). Effect of a Low Dose of Carvedilol on Cyclophosphamide-Induced Urinary Toxicity in Rats-A Comparison with Mesna. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 14(12), 1237.

Minas Gerais. Secretaria de Estado da Saúde (SES-MG). Deliberação CIB-SUS/MG N° 2.144 de 15 de Julho 2015 - Diagnóstico e Diretrizes para o Plano da Rede de Atenção em Oncologia. Governo do Estado de Minas Gerais; 2015.

MITCHELL EP. Gastrointestinal toxicity of chemotherapeutic agents. *Semin Oncol.* 2006;33(1):106-20. doi: <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2005.12.001>

MOEN, M.D., Wagstaff, A.J. Nebivolol. *Drugs* 66, 1389–1409 (2006). <https://doi.org/10.2165/00003495-200666100-00007>

MOGHE, A., Ghare, S., Lamoreau, B., Mohammad, M., Barve, S., McClain, C., & Joshi-Barve, S. (2015). Molecular mechanisms of acrolein toxicity: relevance to human disease. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 143(2), 242–255, 2015. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu233>

OELZE M. Daiber, R.P. Brandes, M. Hortmann, P. Wenzel, U. Hink, E. Schulz, H. Mollnau, A. von Sandersleben, A.L. Kleschyov, A. Mulsch, H. Li, U. Forstermann, T. Munzel- Nebivolol inhibits superoxide formation by NADPH oxidase and endothelial dysfunction in angiotensin II-treated rats hypertension, 48 (2006), pp. 677-684

OLAWI, N., Krüger, M., Grimm, D., Infanger, M., & Wehland, M. (2019). Nebivolol in the treatment of arterial hypertension. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 125(3), 189–201. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13248>

OLIVEIRA MG, Monica FZ, Passos GR, Victorio JA, Davel AP, Oliveira ALL, Parada CA, D'Ancona CAL, Hill WG, Antunes E. Selective Pharmacological Inhibition of NOX2 by GSK2795039 Improves Bladder Dysfunction in Cyclophosphamide-Induced Cystitis in Mice. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Dec 30;12(1):92. doi: 10.3390/antiox12010092. PMID: 36670953; PMCID: PMC9854480.

PARAVICINI, Tamara M.; TOUYZ, Rhian M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes care*, v. 31, n. Supplement_2, p. S170-S180, 2008.

RAKHMATULLAEVA, M. D., & Azimova, N. I. (2003). P-326: Effects of nebivolol on lipid peroxidation and lipid's spectrum in patients with arterial hypertension. *American Journal of Hypertension*, 16(S1), 154A.

REHMAN, M. U., Tahir, M., Ali, F., Qamar, W., Lateef, A., Khan, R., ... Sultana, S. (2012). Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: the protective effect of Ellagic acid. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 365(1-2), 119–127. doi:10.1007/s11010-012-1250-x

RENAME: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais RENAME 2022 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2022. Modo de acesso: WorldWide Web: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relacao_nacional_medicamentos_2022.pdf ISBN 978-65-5993-140-8

REYNOLDS RD, Simerville JJ, O'Hara DD, Hart JB, Parkinson JE. Hemorrhagic cystitis due to cyclophosphamide. *J Urol.* 1969 Jan;101(1):45-7. doi: 10.1016/s0022-5347(17)62268-7. PMID: 5812423.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T.; SYMONS, M.C.R. Techniques in free radical research. In: BURTON, R.H., KNIPPENBERG, P.H. (Org), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier: Amsterdam, 1991, p. 147–149.

RODIÑO-JANEIRO, Bruno K. et al. Current status of NADPH oxidase research in cardiovascular pharmacology. *Vascular Health and Risk Management*, v. 9, p. 401, 2013.

ROVER, J.R.L; HOEHR, N.F; VELLASCO, A.P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado à métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, v. 24, p. 112-119, 2001.

SAEIDNIA, S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 273, p. 442–455, 2013.

SALAZAR G. (2018). NADPH Oxidases and Mitochondria in Vascular Senescence. *International journal of molecular sciences*, 19(5), 1327. <https://doi.org/10.3390/ijms19051327>

SALCI MA, Sales CA, Marcon SS. Sentimentos de mulheres ao receber o diagnóstico de câncer. *Rev Enferm UERJ* [Internet]. 2009 [acesso em 2022 ago 8];17(1):46-51. Disponível em: <http://www.revenf.bvs.br/pdf/reuerj/v17n1/v17n1a09.pdf>.

SANTOS, Viviane Martins Rebello dos et al. Compostos organofosforadospentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. *Química Nova* [online]. 2007, v. 30, n. 1 [Acessado 15 Agosto 2022] , pp. 159-170. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100028>>. Epub 23 Fev 2007. ISSN 1678-7064. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100028>.

SCHUCHTER LM, Hensley ML, Meropol NJ, et al. 2002 update of recommendations for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2002; 20:2895.

ŞEKEROĞLU, V.; AYDIN, B.; ŞEKEROĞLU, Z.A. Viscum album L. Extract and Quercetin Reduce Cyclophosphamide-Induced Cardiotoxicity, Urotoxicity and Genotoxicity in Mice. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, v. 12 (11), p. 2925-2931, 2011.

SELVAKUMAR E, Prahalathan C, Mythili Y, Varalakshmi P (2005) Mitigation of oxidative stress in cyclophosphamide-challenged hepatic tissue by DL-alpha-lipoic acid. *Mol Cell Biochem* 272:179–185

SERG M, Kampus P, Kals J, Zagura M, Zilmer M, Zilmer K, Kullisaar T, Eha J. Nebivolol and metoprolol: long-term effects on inflammation and oxidative stress in essential hypertension. *Scand J Clin Lab Invest.* 2012 Sep;72(5):427-32. doi: 10.3109/00365513.2012.691991. Epub 2012 Jun 18. PMID: 22708640.

SHIMADA K, Fujii T, Tsujikawa K, Anai S, Fujimoto K, Konishi N. 2012. ALKBH3 Contributes to Survival and Angiogenesis of Human Urothelial Carcinoma Cells through NADPH Oxidase and Tweak/Fn14/VEGF Signals. *Clin. Cancer Res.* 18(19): 5247-5255.

SHIMADA K., Fujii T., Anai S., Fujimoto K., Konishi N. ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. *BMC Urol.* 2011;11:22.

SILVA PB, Lopes M, Trindade LCT, Yamanouchi CN. Controle dos sintomas e intervenção nutricional. Fatores que interferem na qualidade de vida de pacientes oncológicos em cuidados paliativos. Rev Dor São Paulo [Internet]. 2010 [acesso em 2022 set 10];11(4):282-8. Disponível em: http://unimagemwebcast.com.br/webcast/revistador/Dor/2010/volume_11/n%C3%BAmero_4/pdf/volume_11_n_4_pags_282_a_288.pdf.

SOARES, Elisângela Maria e Silva, Sueli Riulda Perfil de pacientes com câncer ginecológico em tratamento quimioterápico. Revista Brasileira de Enfermagem [online]. 2010, v. 63, n. 4 [Acessado 5 Agosto 2022] , pp. 517-522. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-71672010000400003>>. Epub 03 Set 2010. ISSN 1984-0446. <https://doi.org/10.1590/S0034-71672010000400003>.

SORRENTINO SA, Doerries C, Manes C, Speer T, Dessy C, Lobysheva I, Mohmand W, Akbar R, Bahlmann F, Besler C, Schaefer A, Hilfiker-Kleiner D, Lüscher TF, Balligand JL, Drexler H, Landmesser U. Nebivolol exerts beneficial effects on endothelial function, early endothelial progenitor cells, myocardial neovascularization, and left ventricular dysfunction early after myocardial infarction beyond conventional beta1-blockade. J Am Coll Cardiol. 57(5):601-11, 2011.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; KONDOH, H. Oxidativestress andcancer: Anoverreview. Ageing Research Reviews, v 12, p 376-390, 2013.

SOUZA, Cármino A. et al. Terapêutica citoprotetora em pacientes tratados com quimio e/ou radioterapia anti neoplásica. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, v. 22, p. 123-128, 2000.

SUNG PH, Chiang HJ, Chen CH, Chen YL, Huang TH, Zhen YY, Chang MW, Liu CF, Chung 606 SY, Chen YL, Chai HT, Sun CK, Yip HK. 2016. CombinedTherapyWith Adipose-Derived 607 MesenchymalStemCellsandCiprofloxacinAgainstAcute Urogenital OrganDamage in Rat 608 SepsisSyndromeInducedbyIntrapelvicInjectionofCecalBacteria. StemCellsTransl. 609 Med. 5(6): 782-792

TIMBRELL, J. Principles of Biochemical Toxicology, 3. ed., London: Taylor & Francis, 2000.

TOPAL, Turgut et al. Melatonin ameliorates bladder damage induced by cyclophosphamide in rats. *Journal of pineal research*, v. 38, n. 4, p. 272-277, 2005.

TOPRAK O, Cirit M, Tanrisev M, Yazici C, Canoz O, Sipahioglu M, Uzun A, Ersoy R, Sozmen EY. Prevention effect of nebivolol on contrast-induced nephropathy in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 23:853-859, 2008.

TOUSOULIS, Dimitris et al. Endothelial dysfunction in conduit arteries and in microcirculation. Novel therapeutic approaches. *Pharmacology & therapeutics*, v. 144, n. 3, p. 253-267, 2014.

TOUYZ, Rhian M.; BRIONES, Ana M. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension research*, v. 34, n. 1, p. 5-14, 2011.

TRIPATHI, D. N.; JENA, G. B. Effect of melatonin on the expression of Nrf2 and NF- κ B during cyclophosphamide-induced urinary bladder injury in rat. *Journal of pineal research*, v. 48, n. 4, p. 324-331, 2010.

Vanhoutte, P. M., & Gao, Y. (2013). Beta blockers, nitric oxide, and cardiovascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(2), 265–273. doi:10.1016/j.coph.2012.12.002 10

VERA PL, Iczkowski KA, Wang X, Meyer-Siegler KL. Cyclophosphamide-induced cystitis increases bladder CXCR4 expression and CXCR4-macrophage migration inhibitory factor association. *PLoS One*. 2008;3(12):e3898. doi: 10.1371/journal.pone.0003898. Epub 2008 Dec 10. PMID: 19066630; PMCID: PMC2588654.

VERBEKE, H, M STRUYF, S., LAUREYS, G., VAN, D. J. The expression and prognostic impact of CXC-chemokines in stage II and III colorectal cancer epithelial and stromal tissue. *British Journal of Cancer*. 2011 Feb;104(3):480-487. DOI: 10.1038/sj.bjc.6606055. PMID:

21285972; PMCID: PMC3049559.

VERMOT A., Petit-Härtlein I., Smith S., Fieschi F. NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology. *Antioxidants*. 2021;10:890.

VERMOT, Annelise et al. NADPH oxidases (NOX): An overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology. *Antioxidants*, v. 10, n. 6, p. 890, 2021.

VIEIRA, Débora Braga and Gamarra, Lionel Fernel Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. *Einstein (São Paulo)* [online]. 2016, v. 14, n. 1 [Accessed 1 August 2022] , pp. 99-103. Available from: <<https://doi.org/10.1590/S1679-45082016RB3475>>. ISSN 2317-6385. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082016RB3475>.

WANG HC, Choudhary S. Reactive oxygen species-mediated therapeutic control of bladder cancer. *Nat Rev Urol*. 2011 Oct 4;8(11):608-16. doi: 10.1038/nrurol.2011.135. PMID: 21971316.

Wang R, Hong M, Huang J, Zhou N, Zhang Y, Xu S, Liu J, Yuan J, Zhang L, Huang L, Huang P, Tan B, Cao HY. Low-Dose Cyclophosphamide Induces Nerve Injury and Functional Overactivity in the Urinary Bladder of Rats. *Front Neurosci*. 2021 Oct 1;15:715492. doi: 10.3389/fnins.2021.715492. PMID: 34658764; PMCID: PMC8517437.

WEI, Xiaojie et al. Stereospecific antioxidant effects of ginsenoside Rg3 on oxidative stress induced by cyclophosphamide in mice. *Fitoterapia*, v. 83, n. 4, p. 636-642, 2012.

WRÓBEL, A., Miziak, B., Bańcerowska-Górska, M., Szopa, A., Serefko, A., Stangel-Wójcikiewicz, K., Czuczwar, P., Laskowska, M., Wlaźlak, E., Dudka, J., & Poleszak, E. (2019). The influence of nebivolol on the activity of BRL 37344 - the β_3 -adrenergic receptor agonist, in the animal model of detrusor overactivity. *Neurourology and urodynamics*, 38(5), 1229–1240. <https://doi.org/10.1002/nau.23993>

YAMAGUCHI O, Chapple CR. 2007. Beta3-adrenoceptors in urinary bladder. *Neurourol Urodyn*. 638 26(6): 752-756.

YAMAGUCHI O, Nomiya M, Andersson KE. 2014. Functional consequences of chronic bladder ischemia. *Neurourol. Urodyn*. 33: 54-58.

YILDIRIM, Ibrahim et al. Contribution of antioxidants to preventive effect of mesna in cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 54, n. 5, p. 469-473, 2004.

ZANCHETTI A. Clinical pharmacodynamics of nebivolol: new evidence of nitric oxide-mediated vasodilating activity and peculiar haemodynamic properties in hypertensive patients. *Blood Press Suppl* 2004 Oct; 13 Suppl. 1: 17–32

ZHANG Y, Murugesan P, Huang K, Cai H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol*. 2020 Mar;17(3):170-194. doi: 10.1038/s41569-019-0260-8. Epub 2019 Oct 7. PMID: 31591535; PMCID: PMC7880919

ANEXO



Centro Colaborador da OPAS/OMS para o
Desenvolvimento da Pesquisa em Enfermagem



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

Avenida Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto - São Paulo - Brasil - CEP 14040-902
Fone: 55 16 3315.3382 - 55 16 3315.3381 - Fax: 55 16 3315.0518
www.eerp.usp.br - eerp@usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - ceua@eerp.usp.br

AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a alteração na proposta intitulada "Avaliação da ação citoprotetora do neбиволол nos danos renais causados pela ciclofosfamida", registrada sob nº 20.1.304.22.2, sob a responsabilidade de Carlos Renato Tirapelli e Thales de Mileto Henrique Dourado, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA-EERP/USP), *ad referendum* em 08/08/2022.

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Destacamos que a alteração consistiu na inclusão da pesquisadora Carolina de Paula Souza Jesus, mudança do título do projeto para "Avaliação da ação citoprotetora do neбиволол nos danos renais e vesicais causados pela ciclofosfamida" e não implicou em aumento no número de animais originalmente aprovado.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	08/08/2022 a 30/08/2023
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo isogênico C57BL/6
Nº de animais	128
Peso/Idade	20-25 gramas / 6-8 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 08 de agosto de 2022.

Prof. Dr. Angelita Maria Stabile
Vice-Presidente da CEUA-EERP/USP