

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

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

Maria Augusta Carvalho Rodrigues

Ribeirão Preto

2013

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

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

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

Área de Concentração: Toxicologia.

**Orientada:** Maria Augusta Carvalho Rodrigues

**Orientador:** Prof. Dr. Antonio Cardozo dos Santos

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glenda Gobe

Ribeirão Preto

2013

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESUMO

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

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

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



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs. – absorbância

Apaf-1 – fator protease ativador da apoptose - 1

BHT – hidroxil tolueno butilado

BSA – albumina bovina sérica

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Cisp – cisplatina

CV – carvedilol

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DMSO – dimetilsulfóxido

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

DMTU – dimetiltiouréia

DNA – ácido desoxiribonucléico

DPPH – diphenyl-picrylhydrazyl

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

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

RPE – ressonância paramagnética eletrônica

FDA – American Food and Drug Administration

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GSH – glutationa reduzida

GSSG – glutationa oxidada

HE – Hematoxilina e eosina

HK-2 – human kidney-2

HRP – Horseradish Peroxidase

ICP-MS – espectrometria de massa acoplada a plasma

IDN – Índice de Divisão Nuclear

i.p. – intraperitoneal

MDA – malondialdeído

MN – micronúcleo

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (estado reduzido)

NCE – eritrócitos normocromáticos

nm – nanômetro

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

PBS – salina tamponada com fostato  
PBS/T – PBS acrescentado de Tween 20 0,05%  
PCE – eritrócitos policromáticos  
pH – potencial hidrogênioônico  
PKC $\delta$  – proteína quinase C gama  
Ppc – Positive Pixel Count  
RNA – ácido ribonucleico  
S-180 – Sarcoma 180  
SDS/PAGE – dodecil sulfato de sódio em gel de poliacrilamida para eletroforese  
SFB - Soro Fetal Bovino  
TBA – ácido tiobarbitúrico  
TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico  
TCA – ácido tricloroacético  
TdT – terminal deoxynucleotidyl transferase  
TEMPOL – 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl  
TMAH – hidróxido de tetrametilamônio  
TMOP – 1,1,3,3-tetrametoxipropano  
TUNEL – Terminal deoxytidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling  
v.o. – via oral



## **INTRODUÇÃO**

### **Importância Clínica da Cisplatina**

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

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

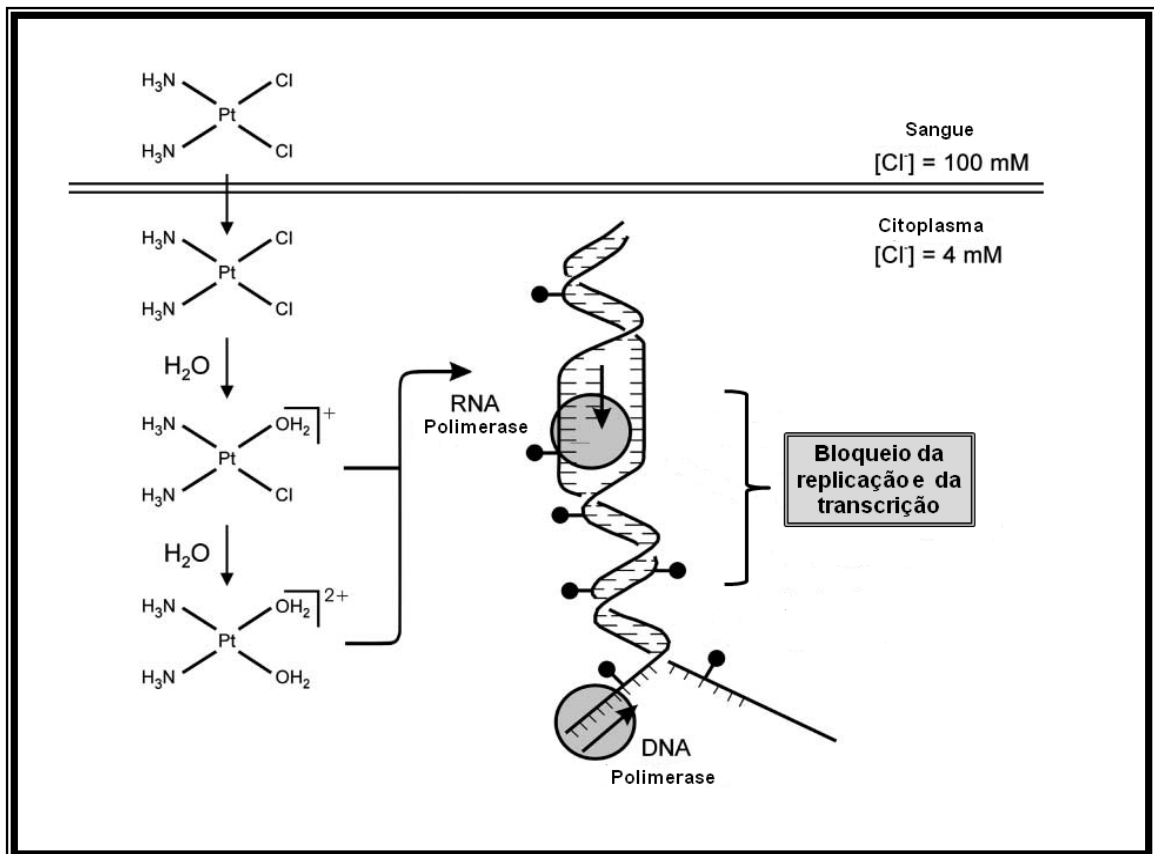
### **Farmacocinética e Farmacodinâmica da cisplatina**

Estudos iniciais indicavam que a cisplatina entraria nas células principalmente por difusão, porém estudos posteriores sugeriram a participação de sistemas de transporte ativo tais como: transportador de cobre Ctr1 (ISHIDA et al., 2002) e transportador de cátion orgânico OCT2 (“*organic cation transporter-2*”) (CIARIMBOLI et al., 2010; CIARIMBOLI et al., 2005; KRONING;LICHTENSTEIN;NAGAMI, 2000).

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

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

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



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

### Toxicidade renal induzida pela cisplatina

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

Dentre as toxicidades induzidas pela cisplatina, a nefrotoxicidade é considerada um dos efeitos adversos mais graves e constitui a maior causa de morbidade e mortalidade decorrentes de seu uso (CVITKOVIC, 1998;

KINTZEL, 2001; LEE, R. H. et al., 2001). Estima-se que 25 a 35% dos pacientes tratados com cisplatina apresentam um severo declínio na função renal após uma única dose do fármaco (HAN;YUE;CHESNEY, 2009; YAO et al., 2007).

O rim não é somente o principal responsável pela excreção da cisplatina, mas é também o principal sítio de acúmulo do fármaco (SCHENELLMANN, 2001). Estima-se que a concentração de cisplatina em células do epitélio tubular proximal renal seja aproximadamente cinco vezes maior do que sua concentração sérica (KUHLMANN;BURKHARDT;KOHLE, 1997). O dano renal induzido pela cisplatina ocorre inicialmente nos túbulos proximais, especialmente em células epiteliais tubulares dos segmentos S-2 e S-3. Os glomérulos e túbulos distais são afetados posteriormente (WERNER et al., 1995).

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

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

### **O papel dos antioxidantes**

Antioxidantes têm sido propostos como adjuvantes na quimioterapia com cisplatina a fim de minimizar os efeitos tóxicos, permitir o escalonamento de doses e, por conseguinte, a obtenção do máximo efeito terapêutico. Adicionalmente, a resistência de certos tipos de tumores que não respondem à

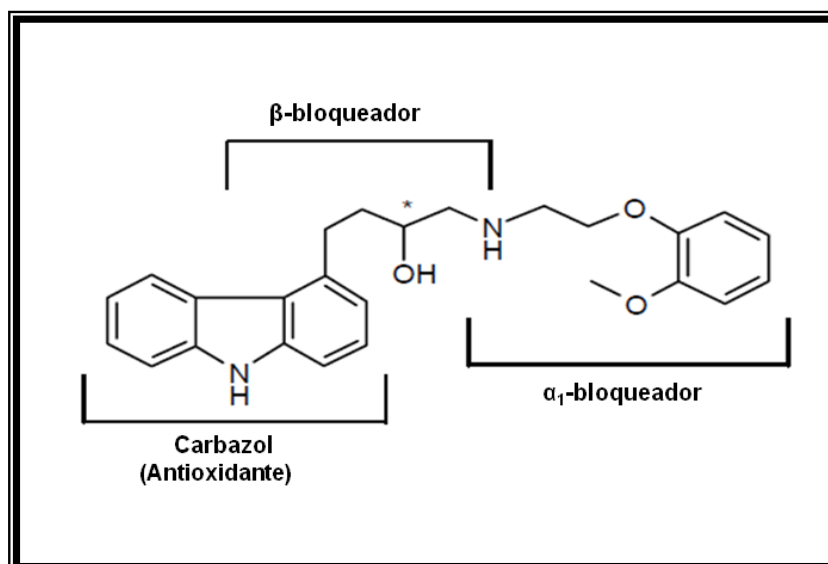
terapia com cisplatina, tais como câncer de ovário, cólon e bexiga poderia ser suplantada se doses maiores do quimioterápico pudessem ser utilizadas de forma segura. Idealmente, esses antioxidantes deveriam ser capazes de agir seletivamente sobre os tecidos saudáveis, sem interferir no efeito terapêutico do quimioterápico e não causar, por si só, efeitos adversos severos (PABLA et al., 2011; WANG, D.;LIPPARD, 2005).

Um grande número de antioxidantes tem se mostrado promissores quanto à nefroproteção, como vitamina C (TARLADACALISIR;KANTER;UYGUN, 2008), vitamina E (AJITH et al., 2009), resveratrol (DO AMARAL et al., 2008), quercetina (FRANCESCATO et al., 2004), DMTU (SANTOS, N. A. et al., 2008) N-acetilcisteína (DICKY et al., 2005), alopurinol, ebselem (LYNCH et al., 2005), edaravone (SATOH et al., 2003), naringenina (BADARY et al., 2005), licopeno (ATESSAHIN et al., 2005), CAPE (OZEN et al., 2004), entre outros; porém não há dados suficientes acerca do seu efeito sobre a atividade antitumoral da cisplatina (PABLA;DONG, 2008). Estudos em animais portadores de tumores e a identificação de novos agentes nefroprotetores que não diminuam a eficácia antitumoral da cisplatina são escassos e essenciais para o desenvolvimento de estratégias de citoproteção clinicamente factíveis.

### **Carvedilol**

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





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

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

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

A eficácia do carvedilol contra danos causados pelo estresse oxidativo foi demonstrada em diferentes processos de citotoxicidade: doença cardiovascular (DANDONA;GHANIM;BROOKS, 2007); miocardite

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

### **Modelos tumorais em camundongos (Sarcoma 180)**

O sarcoma 180 foi descoberto em 1914, na região axilar de um camundongo albino, por Woglom, da Universidade de Columbia é utilizado para estudos desde 1919, sem alteração em suas características morfológicas. As células do sarcoma 180 crescem muito rapidamente; com 7 dias de implantação subcutânea, o tumor alcança aproximadamente 15 x 11 x 8 mm (SUGIURA;STOCK, 1952).

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

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

## **Medidas de citoproteção empregadas atualmente**

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

Além de procedimentos de hidratação e diurese, o único agente citoprotetor aprovado para uso em pacientes submetidos à quimioterapia com cisplatina é a amifostina (Ethiol®) (ASNA et al., 2005; GRADISHAR et al., 2001; KEMP et al., 1996; PLANTING et al., 1999; SASTRY;KELLIE, 2005; SCHILLER et al., 1996). No entanto, a amifostina também apresenta efeitos adversos, como reações cutâneas, náusea, hipotensão e hipocalcemia (BLOCK;GYLLENHAAL, 2005); adicionalmente alguns estudos colocam em dúvida a eficácia da amifostina. Há relatos de casos que indicam que o uso de amifostina não protegeu contra a ototoxicidade, nefrotoxicidade e lesão na medula óssea em crianças durante o tratamento de hepatoblastoma (KATZENSTEIN et al., 2009); além disso, há um relato de severa neurotoxicidade, ototoxicidade e nefrotoxicidade em uma paciente com carcinoma epitelial de ovário tratada com amifostina e altas doses de cisplatina (SASTRY;KELLIE, 2005).

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

## CONCLUSÕES

De acordo com o presente estudo:

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

## REFERÊNCIAS

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

- BAEK, S. M., et al. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. **J Lab Clin Med**, v. 142, n. 3, p. 178-186, 2003
- BALIGA, R., et al. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Kidney Int**, v. 53, n. 2, p. 394-401, 1998
- BATISTA, B. L., et al. Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. **Anal Chim Acta**, v. 646, n. 1-2, p. 23-29, 2009
- BEYAERT, R. ;FIERS, W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. **FEBS Lett**, v. 340, n. 1-2, p. 9-16, 1994
- BLOCK, K. I. ;GYLLENHAAL, C. Commentary: the pharmacological antioxidant amifostine -- implications of recent research for integrative cancer care. **Integr Cancer Ther**, v. 4, n. 4, p. 329-351, 2005
- BOISDRON-CELLE, M., et al. [Pharmacokinetic properties of platinum derivatives]. **Bull Cancer**, v. 88 Spec No, n., p. S14-19, 2001
- BOLLETER, W. T., et al. Spectrophotometric Determination of Ammonia as Indophenol. **Analytical Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 592-&, 1961
- BORCH, R. F. ;MARKMAN, M. Biochemical modulation of cisplatin toxicity. **Pharmacol Ther**, v. 41, n. 1-2, p. 371-380, 1989
- BOULIKAS, T. ;VOUGIOUKA, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). **Oncol Rep**, v. 10, n. 6, p. 1663-1682, 2003
- BRATTON, S. B. ;SALVESEN, G. S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 19, p. 3209-3214, 2010
- BRILLET, G., et al. Long-term renal effect of cisplatin in man. **Am J Nephrol**, v. 14, n. 2, p. 81-84, 1994
- BRYSON, G. J., et al. A flow cytometric study of cell death: failure of some models to correlate with morphological assessment. **Immunol Cell Biol**, v. 72, n. 1, p. 35-41, 1994.

- BURMAN, A. C., et al. Anti-cancer activity of carvedilol and its isomers. <http://www.freepatentsonline.com/6632832.html>. D. R. Foundation. United States 6632832 p. 2003
- CAIN, K. ;SKILLETER, D. N. (1987). Preparation and use of mitochondria in toxicological research. **Biochemical toxicology. A practical approach**. K. Snell and B. Mollock. Oxford, IRL Press. 1: 217-254.
- CAMPBELL, N. P. ;KINDLER, H. L. Update on malignant pleural mesothelioma. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 32, n. 1, p. 102-110, 2011
- CARVALHO RODRIGUES, M. A., et al. Carvedilol protects against apoptotic cell death induced by Cisplatin in renal tubular epithelial cells. **J Toxicol Environ Health A**, v. 75, n. 16-17, p. 981-990, 2012
- CIARIMBOLI, G., et al. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. **Am J Pathol**, v. 176, n. 3, p. 1169-1180, 2010
- CIARIMBOLI, G., et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. **Am J Pathol**, v. 167, n. 6, p. 1477-1484, 2005
- COHEN, S. M. ;LIPPARD, S. J. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol**, v. 67, n., p. 93-130, 2001
- CULLEN, K. J., et al. Mitochondria as a critical target of the chemotherapeutic agent cisplatin in head and neck cancer. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 1, p. 43-50, 2007
- CVITKOVIC, E. Cumulative toxicities from cisplatin therapy and current cytoprotective measures. **Cancer Treat Rev**, v. 24, n. 4, p. 265-281, 1998
- DANDONA, P., et al. Antioxidant activity of carvedilol in cardiovascular disease. **J Hypertens**, v. 25, n. 4, p. 731-741, 2007
- DAVIDSON, K., et al. Comparative analysis of caspase activation and apoptosis in renal tubular epithelial cells and renal cell carcinomas. **Nephron Exp Nephrol**, v. 99, n. 4, p. e112-120, 2005

- DEL RIO, D., et al. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005
- DICKEY, D. T., et al. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular, and in vivo levels. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 314, n. 3, p. 1052-1058, 2005
- DILLIOGLUGIL, M. O., et al. Protective effects of increasing vitamin E and a doses on cisplatin-induced oxidative damage to kidney tissue in rats. **Urol Int**, v. 75, n. 4, p. 340-344, 2005
- DO AMARAL, C. L., et al. Resveratrol attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 6, p. 363-370, 2008
- DOBYAN, D. C., et al. Mechanism of cis-platinum nephrotoxicity: II. Morphologic observations. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 213, n. 3, p. 551-556, 1980
- DOS SANTOS, N. A., et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. **Arch Toxicol**, v., n., p., 2012
- EASTMAN, A. (1999). The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis. **Cisplatin: chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug**. B. Lippert. New York, Wiley-VCH: 111-135.
- EL-BESHBISHY, H. A., et al. Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. **Eur J Pharmacol**, v. 668, n. 1-2, p. 278-284, 2011
- ESTERBAUER, H., et al. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radic Biol Med**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991
- FARISS, M. W., et al. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. **Mol Interv**, v. 5, n. 2, p. 94-111, 2005
- FIELD, J. B. Tests of compounds against sarcoma 180 in a screening project in mice. **Cancer Res**, v. Suppl. 2, n., p. 3-52, 1955



- FIRST, M. R. (1996). Renal function. **Clinical chemistry. Theory, analysis and correlation.** L. A. Kaplan and A. J. Pesce. St Louis, Mosby: 346-358.
- FOUAD, A. A., et al. Coenzyme Q10 treatment ameliorates acute cisplatin nephrotoxicity in mice. **Toxicology**, v. 274, n. 1-3, p. 49-56, 2010
- FRANCESCATO, H. D., et al. Protective effect of quercetin on the evolution of cisplatin-induced acute tubular necrosis. **Kidney Blood Press Res**, v. 27, n. 3, p. 148-158, 2004
- GERAN, R. I., et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. **Cancer Chemoter Rep**, v. 3, n. 2, p. 1-66, 1972
- GOBE, G. Identification of apoptosis in kidney tissue sections. **Methods Mol Biol**, v. 466, n., p. 175-192, 2009
- GONZAGA, M. L., et al. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by an alpha-(1-->4)-glucan-beta-(1-->6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from Agaricus blazei Murill. **Nat Med (Tokyo)**, v. 63, n. 1, p. 32-40, 2009
- GONZALEZ, V. M., et al. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? **Mol Pharmacol**, v. 59, n. 4, p. 657-663, 2001
- GORNALL, G. A., et al. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. Biol. Chem.**, v. 177, n., p. 751 - 766, 1949
- GRADISHAR, W. J., et al. A Phase II trial of cisplatin plus WR-2721 (amifostine) for metastatic breast carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E8188). **Cancer**, v. 92, n. 10, p. 2517-2522, 2001
- HAIGIS, M. C. ;SINCLAIR, D. A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. **Annu Rev Pathol**, v. 5, n., p. 253-295, 2010
- HALABE, A., et al. Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. **Nephron**, v. 57, n. 2, p. 197-200, 1991
- HAN, X., et al. Functional TauT protects against acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 6, p. 1323-1332, 2009

- HANIGAN, M. H. ;DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther**, v. 1, n., p. 47-61, 2003
- HARTMANN, A. E. (1994). Nitrogen metabolites and renal function. **Clinical laboratory medicine**. K. D. MacClatchey. Baltimore, Williams & Wilkins: 371-385.
- HASSAN, F., et al. Carvedilol Enhances Mesenchymal Stem Cell Therapy for Myocardial Infarction via Inhibition of Caspase-3 Expression. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 343, n. 1, p. 62-71, 2012
- HAYASHI, M., et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutat Res**, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990
- HAYASHI, T., et al. Carvedilol protects tubular epithelial cells from ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidative stress. **Int J Urol**, v. 17, n. 12, p. 989-995, 2010
- HE, W., et al. Sirt1 activation protects the mouse renal medulla from oxidative injury. **J Clin Invest**, v. 120, n. 4, p. 1056-1068, 2010
- HISSIN, P. J. ;HILF, R. A fluorimetric method for determination o oxidized and reduced glutathione in tissues. **Anal. Biochem.**, v. 74, n., p. 214-226, 1976
- INOUE, K., et al. Anti-tumor effects of water-soluble propolis on a mouse sarcoma cell line in vivo and in vitro. **Am J Chin Med**, v. 36, n. 3, p. 625-634, 2008
- ISHIDA, S., et al. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 22, p. 14298-14302, 2002
- JIANG, M., et al. Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. **Oncogene**, v. 25, n. 29, p. 4056-4066, 2006
- KADIKOYLU, G., et al. The effects of desferrioxamine on cisplatin-induced lipid peroxidation and the activities of antioxidant enzymes in rat kidneys. **Hum Exp Toxicol**, v. 23, n. 1, p. 29-34, 2004

- KANG, K. P., et al. Luteolin ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by regulation of p53-dependent renal tubular apoptosis. **Nephrol Dial Transplant**, v. 26, n. 3, p. 814-822, 2011
- KARTALOU, M. ;ESSIGMANN, J. M. Mechanisms of resistance to cisplatin. **Mutat Res**, v. 478, n. 1-2, p. 23-43, 2001
- KATZENSTEIN, H. M., et al. Amifostine does not prevent platinum-induced hearing loss associated with the treatment of children with hepatoblastoma: a report of the Intergroup Hepatoblastoma Study P9645 as a part of the Children's Oncology Group. **Cancer**, v. 115, n. 24, p. 5828-5835, 2009
- KAUSHAL, G. P., et al. Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. **Kidney Int**, v. 60, n. 5, p. 1726-1736, 2001
- KEMP, G., et al. Amifostine pretreatment for protection against cyclophosphamide-induced and cisplatin-induced toxicities: results of a randomized control trial in patients with advanced ovarian cancer. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 7, p. 2101-2112, 1996
- KHAN, R., et al. Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 258, n. 3, p. 315-329, 2012
- KIM, D. H., et al. SIRT1 activation by resveratrol ameliorates cisplatin-induced renal injury through deacetylation of p53. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 301, n. 2, p. F427-435, 2011
- KIM, H. J., et al. Roles of NADPH oxidases in cisplatin-induced reactive oxygen species generation and ototoxicity. **J Neurosci**, v. 30, n. 11, p. 3933-3946, 2010
- KIM, S. H., et al. Xanthorrhizol has a potential to attenuate the high dose cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 43, n. 1, p. 117-122, 2005
- KINTZEL, P. E. Anticancer drug-induced kidney disorders. **Drug Saf**, v. 24, n. 1, p. 19-38, 2001

- KLEIN, R., et al. Phenoxodiol protects against Cisplatin induced neurite toxicity in a PC-12 cell model. **BMC Neurosci**, v. 8, n., p. 61, 2007
- KORKMAZ, A. ;KOLANKAYA, D. The protective effects of ascorbic acid against renal ischemia-reperfusion injury in male rats. **Ren Fail**, v. 31, n. 1, p. 36-43, 2009
- KOWALTOWSKI, A. J., et al. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca<sup>2+</sup> ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **J Biol Chem**, v. 271, n. 6, p. 2929-2934, 1996
- KRONING, R., et al. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 45, n. 1, p. 43-49, 2000
- KUHLMANN, M. K., et al. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. **Nephrol Dial Transplant**, v. 12, n. 12, p. 2478-2480, 1997
- LAGOUGE, M., et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109-1122, 2006
- LEE, R. H., et al. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 8, p. 1013-1023, 2001
- LEE, Y. M., et al. Alpha-lipoic acid attenuates cisplatin-induced tubulointerstitial injuries through inhibition of mitochondrial bax translocation in rats. **Nephron Exp Nephrol**, v. 113, n. 4, p. e104-112, 2009
- LI, D., et al. Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination. **Cancer Sci**, v. 95, n. 8, p. 644-650, 2004
- LIEBERTHAL, W., et al. Graded ATP depletion can cause necrosis or apoptosis of cultured mouse proximal tubular cells. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. F315-327, 1998
- LIEBERTHAL, W., et al. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. **Am J Physiol**, v. 270, n. 4 Pt 2, p. F700-708, 1996

- LIPPARD, S. J. Chemistry and molecular biology of cisplatin anticancer drugs. **Pure Appl. Chem.**, v. 59, n., p. 731-742, 1987
- LYNCH, E. D., et al. Reduction of acute cisplatin ototoxicity and nephrotoxicity in rats by oral administration of allopurinol and ebselen. **Hear Res**, v. 201, n. 1-2, p. 81-89, 2005
- MEMOS, N., et al. Administration of Human Protein-C concentrate prevents apoptotic brain cell death after experimental sepsis. **Brain Res**, v., n., p., 2009
- MICHAN, S. ;SINCLAIR, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochem J**, v. 404, n. 1, p. 1-13, 2007
- MOCHIZUKI, M., et al. Scavenging free radicals by low-dose carvedilol prevents redox-dependent Ca<sup>2+</sup> leak via stabilization of ryanodine receptor in heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 49, n. 16, p. 1722-1732, 2007
- MORAIS, C., et al. Pyrrolidine dithiocarbamate exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects in renal cell carcinoma cell lines. **Nephrol Dial Transplant**, v. 21, n. 12, p. 3377-3388, 2006
- MUKHOPADHYAY, P., et al. Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy. **Free Radic Biol Med**, v., n., p., 2011
- NAIDU, P. S., et al. Carvedilol attenuates neuroleptic-induced orofacial dyskinesia: possible antioxidant mechanisms. **Br J Pharmacol**, v. 136, n. 2, p. 193-200, 2002
- NAKAGAWA, T., et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 98-103, 2000
- NISAR, S. ;FEINFELD, D. A. N-acetylcysteine as salvage therapy in cisplatin nephrotoxicity. **Ren Fail**, v. 24, n. 4, p. 529-533, 2002
- NOGUCHI, N., et al. Antioxidant action of the antihypertensive drug, carvedilol, against lipid peroxidation. **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 9, p. 1069-1076, 2000

- OETTL, K., et al. Radical-scavenging and iron-chelating properties of carvedilol, an antihypertensive drug with antioxidative activity. **Biochem Pharmacol**, v. 62, n. 2, p. 241-248, 2001
- OLDHAM, H. G. ;CLARKE, S. E. In vitro identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of R(+)- and S(-)-carvedilol. **Drug Metab Dispos**, v. 25, n. 8, p. 970-977, 1997
- OLIVEIRA, P. J., et al. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 200, n. 2, p. 159-168, 2004
- OZDEMIR, E., et al. Experimental study on effects of deferoxamine mesilate in ameliorating cisplatin-induced nephrotoxicity. **Int Urol Nephrol**, v. 33, n. 1, p. 127-131, 2002
- OZEN, S., et al. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **J Appl Toxicol**, v. 24, n. 1, p. 27-35, 2004
- PABLA, N., et al. Inhibition of PKCdelta reduces cisplatin-induced nephrotoxicity without blocking chemotherapeutic efficacy in mouse models of cancer. **J Clin Invest**, v. 121, n. 7, p. 2709-2722, 2011
- PABLA, N. ;DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney Int**, v. 73, n. 9, p. 994-1007, 2008
- PARK, M. S., et al. Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. **J Am Soc Nephrol**, v. 13, n. 4, p. 858-865, 2002
- PAT, B. K., et al. Fibrogenic stresses activate different mitogen-activated protein kinase pathways in renal epithelial, endothelial or fibroblast cell populations. **Nephrology (Carlton)**, v. 8, n. 4, p. 196-204, 2003
- PAUSCHINGER, M., et al. Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis association with reduced myocardial interleukin-1beta and MMP-8 expression and a modulated immune response. **Eur J Heart Fail**, v. 7, n. 4, p. 444-452, 2005
- PLANTING, A. S., et al. Randomized study of a short course of weekly cisplatin with or without amifostine in advanced head and neck cancer. EORTC

Head and Neck Cooperative Group. **Ann Oncol**, v. 10, n. 6, p. 693-700, 1999

PONGJIT, K., et al. Protective effect of Glycine max and Chrysanthemum indicum extracts against cisplatin-induced renal epithelial cell death. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, n. 12, p. 1931-1944, 2011

RAMOS-VARA, J. A. Principles and methods of immunohistochemistry. **Methods Mol Biol**, v. 691, n., p. 83-96, 2011

RANA, M. G., et al. *In vitro* antioxidant and free radical scavenging studies of alcoholic extract of *Medicago sativa L.* **Romanian Journal of Biology – Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 15-22, 2010

RASBACH, K. A. ;SCHNELLMANN, R. G. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 325, n. 2, p. 536-543, 2008

RODRIGUES, M. A., et al. Carvedilol protects against the renal mitochondrial toxicity induced by cisplatin in rats. **Mitochondrion**, v. 10, n. 1, p. 46-53, 2010

RODRIGUES, M. A., et al. Carvedilol protects against cisplatin-induced oxidative stress, redox state unbalance and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Chem Biol Interact**, v. 189, n. 1-2, p. 45-51, 2011

ROSENBERG, B. Platinum Complexes for Treatment of Cancer. **Interdisciplinary Science Reviews**, v. 3, n. 2, p. 134-147, 1978

ROSENBERG, B. Fundamental studies with cisplatin. **Cancer**, v. 55, n. 10, p. 2303-12306, 1985

ROSENBERG, B., et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, n. 5191, p. 385-386, 1969

RUFFOLO, R. R. ;FEUERSTEIN, G. Z. Carvedilol case history: the discovery and development of the first beta-blocker for the treatment of congestive heart failure. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 1, n. 1, p. 85-89, 2006

SANDERS, B. D., et al. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. **Biochim Biophys Acta**, v. 1804, n. 8, p. 1604-1616, 2010

- SANTOS, A. B., et al. Antioxidant Properties of Plant Extracts: an EPR and DFT Comparative Study of the Reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, v. 20, n. 8, p. 1483-1492, 2009
- SANTOS, N. A., et al. Hydroxyl radical scavenger ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by preventing oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 61, n. 1, p. 145-155, 2008
- SANTOS, N. A., et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. **Arch Toxicol**, v. 81, n. 7, p. 495-504, 2007
- SASTRY, J. ;KELLIE, S. J. Severe neurotoxicity, ototoxicity and nephrotoxicity following high-dose cisplatin and amifostine. **Pediatr Hematol Oncol**, v. 22, n. 5, p. 441-445, 2005
- SATOH, M., et al. A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 305, n. 3, p. 1183-1190, 2003
- SCHENELLMANN, R. G. (2001). Toxic responses of the kidney. **Casarett & Doull's toxicology. The basic science of poisons**. C. D. Kalassen. New York, McGraw-Hill: 491-514.
- SCHILLER, J. H., et al. Amifostine, cisplatin, and vinblastine in metastatic non-small-cell lung cancer: a report of high response rates and prolonged survival. **J Clin Oncol**, v. 14, n. 6, p. 1913-1921, 1996
- SENTHILKUMAR, N., et al. Synthesis of Active Metabolites of Carvedilol, an Antihypertensive Drug, . **Synthetic Communications: An International Journal for Rapid Communication of Synthetic Organic Chemistry**,, v. 41, n. 2, p. 268-276, 2010
- SHERMANN, S. E. ;LIPPARD, S. J. Structural aspects of platinum anticancer drug interaction with DNA. **Chem. Rev.**, v. 87, n., p. 1153-1181, 1987
- SHEU, S. S., et al. Targeting antioxidants to mitochondria: a new therapeutic direction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1762, n. 2, p. 256-265, 2006



- SILICI, S., et al. The protective effect of royal jelly against cisplatin-induced renal oxidative stress in rats. **World J Urol**, v. 29, n. 1, p. 127-132, 2011
- SIMUNEK, T., et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacol Rep**, v. 61, n. 1, p. 154-171, 2009
- SINGH, D., et al. Carvedilol attenuates ischemia-reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 18, n. 6, p. 627-634, 2004
- SKOVRONSKY, D. M., et al. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. **Annu Rev Pathol**, v. 1, n., p. 151-170, 2006
- SOMANI, S. M., et al. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. **Pharmacol Toxicol**, v. 86, n. 5, p. 234-241, 2000
- SPALLAROSSA, P., et al. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro. **J Mol Cell Cardiol**, v. 37, n. 4, p. 837-846, 2004
- STAFYLAS, P. C. ;SARAFIDIS, P. A. Carvedilol in hypertension treatment. **Vasc Health Risk Manag**, v. 4, n. 1, p. 23-30, 2008
- STENNICKE, H. R., et al. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. **J Biol Chem**, v. 274, n. 13, p. 8359-8362, 1999
- STOCK, C. C., et al. Sarcoma 180 inhibition screening data. **Cancer Res**, v. Suppl. 2, n., p. 179-331, 1955
- STODDART, M. J. Cell viability assays: introduction. **Methods Mol Biol**, v. 740, n., p. 1-6, 2011
- STOWE, D. F. ;CAMARA, A. K. Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: modulators of mitochondrial and cell function. **Antioxid Redox Signal**, v. 11, n. 6, p. 1373-1414, 2009
- SUGIURA, K. ;STOCK, C. C. Studies in a tumor spectrum. I. Comparison of the action of methylbis (2-chloroethyl)amine and 3-bis(2-chloroethyl)aminomethyl-4-methoxymethyl -5-hydroxy-6-methylpyridine

- on the growth of a variety of mouse and rat tumors. **Cancer**, v. 5, n. 2, p. 382-402, 1952
- SUNG, M. J., et al. Genistein protects the kidney from cisplatin-induced injury. **Kidney Int**, v. 74, n. 12, p. 1538-1547, 2008
- TANAKA, H., et al. Histopathological study of human cisplatin nephropathy. **Toxicol Pathol**, v. 14, n. 2, p. 247-257, 1986
- TANIHARA, Y., et al. Protective effect of concomitant administration of imatinib on cisplatin-induced nephrotoxicity focusing on renal organic cation transporter OCT2. **Biochem Pharmacol**, v. 78, n. 9, p. 1263-1271, 2009
- TARLADACALISIR, Y. T., et al. Protective effects of vitamin C on cisplatin-induced renal damage: a light and electron microscopic study. **Ren Fail**, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2008
- TOWNSEND, D. M., et al. Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2003
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-344, 2003
- UEDA, N., et al. Apoptotic mechanisms in acute renal failure. **Am J Med**, v. 108, n. 5, p. 403-415, 2000
- VALDECANTOS, M. P., et al. Lipoic Acid Improves Mitochondrial Function in Nonalcoholic Steatosis Through the Stimulation of Sirtuin 1 and Sirtuin 3. **Obesity (Silver Spring)**, v., n., p., 2012
- WANG, D. ;LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005
- WANG, X., et al. The tumoricidal effect of sonodynamic therapy (SDT) on S-180 sarcoma in mice. **Integr. Cancer. Ther.**, v. 7, n. 2, p. 96-102, 2008
- WEI, Q., et al. The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. **Kidney Int**, v. 72, n. 1, p. 53-62, 2007
- WERNER, M., et al. Nephrotoxicity of xenobiotics. **Clin Chim Acta**, v. 237, n. 1-2, p. 107-154, 1995

WILCOX, A. A., et al. Use of Berthelot Reaction in Automated Analysis of Serum Urea Nitrogen. **Clinical Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 151-158, 1966

WOLF, B. B. ;GREEN, D. R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. **J Biol Chem**, v. 274, n. 29, p. 20049-20052, 1999

YAO, X., et al. Cisplatin nephrotoxicity: a review. **Am J Med Sci**, v. 334, n. 2, p. 115-124, 2007

YUE, T. L., et al. Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 263, n. 1, p. 92-98, 1992

ZWELLING, L. A. ;KOHN, K. W. Mechanism of action of cis-dichlorodiammineplatinum(II). **Cancer Treat Rep**, v. 63, n. 9-10, p. 1439-1444, 1979