

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

VERIDIANA PACHECO GOULART MARTINAZZO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS PROBUCOL E
SUCCINOBUOL NA TOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM CÉLULAS
HEK 293**

FLORIANÓPOLIS

2019

VERIDIANA PACHECO GOULART MARTINAZZO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS PROBUCOL E
SUCCINOBUOL NA TOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM CÉLULAS
HEK 293**

Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia do
Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal
de Santa Catarina como requisito para obtenção do
título de Bacharel em Farmácia.

Orientador (a): Prof.^a Dra. Dirleise Colle

FLORIANÓPOLIS

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Martinazzo, Veridiana Pacheco Goulart
Avaliação do efeito protetor dos compostos
probucol e succinobucol na toxicidade induzida por
cisplatina em células HEK 293 / Veridiana Pacheco
Goulart Martinazzo ; orientadora, Dirleise Colle ,
2019.

p.43

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de
Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia,
Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. probucol. 3. succinobucol. 4.
cisplatina. 5. toxicidade. I. , Dirleise Colle. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em
Farmácia. III. Título.

Veridiana Pacheco Goulart Martinazzo

AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DOS COMPOSTOS PROBUCOL E
SUCCINOBUOL NA TOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM CÉLULAS
HEK 293

Este trabalho de conclusão de curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia

Prof^a. Dra. Marení Rocha Farias
Coordenadora do Curso

Florianópolis, 25 de novembro de 2019.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Dirleise Colle
Orientadora
UFSC

Prof. Dr. Marcos José Machado
Avaliador
UFSC

Prof^a. Dra. Iara Fabrícia Kretzer
Avaliadora
UFSC

*Dedico este trabalho à
minha mãe que não mediu
esforços para a realização deste
sonho.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a minha mãe, Nádia, por todo esforço, por nunca relutar em me ajudar a alcançar esse sonho, sempre acreditando em mim e me motivando a chegar neste momento. Obrigada, amo você mãe!

Agradeço a minha Orientadora, Professora Dirleise Colle, pelos dois anos de parceria e todo aprendizado que me proporcionou, além do suporte, paciência, disponibilidade e acompanhamento durante o decorrer deste trabalho, uma etapa tão importante.

Ao professor Marcos José Machado, meu agradecimento pelo conhecimento compartilhado durante o tempo de monitoria.

A professora Iara Fabrícia Kretzer, por todas as contribuições e pela disponibilidade em aceitar compor a minha banca.

A todos os meus demais professores por todas as aulas ministradas e por auxiliarem no meu crescimento profissional.

Um agradecimento especial a todo o pessoal do LEN, que me acolheu de braços abertos, em especial a Aline que me ajudou em muitos momentos deste trabalho.

Aos meus amigos, obrigada pelos momentos compartilhados juntos. Evoluímos, aprendemos, rimos e choramos juntos, vocês fazem parte da construção desta etapa da minha vida. Para aqueles que estiveram mais próximos, vocês tornaram momentos difíceis em sorrisos e agradeço imensamente a oportunidade de conhece-los em minha caminhada, vocês são muito especiais!

Obrigada Deus, por sempre me mostrar a luz quando eu nada via e me abençoar tantas vezes.

RESUMO

A cisplatina é um agente antineoplásico utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer. Apesar de seus efeitos positivos no tratamento do câncer, ainda enfrentamos uma importante limitação quanto ao seu uso que se deve a potenciais efeitos colaterais. Dentre estes efeitos, a nefrotoxicidade é o principal fator limitante da terapia com cisplatina. A cisplatina pode causar desequilíbrio de eletrólitos no organismo e lesão renal aguda (LRA) devido à necrose tubular. Diferentes mecanismos parecem contribuir para a patogenicidade renal do composto incluindo lesão vascular, inflamação, isquemia, estresse oxidativo e morte celular. O estudo de potenciais estratégias de prevenção da lesão renal induzida pela cisplatina tem se tornado um desafio pois deve-se encontrar um meio de proteger os rins, porém sem reduzir a eficácia do fármaco no tratamento do câncer. Diferentes estudos mostram que o uso de compostos antioxidantes pode representar uma importante opção na prevenção da lesão renal através da redução da produção de espécies reativas. O probucol e o succinobucol (composto derivado do probucol) são compostos hipolipemiantes com propriedades antioxidante e anti-inflamatória, que vêm demonstrando efeitos benéficos em diferentes modelos experimentais de patologias. Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho foi investigar, o possível efeito protetor do probucol e seu derivado succinobucol frente à nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em células HEK 293. Inicialmente, as células foram tratadas com probucol ou succinobucol nas concentrações de 0,5, 1, 3 e 10 μM durante 48 h. O tratamento com probucol não causou nenhuma alteração na viabilidade celular, enquanto que o tratamento com succinobucol, na concentração de 10 μM , significativamente reduziu a viabilidade celular. A partir destes resultados, escolhemos as concentrações de 10 μM para o probucol e 3 μM para o succinobucol, as quais não demonstraram efeitos citotóxicos no ensaio de viabilidade celular, para serem utilizadas nos ensaios posteriores. Em experimentos paralelos, as células foram expostas à cisplatina (10, 20, 50, 75, 100 e 200 μM) durante 24 h. A exposição à cisplatina na concentração de 200 μM causou uma redução de 30% na viabilidade das células HEK 293, porém sem induzir morte celular através do ensaio de incorporação do iodeto de propídio. Em seguida, investigou-se o possível efeito protetor do probucol e do succinobucol na toxicidade induzida por cisplatina. As células foram pré-tratadas com os compostos durante 24 h e, expostas à cisplatina por 24 h. O pré-tratamento com os compostos probucol e succinobucol não protegeu as células contra o efeito citotóxico induzido pela cisplatina. Tendo em vista que existe a necessidade de efetivos agentes protetores capazes de reduzir o efeito tóxico da cisplatina sobre o tecido renal, mais estudos são necessários, utilizando tempos maiores de pré-tratamento com os compostos. Além disso, estudos adicionais são também importantes para melhor entender o mecanismo de toxicidade da cisplatina em células HEK 293, além do potencial mecanismo de proteção dos compostos.

Palavras-chave: Probucol. Succinobucol. Cisplatina. Nefrotoxicidade. Estresse Oxidativo. Células HEK 293.

ABSTRACT

Cisplatin is an antineoplastic agent used to treat various types of cancer. Despite its positive effects on cancer treatment, we still face an important limitation regarding its use due to potential side effects. Among these effects, nephrotoxicity is the main limiting factor of cisplatin therapy. Cisplatin can cause electrolyte imbalance in the body and acute kidney injury (AKI) due to tubular necrosis. Different mechanisms appear to contribute to the renal pathogenicity of the compound including vascular injury, inflammation, ischemia, oxidative stress and cell death. Study potential strategies for cisplatin-induced kidney injury prevention has become a challenge as looking for a way of protecting the kidneys must be found, but without reducing the effectiveness of the drug in treating cancer. Different studies show that the use of antioxidant compounds may represent an important option in preventing kidney injury by reducing the production of reactive species. Probucol and succinobucol (a compound derived from probucol) are hypolipidemic compounds with antioxidant and anti-inflammatory properties, which have been shown beneficial effects on different experimental models of pathologies. Therefore, the general objective of this work was to investigate the possible protective effect of probucol and its derivative succinobucol against cisplatin-induced nephrotoxicity in HEK 293 cells. Initially, cells were treated with probucol or succinobucol at concentrations of 0.5, 1, 3 and 10 μM for 48 h. Probucol treatment did not cause any change in cell viability, while succinobucol treatment at 10 μM significantly reduced cell viability. From these results, we chose concentrations of 10 μM for probucol and 3 μM for succinobucol, which showed no cytotoxic effects in the cell viability assay, for use in subsequent assays. In parallel experiments, cells were exposed to cisplatin (10, 20, 50, 75, 100 and 200 μM) for 24 h. Exposure to cisplatin at a concentration of 200 μM caused a 30% reduction in viability of HEK 293 cells, but without inducing cell death by propidium iodide assay. Then, the possible protective effect of probucol and succinobucol on cisplatin-induced toxicity was investigated. Cells were pretreated with compounds for 24 h and exposed to cisplatin for 24 h. Pretreatment with the probucol and succinobucol compounds did not protect the cells against cisplatin-induced cytotoxic effect. There is a need for effective protective agents capable of reducing the toxic effect of cisplatin on renal tissue, further studies are needed using longer pretreatment times with the compounds. In addition, further studies are also important to better understand the toxicity mechanism of cisplatin in HEK 293 cells, as well as the potential protection mechanism of the compounds.

Keywords: Probucol, Succinobucol, Cisplatin, nephrotoxicity, oxidative stress, HEK 293 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Atividade de agentes antineoplásicos conforme ciclo celular.

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

Figura 3 – Eventos fisiopatológicos envolvidos na nefrotoxicidade por cisplatina.

Figura 4 – Estrutura dos compostos Probucol (A) e Succinobucol (B).

Figura 5 – Linha do tempo representando o protocolo experimental utilizado para os Compostos Probucol e Succinobucol.

Figura 6 – Linha do tempo representando o protocolo experimental utilizado para a cisplatina.

Figura 7 – Linha do tempo representando o protocolo experimental utilizado para investigar o efeito protetor dos compostos Probucol e Succinobucol, frente a toxicidade da cisplatina.

Figura 8 – Efeitos do tratamento com os compostos probucol e succinobucol na viabilidade de células HEK 293.

Figura 9 – Efeitos da exposição à cisplatina sobre a viabilidade e morte celular em células HEK 293.

Figura 10 – Efeito dos compostos probucol e succinobucol na redução da viabilidade celular induzida por cisplatina.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIF Fator de indução da apoptose
- DMEM Dulbecco modified eagle médium
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DMTU Dimetilureia
- EROs Espécies reativas
- FDA Food and Drug Administration
- GGT Gama glutamiltranspeptidase
- GPx Glutathione Peroxidase
- GSH Glutathione
- HDL Colesterol de alta densidade
- INCA Instituto nacional do câncer
- IP Iodeto de propídio
- LRA Lesão renal aguda
- MAPK Proteínas cinases ativadas por mitógenos
- MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil tetrazolium]
- NF- κ B Fator de transcrição nuclear kappa
- OCT2 Transportador de cátions orgânicos 2
- OMS Organização Mundial da Saúde
- TFG Taxa de filtração glomerular
- TNF- α Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 CÂNCER	12
1.2 CISPLATINA	14
1.2.1 Nefrotoxicidade induzida por cisplatina	15
1.2.2 Mecanismos de nefrotoxicidade induzidos pela cisplatina: uma ênfase no estresse oxidativo	17
1.3 PROBUCOL E SUCCINOBUCOL	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.1.1 Objetivos Específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 CULTURA CELULAR	25
4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL	26
4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	28
4.4 ENSAIO DE MORTE CELULAR	29
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 EFEITOS DO PROBUCOL E SUCCINOBUCOL NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEK 293	30
5.2 TOXICIDADE DA CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293 Erro! Indicador não definido.	30
5.3 EFEITOS DO PROBUCOL E SUCCINOBUCOL NA TOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293	34
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

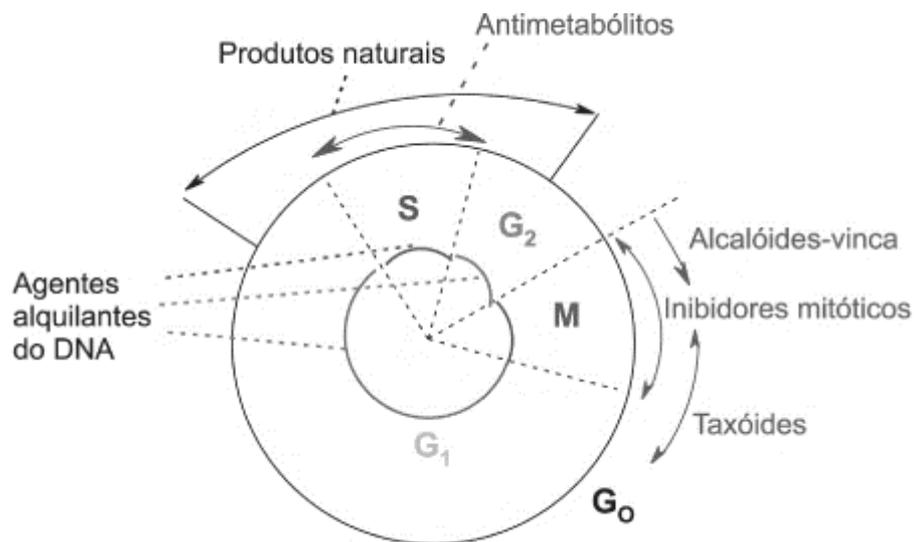
O número de casos diagnosticados de câncer no Brasil e no mundo está em constante aumento nos últimos anos, um desafio não apenas para os pacientes que convivem com a doença, mas também para médicos e demais profissionais da área da saúde. Suas causas não são totalmente compreendidas, porém, sabe-se que um terço das mortes se deve à simples fatores: índice de massa corporal alto, má alimentação, sedentarismo, radiação, álcool e tabagismo, sendo este último o mais importante (OMS, 2019). O câncer pode ser considerado, na maior parte dos países, a segunda maior causa de óbitos da população (HOYERT, 2012) e em 2018 foi responsável pela morte de 9,6 milhões de pessoas (OMS, 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os casos de morte relacionados ao câncer ultrapassam as estatísticas de morte por doenças neurológicas, ficando atrás apenas dos números relacionados à morte por problemas cardiovasculares (OMS, 2016). Para os anos de 2018 e 2019, no Brasil, há o surgimento anual de 600 mil novos casos de neoplasias (INCA, 2018).

Biologicamente falando, o câncer é caracterizado por várias doenças que possuem um padrão de multiplicação celular descontrolada e geração de células anormais. Este crescimento descontrolado provém de mutações no DNA de origem genética, que ocorrem devido à exposição a agentes mutagênicos ou devido ao próprio envelhecimento. Os cânceres também apresentam alterações epigenéticas que, associadas às genéticas, levam às mutações de expressão e função de genes regulatórios de processos celulares (KUMAR et al, 2018. Cap 6). Tais alterações são hereditárias e têm como resultado a apresentação dessas nas células-filha. As células mutadas possuem vantagem sobre as células não mutadas, fazendo com que predominem na população celular e possuam certa autonomia (KUMAR et al, 2018. Cap 6).

Há diferentes formas de tratamento para as neoplasias: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Em alguns casos há a necessidade de associação de duas formas para uma eficácia maior do tratamento. Dentre as opções de tratamento, a escolha da quimioterapia é mais frequente entre os casos de câncer. Seu objetivo principal é induzir a morte das células mutadas; entretanto a maioria dos fármacos não atua de

forma específica gerando lesões não somente às células malignas mas comprometendo também células saudáveis. Existem diferentes agentes antineoplásicos disponíveis para uso na clínica, os quais atuam através de mecanismos de ação que interferem no ciclo celular, cada um em uma fase diferente do ciclo (MURAD; KATZ, 1996) (Figura 1).

Figura 1 – Atividade de agentes antineoplásicos conforme ciclo celular.



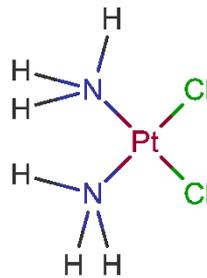
Legenda: A figura apresenta as classes de compostos antineoplásicos mais comumente utilizados e seu mecanismo de ação no ciclo celular. Adaptado de: ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. 2005.

Dentre as classes de agentes antineoplásicos destacam-se os agentes alquilantes, antimetabólicos, derivados de plantas (taxóides e alcalóides-vinca), antibióticos citotóxicos, inibidores da proteína quinase, anticorpos monoclonais e outros. Os agentes alquilantes, por sua vez, são os fármacos mais antigos utilizados no tratamento do câncer desde 1940 e também estão entre os mais utilizados. Entre os agentes alquilantes estão as mostardas nitrogenadas, nitrosureias, compostos de platina e outros. Estes compostos são agentes citotóxicos que interagem com o DNA inibindo a síntese de novo material genético. Desta forma, estes medicamentos interferem com o ciclo celular levando a célula à morte (RANG et al, 2016 Cap. 50).

1.2 CISPLATINA

A cisplatina (cis-diaminodichloroplatina (II)) é um composto da classe dos agentes alquilantes e sua atividade citotóxica foi descoberta em meados de 1960, quando observou-se seu efeito antineoplásico em um estudo utilizando camundongos com tumor já estabelecido (ROSENBERG et al, 1969). Posteriormente, em 1978 a cisplatina foi aprovada para o tratamento de câncer de ovário e testículo (HIGBY et al, 1978). Atualmente, este composto é utilizado para o tratamento de diversos tipos de câncer incluindo ovários, testículo, bexiga, esôfago, pulmão, cabeça, pescoço, mama, próstata, dentre outros. A estrutura química da cisplatina pode ser observada na figura 2.

Figura 2- Estrutura química do composto cisplatina em 2D.



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

O mecanismo de ação da cisplatina envolve, basicamente, a ligação do composto ao DNA, desta forma prejudicando a transcrição e replicação celular e resultando em apoptose (FLOREA et al, 2011). Além disso, outros mecanismos também desempenham papel importante no seu efeito antineoplásico como a interferência na síntese e reparo de DNA, a produção de espécies reativas, alterações na proteína supressora de tumor p53, indução de apoptose através da interação entre o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e caspases e disfunção mitocondrial via estresse no retículo endoplasmático (MANOHAR et al, 2018; PERES et al, 2013; SANTOS, 2006).

A cisplatina tem sido utilizada na clínica por 40 anos e apesar de seus efeitos positivos no tratamento do câncer, ainda enfrentamos uma importante limitação quanto ao seu uso que se deve a potenciais efeitos colaterais. A partir de alguns

estudos, verificou-se que entre os efeitos colaterais do fármaco está um grande potencial de desencadeamento de neurotoxicidade, ototoxicidade e nefrotoxicidade após uma única dose. Dentre estes efeitos, a nefrotoxicidade é o principal fator limitante da terapia com cisplatina (SANTOS et al, 2012).

1.2.1 Nefrotoxicidade induzida por cisplatina

As funções do rim incluem a formação da urina, reabsorção e secreção tubular, funções endócrinas através da produção de eritropoietina e renina e regulação de cálcio no organismo associada a metabolização da vitamina D (HARTMANN, 1994). Devido ao seu papel em manter a homeostase sanguínea, os rins estão muito susceptíveis à toxicidade por alguns compostos. A definição de nefrotoxicidade engloba alterações tanto funcionais quanto estruturais, resultado da ação de substâncias que possuem toxicidade no parênquima renal, cujo efeito tóxico pode estar associado a altas concentrações ou devido ao tecido renal possuir características que o tornam mais sujeito à danos causados por determinados compostos (GORDON et al, 1986).

Como mencionado anteriormente, a cisplatina induz potencial toxicidade sobre os rins, o que limita o tratamento com o fármaco. A maior parte da cisplatina é excretada através dos rins, sua excreção biliar e intestinal é mínima, o que torna sua concentração neste órgão cinco vezes maior que a concentração sanguínea (SANTOS et al, 2012). A incidência destes efeitos nefrotóxicos também vem de fatores de risco como idade, histórico de doenças, a forma de tratamento, além de outros fatores endógenos (MIZUNO et al, 2013). Os efeitos tóxicos atingem principalmente os túbulos proximais, especialmente a porção S3; entretanto, os glomérulos e os túbulos distais também são afetados posteriormente (SCHNELLMANN, 2001). A concentração de cisplatina nas células dos túbulos renais é cerca de cinco vezes mais alta do que no sangue (PERES et al, 2013). A incidência de nefrotoxicidade aumenta com o aumento da dose, da frequência e duração do tratamento, o que, conseqüentemente, compromete a eficácia da terapia (HANIGAN et al, 2003).

A prevalência de nefrotoxicidade induzida por cisplatina é alta, ocorrendo em aproximadamente um terço dos pacientes em tratamento com o fármaco (ARANY et al, 2003). As principais manifestações clínicas aparecem cerca de 10 dias após sua

administração e são caracterizadas por redução na taxa de filtração glomerular, aumento da creatinina sérica e redução das concentrações séricas de potássio e magnésio (GONZALES-VITALE et al, 1977; GOMES et al, 1986). A cisplatina pode causar desequilíbrio de eletrólitos no organismo e lesão renal aguda (LRA) devido à necrose tubular (PABLA et al, 2008). A exposição contínua e prolongada ao fármaco pode levar à uma cronicidade da lesão renal e outras nefropatias (HAN et al, 2009).

A LRA é caracterizada por uma redução da função renal que, como o próprio nome diz, ocorre de forma abrupta, dentro de poucas horas ou dias. Nesta situação, há uma diminuição na taxa de filtração glomerular, com consequente aumento na concentração de creatinina e ureia séricas, bem como alterações na homeostase eletrolítica além de uma diminuição do débito urinário, que ocorrem cerca de 48h após eventos clínicos ou outros. Os sintomas clínicos não são específicos e incluem mal-estar, febre, fraqueza, dor lombar, possível diminuição do volume urinário, entre outros, e podem ser confundidos com diversas doenças (MUNDT et al, 2011). O diagnóstico da LRA é baseado em exames laboratoriais como a dosagem de creatinina sérica, *clearance* de creatinina, avaliação de sedimento urinário, exames de imagem e inclusive biópsia renal (SANCHEZ-GONZALES et al, 2011).

O tratamento com cisplatina parece causar LRA em 20-30% dos pacientes. Além da LRA, outras formas de manifestação de sua toxicidade incluem hipomagnesemia, síndrome de Fanconi, acidose tubular, defeitos no processo de concentração renal, microangiopatia trombótica e outras complicações (MANOHAR et al, 2018). Diferentes mecanismos parecem contribuir para a patogenicidade renal do composto incluindo lesão vascular, inflamação, isquemia, estresse oxidativo e morte celular. Há também estudos demonstrando que a cisplatina possui capacidade de causar disfunção mitocondrial nas células renais, juntamente com o dano ao DNA nuclear, o que é resultante do estresse oxidativo coordenado pela ação das espécies reativas de oxigênio como o radical ânion superóxido. Com o aumento destas espécies reativas há uma liberação de citocromo c no citosol, o que dá início à uma série de eventos que resultará na morte celular, geralmente por apoptose (SANTOS, 2006). Um estudo comparativo com um análogo, a carboplatina, demonstrou que a cisplatina induziu uma maior quantidade de células à morte (HARRAP, 1985). Também foi observado que a administração de cisplatina induziu o aumento da expressão de citocinas inflamatórias e quimiocinas renais, incluindo a interleucina 1 β ,

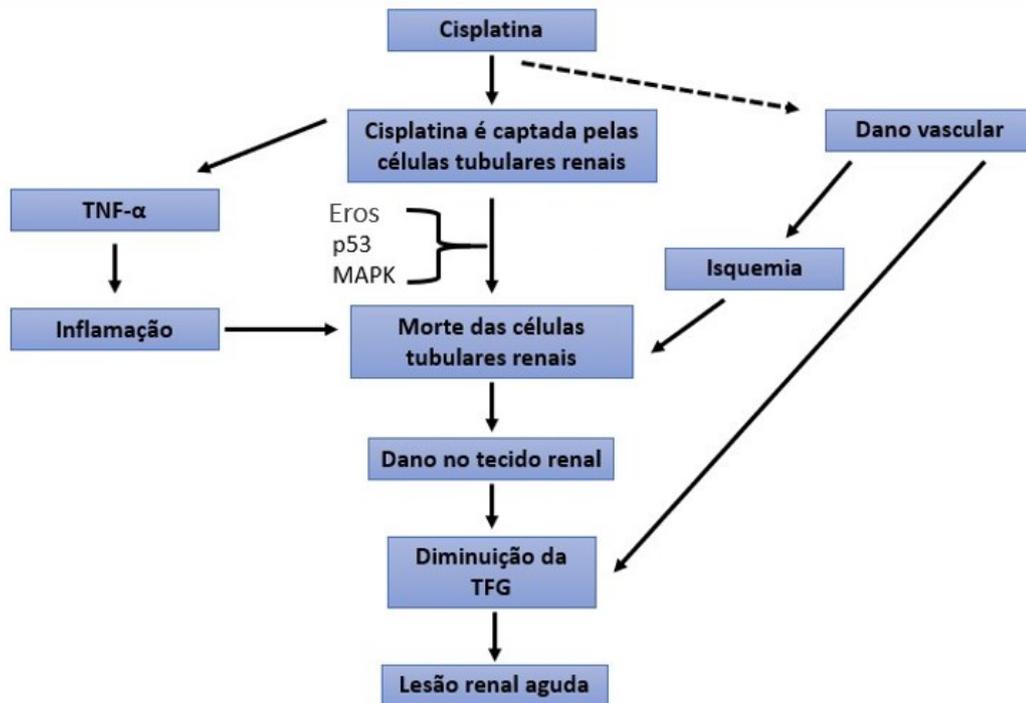
interleucina 18, CX3CL1 (uma quimiocina envolvida nas etapas iniciais de inflamação) e interleucina 3 em camundongos (FAUBEL et al, 2007).

Como mencionado anteriormente, a toxicidade da cisplatina sobre o sistema renal é um importante fator limitante no tratamento com o composto. Neste contexto, algumas medidas são tomadas para minimizar os efeitos tóxicos da cisplatina. Para a prevenção da lesão renal, uma das principais medidas adotadas é o aumento da hidratação dos pacientes em conjunto com a administração de manitol, que favorece a diurese e a excreção da cisplatina, reduzindo a exposição renal ao composto (SANTOS et al, 2006). Alguns fármacos também são empregados para esta função, como os inibidores do transportador de cátions orgânicos 2 (OCT2), um transportador de cátions responsável pelo transporte da cisplatina nas células tubulares renais (SPROWL et al, 2013). Diretrizes europeias recomendam também o ajuste da dose de cisplatina conforme a função renal do paciente e administração de agentes que previnam a nefrotoxicidade (LAUNAY-VACHER, 2008). Entretanto, mesmo com estas medidas, o comprometimento renal ocorre de maneira frequente.

1.2.2 Mecanismos de nefrotoxicidade induzidos pela cisplatina: uma ênfase no estresse oxidativo

Os mecanismos de nefrotoxicidade da cisplatina tem sido extensivamente estudados nos últimos anos. De uma maneira geral, a base patofisiológica da toxicidade da cisplatina é mediada pela sua entrada nas células tubulares renais. Uma vez dentro das células, a cisplatina ativa diferentes vias de sinalização, com indução de resposta inflamatória, culminando com a morte das células renais. A cisplatina também pode causar lesão vascular, culminando com diminuição do fluxo sanguíneo e dano isquêmico no tecido renal, o que contribui para a redução na taxa de filtração glomerular (Figura 3). Juntos esses eventos contribuem para o desenvolvimento de LRA (PABLA et al, 2007).

Figura 3 – Eventos fisiopatológicos envolvidos na nefrotoxicidade por cisplatina



Legenda: Após a entrada da cisplatina nas células tubulares renais, ocorre a ativação de vias de sinalização como a via das MAPK e proteína supressora de tumor p53, bem como, a produção de EROs, o que promove a morte celular. Ao mesmo tempo, a cisplatina induz a produção de TNF- α nas células tubulares o que desencadeia a resposta inflamatória que contribui para os danos celulares. A cisplatina também pode gerar danos na vasculatura renal, causando morte das células tubulares por isquemia e diminuição da TFG. EROs, espécies reativas de oxigênio; MAPK, proteínas cinases ativadas por mitógenos; TGF, taxa de filtração glomerular; TNF- α , fator de necrose tumoral α . Adaptado de: PABLA et al, 2007.

Devido ao seu baixo peso molecular e sua neutralidade, a cisplatina entra livremente nas células tubulares renais, gerando alta concentração nas células tubulares proximais do córtex renal interno e também na camada medular externa (KUHLMANN, 1997). Um transportador catiônico orgânico (OCT) foi identificado como principal transportador responsável pela entrada da cisplatina nas células renais. Foi demonstrado que o tratamento com cimetidina, um inibidor de OCTs previne parcialmente a toxicidade da cisplatina (LUDWIG et al, 2004). Ciarimboli e colaboradores demonstraram que o OCT2 é o principal transportador atuando na entrada da cisplatina nos túbulos renais (CIARIMBOLI et al, 2010, CIARIMBOLI et al., 2005).

Uma vez nas células tubulares renais, a cisplatina exerce diversos efeitos tóxicos culminando com morte celular através de mecanismos de necrose e apoptose. Estudos com ratos demonstram que altas doses do composto induzem necrose enquanto que em baixas doses ocorre ativação de vias apoptóticas (YU et al, 2007), sugerindo que a dose de cisplatina pode determinar o tipo de morte celular. Outros estudos demonstram que a cisplatina induz à nefrotoxicidade através de mecanismos como (i) danos ao DNA, (ii) produção de espécies reativas, (iii) interação com a proteína p53, (iv) interação com o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e capases intrínsecas, (v) disfunção mitocondrial e (vi) alterações na sinalização de cálcio nas células (MANOHAR et al, 2018).

A cisplatina reage com o DNA resultando em ligações cruzadas intracadeias, as quais conduzem a um prejuízo no ciclo celular, levando a apoptose (JIANG et al, 2008). Estudos também demonstram que o DNA mitocondrial pode ser o sítio mais comum de ligação da cisplatina. Além do DNA, a cisplatina interage com RNA, proteínas e fosfolípidos (CULLEN et al, 2007).

A lesão induzida pelo uso de cisplatina pode gerar interferências na polaridade celular, modificando íons hidrogênio, magnésio, potássio e cálcio o que pode ser um fator contribuinte para diminuir a reabsorção no túbulo proximal e distal, aumentando a excreção destes íons. Além disso, a lesão gerada pela cisplatina ao epitélio dos túbulos renais pode resultar em um retorno do filtrado glomerular à circulação (LAJER et al, 2005). Além disto, a resposta inflamatória gerada pelo uso de cisplatina se deve ao fato de que este composto ativa a fosforilação e translocação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), e sua ativação promove a transcrição de genes que codificam mediadores inflamatórios (MILLER et al, 2010). Estes eventos aumentam a expressão de TNF- α o qual pode desencadear a morte das células dos túbulos renais, contribuindo para o processo de nefrotoxicidade (ZHANG et al, 2007)

Além desses mecanismos, o estresse oxidativo parece desempenhar um papel importante na toxicidade da cisplatina. O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a sua detoxificação. A cisplatina pode induzir estresse oxidativo através da indução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e também da depleção da glutathiona (GSH). Uma vez captada pelas células renais, a cisplatina reage rapidamente com tióis, como a GSH (PABLA et al, 2008). A GSH é o principal antioxidante não enzimático nos sistemas biológicos e sua depleção resulta no aumento do estresse oxidativo nas células. Quando

absorvida a cisplatina forma um conjugado com a GSH (cisplatina-GSH) no fígado, o qual, quando chega aos rins, é clivado a um metabólito tóxico, através da ação da enzima Gama-glutamiltanspeptidase (GGT), culminando em morte celular (WAINFORD et al, 2008). Além disso, vale ainda ressaltar que a reação da cisplatina com grupamentos tióis resulta na depleção ou inativação da GSH, causando um acúmulo de EROs, culminando com estresse oxidativo.

Outro mecanismo que contribui para o estresse oxidativo induzido pela cisplatina é a disfunção mitocondrial. A cisplatina parece aumentar a geração de EROs através de alterações na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Kruidering e colaboradores mostraram que o tratamento com cisplatina em células tubulares proximais foi capaz de inibir os complexos mitocondriais I ao IV, resultando na diminuição da produção de ATP geração de EROs (KRUIDERING et al, 1997). Ademais, a Cisplatina também parece induzir a produção de EROs via sistema citocromo P450 (CYP). Um estudo *in vivo* demonstrou que em animais transgênicos, que não expressavam CYP2E1, a geração de EROs induzida pelo tratamento com cisplatina foi atenuada, assim como o dano renal (LIU et al, 2003).

As EROs têm por natureza a capacidade de atacar e modificar moléculas, como DNA, lipídios e proteínas, resultando em dano celular. Além disso, as EROs também estão envolvidas na ativação das vias de sinalização importantes na nefrotoxicidade produzida pela cisplatina, incluindo vias apoptóticas (JIANG et al, 2007). Neste cenário, compostos antioxidantes têm sido estudados para verificar o potencial de proteção frente à nefrotoxicidade causada pela cisplatina, entre eles destacam-se melatonina (SAAD et al, 2002), N-acetilcisteína (WU et al, 2005), vitamina E (NAZIROGLU et al, 2004), compostos naturais como a curcumina (WALY et al, 2011), entre outros. Alguns estudos foram realizados em humanos com suplementação de micronutrientes antioxidantes, incluindo vitamina C, E e selênio, porém, não foi possível verificar nenhum benefício (WEIJL et al, 2004). A dosagem do antioxidante e o estado clínico do paciente são determinantes na possibilidade de prevenção do dano renal (PABLA et al, 2008). Ressalta-se a importância de o antioxidante não interferir na eficácia do tratamento anti-câncer em andamento, agindo localmente nos rins, como demonstrado em muitos estudos utilizando compostos naturais (SHIMEDA et al, 2005).

Além dos estudos com antioxidantes, outros compostos têm sido investigados como potenciais agentes protetores frente à nefrotoxicidade da cisplatina. Alguns

compostos tióis são utilizados para desempenhar esta função, pois acredita-se que são capazes de formar um complexo com a cisplatina prevenindo a formação de um conjugado cisplatina-glutationa. Um exemplo é a Amifostina, o único composto aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para a nefrotoxicidade induzida pela cisplatina em casos de câncer avançado de ovário e pulmão. Contudo, o efeito citoprotetor da Amifostina ainda não foi demonstrado de forma consistente já que existem vários relatos de ototoxicidade mesmo com administração de doses corretas do fármaco (MANOHAR et al, 2018).

1.3 PROBUCOL E SUCCINOBUOL

O probucol (Figura 4A) foi descrito em 1970 como um composto hipolipemiante em um estudo com camundongos, ratos e macacos (BARNHART et al, 1970), efeito também confirmado em humanos (DRAKE et al, 1969). Trata-se de um composto fenólico com propriedades antioxidante e anti-inflamatória, que foi utilizado na clínica para o tratamento de doenças cardiovasculares; entretanto não está mais disponível em muitos países devido ao seu potencial de causar efeitos colaterais como arritmias ventriculares e redução no colesterol de alta densidade (HDL) (TARDIF et al, 2002).

Apesar da demonstração de efeitos colaterais, o probucol ainda é utilizado clinicamente em países como o Japão, desde 1985, para o tratamento de aterosclerose e na prevenção de doenças cardiovasculares (YAMASHITA et al, 2009). Além disso, o probucol ainda figura entre estudos clínicos para avaliar suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. A partir de tais resultados, seria possível então inseri-lo novamente em determinados protocolos terapêuticos (YAMAMOTO et al, 2008). Exemplo disto são estudos que demonstram sua capacidade de modular a atividade da enzima antioxidante glutaciona peroxidase (GPx) (COLLE et al, 2013) e propriedades anti-inflamatórias (PFUETZE et al, 2000). O probucol também apresenta efeitos cardioprotetores, previne ataques cardíacos e retarda a aterosclerose em humanos (SAWAYAMA et al., 2002; YAMASHITA et al., 2008).

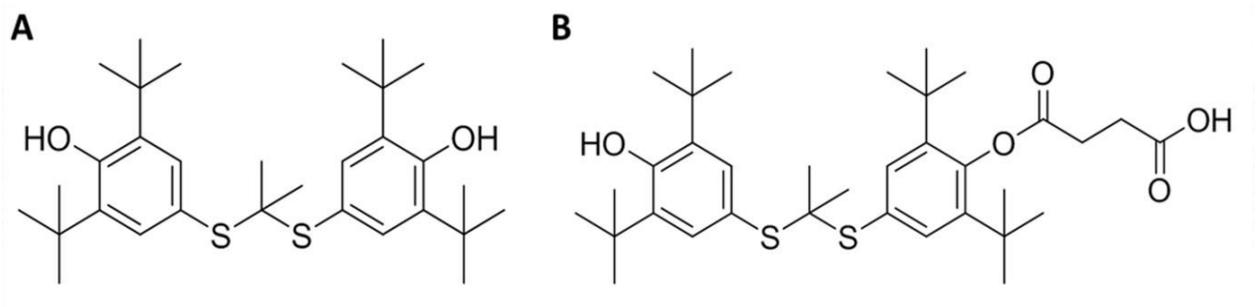
Estudos experimentais também demonstraram os efeitos neuroprotetores do probucol em modelos de doença de Parkinson, Alzheimer e Huntington (COLLE et al, 2013; RIBEIRO et al, 2013; SANTOS et al, 2012), os quais foram relacionados ao seu potencial efeito anti-inflamatório e antioxidante. Nos rins, já foi demonstrado os efeitos

do probucol como protetor em modelo de LRA induzida por contraste em ratos, onde o composto inibiu a apoptose das células renais (MA et al, 2019). Em um estudo recente, o probucol foi capaz de reduzir os danos renais em um modelo de nefropatia diabética induzido pela administração de estreptozotocina em camundongos, sendo tal efeito atribuído a uma diminuição no estresse oxidativo (YANG et al, 2017).

O succinobucol (AGI-1067) (Figura 4B) é um éster monosuccínico derivado do probucol que retêm as propriedades antioxidantes deste composto (MENG et al., 2002; SUNDELL et al., 2003), porém sem induzir os efeitos colaterais do probucol. O succinobucol demonstrou ser um agente antioxidante (SUNDELL et al, 2003), com potencial hipolipêmico (TARDIF et al, 2008), além de apresentar propriedades anti-inflamatórias, diminuindo a expressão de células de adesão e citocinas inflamatórias (LUYENDYK et al, 2007). Dados da literatura mostram que o succinobucol previne o desenvolvimento da aterosclerose (SUNDELL et al., 2003) e é capaz de reduzir significativamente a incidência de infarto do miocárdio e o acidente vascular cerebral em pacientes cardiopatas (TARDIF et al., 2008). Estudos também demonstraram que o succinobucol apresenta atividade antidiabética, sendo capaz de reduzir os níveis de hemoglobina glicada e de glicose de jejum (TARDIF et al., 2008), além de apresentar efeitos benéficos frente à condição de resistência à ação da insulina (CRIM et al., 2010).

Além disso, esse composto apresentou efeitos benéficos em modelos de doença de Parkinson (SANTOS et al, 2017) e Huntington (COLLE et al, 2016), apresentando efeitos superiores aos efeitos do probucol (COLLE et al, 2013). Um estudo recente demonstrou que o tratamento com succinobucol em células de neuroblastoma humano SH-SY5Y é capaz de aumentar os níveis de GSH através da modulação da enzima glutamato cisteína ligase (GCL, uma enzima chave na síntese da GSH), o que conferiu proteção frente à disfunção mitocondrial e estresse oxidativo induzidos pelo ácido 3-Nitropropiónico (COLLE et al., 2016). Além disso, Santos e colaboradores demonstraram que o Succinobucol foi capaz de conter a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra induzida pela administração da toxina MPTP em um modelo de doença de Parkinson em camundongos (SANTOS et al., 2017).

Figura 4 – Estrutura dos compostos Probucol (A) e Succinobucol (B).



Fonte: (Santos et al, 2016)

2. JUSTIFICATIVA

Desde sua aprovação pelo FDA (American Food and Drug Administration) em 1978, a cisplatina vem sendo utilizada constantemente como tratamento para diferentes casos de neoplasias. Seu efeito terapêutico aumenta proporcionalmente ao aumento da dose/frequência, o que se apresenta também como fator limitante devido a resultar em nefrotoxicidade (PERES et al, 2013).

Quando administrada, a cisplatina tende a se acumular nos túbulos renais proximais onde dá origem a espécies reativas de oxigênio, gerando o processo de estresse oxidativo, um dos principais desencadeadores da nefrotoxicidade, além de outros mecanismos (PABLA et al, 2008).

A LRA é uma das principais manifestações clínicas da nefrotoxicidade da cisplatina, onde de forma abrupta se dá um decaimento da taxa de filtração glomerular devido ao dano às células epiteliais tubulares, glomerulares e endoteliais vasculares. Estudos comprovam que pacientes em tratamento com o antineoplásico apresentaram aumento na excreção de β_2 -microglobulina, um importante marcador de dano tubular proximal, além de albumina e imunoglobulina G (IgG) que também são marcadores de dano renal (SANTOS et al, 2006).

O tratamento com cisplatina se torna prejudicado e limitado devido aos seus efeitos adversos, sendo o dano renal o mais preocupante devido à sua alta taxa de morbidade e mortalidade associadas à toxicidade do medicamento. Para prevenção

de tais quadros, atualmente, se aplicam tratamentos com intensa hidratação visando o não acúmulo do fármaco nos rins (PERES et al, 2013).

O estudo de potenciais estratégias de prevenção da lesão renal induzida pela cisplatina se torna um desafio pois deve-se encontrar um meio de proteger os rins, porém sem reduzir a eficácia do fármaco no tratamento do câncer (PABLA et al, 2008). Diferentes estudos mostram que o uso de compostos antioxidantes pode representar uma importante opção na prevenção da lesão renal através da redução da produção de espécies reativas (FLOREA et al, 2011). Neste sentido, o interesse em estudar compostos antioxidantes como o probucol e o succinobucol é relevante, principalmente devido ao fato de que esses compostos apresentam importante atividade antioxidante e anti-inflamatória em diferentes modelos experimentais.

Tendo em vista que (i) o uso da cisplatina induz potencial efeito nefrotóxico; (ii) o efeito nefrotóxico induzido pela cisplatina limita a sua utilização na clínica; (iii) o estresse oxidativo desempenha um papel importante na toxicidade da cisplatina (FLOREA et al, 2011); (iv) os compostos probucol e succinobucol são potentes antioxidantes e já demonstraram efeito protetor em modelos de toxicidade/patologia e (COLLE et al, 2013) (v) ainda há uma necessidade de efetivos agentes protetores para reduzir o efeito tóxico da cisplatina sobre os rins, acredita-se que a busca de possíveis agentes com atividades renoprotetoras é amplamente justificável. Desta forma, a partir dos resultados e observações obtidas, o presente trabalho visa a contribuir com conhecimento básico que pode auxiliar no desenvolvimento de futuros estudos farmacológicos clínicos visando a prevenção da lesão renal causada pelo antineoplásico cisplatina sem comprometer sua eficácia no tratamento do câncer.

3.OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é investigar, em um modelo *in vitro*, o possível efeito protetor do probucol e seu derivado succinobucol frente à toxicidade induzida pela cisplatina em células HEK-293.

3.1.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar, através de testes de viabilidade celular, o efeito dos compostos probucol e succinobucol em células HEK-293;
- b) Avaliar, através de testes de viabilidade e morte celular, o efeito tóxico da exposição à cisplatina em células HEK-293;
- c) Investigar o possível efeito protetor do composto probucol contra a toxicidade induzida pela cisplatina em células HEK-293;
- d) Investigar o possível efeito protetor do composto succinobucol contra a toxicidade induzida pela cisplatina em células HEK-293.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CULTURA CELULAR

Para este estudo *in vitro* foram usadas células embrionárias de rim humano (HEK-293, ATCC – Rockville, EUA), gentilmente cedidas pela professora Dra. Fabíola Branco Filippin Monteiro. As células HEK-293 são provenientes de rim de um feto saudável abortado, em meados da década de 70, com causas desconhecidas. As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 0,28 µg/µL de gentamicina e 250 µg de anfotericina B. As culturas foram mantidas em estufa úmida a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ e cultivadas em placas de petri com área de crescimento de 60,8 cm². O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias e o repique ocorreu conforme necessidade verificando a confluência celular (~90%), utilizando solução de tripsina 1x. Os experimentos foram realizados em 60-70% de confluência celular e foram utilizadas células entre as passagens 5 e 10.

4.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os compostos cisplatina e probucol foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. O composto succinobucol foi sintetizado previamente em colaboração com o Professor Dr. Marcelo Godoi da Universidade Federal do Rio Grande, Campus Santo Antônio da Patrulha em parceria já estabelecida (WEINGARTEN, 2004; COLLE et al, 2013). Os compostos probucol e succinobucol foram preparados em Dimetilsulfóxido (DMSO) que foi utilizado como veículo e cuja concentração não ultrapassou 0,1% nas células. A cisplatina foi preparada em solução salina (NaCl) 0,9%. Para os experimentos as células foram cultivadas em placas de 96 poços.

Inicialmente foi realizada uma curva de concentração com os compostos probucol e succinobucol para então definir qual a concentração que seria usada para cada composto nos experimentos posteriores. As células foram tratadas com veículo (DMSO 1%), probucol (0,5 μ M, 1 μ M, 3 μ M e 10 μ M) ou com seu derivado succinobucol (0,5 μ M, 1 μ M, 3 μ M e 10 μ M), durante 48h e, ao final do tratamento foi realizado o teste de viabilidade celular através do ensaio de redução do MTT (Figura 5). Baseado nestes resultados foram determinadas as concentrações de 10 μ M para o Probucol e 3 μ M para o Succinobucol, para utilização nos demais ensaios propostos neste estudo.

Figura 5 – Linha de tempo representando o protocolo experimental utilizado para os compostos probucol e succinobucol.

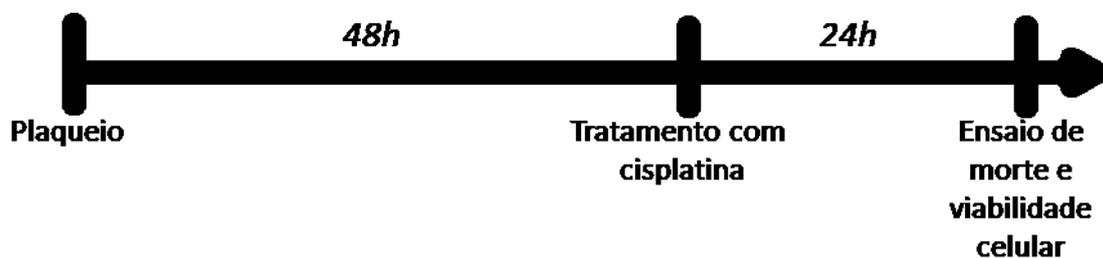


Legenda: As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com 6.000 células/poço e incubadas durante 24h em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após, as células foram tratadas com os compostos probucol e succinobucol com as concentrações previamente escolhidas e incubadas nas mesmas condições durante 48h. Em seguida foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT).

Fonte: O autor, 2019.

Em outro experimento, as células foram expostas a concentrações crescentes de cisplatina (10 μM , 20 μM , 50 μM , 75 μM , 100 μM e 200 μM) ou veículo (salina) durante 24 horas e em seguida foram realizados os testes de viabilidade (MTT) e morte celular (ensaio de captação do iodeto de propídio) (Figura 6).

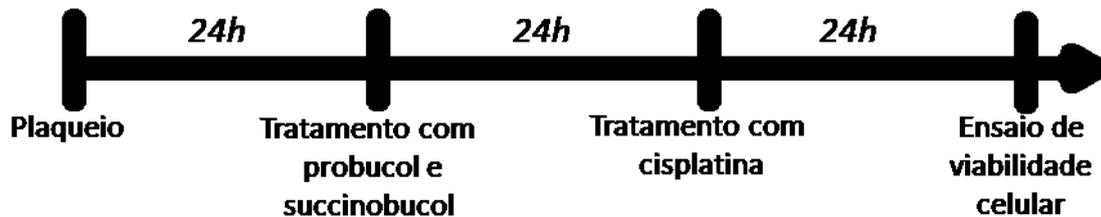
Figura 6 – Linha de tempo representando o protocolo experimental utilizado para a cisplatina.



Legenda: As células foram plaqueadas em placas de 96 poços, com 6.000 células/poço e incubadas durante 48h em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C. Após, as células foram tratadas com cisplatina utilizando as concentrações previamente escolhidas e incubadas nas mesmas condições durante 24h. Em seguida, foram realizados os ensaios de morte (IP) e viabilidade celular (MTT). Fonte: O autor, 2019.

Para investigar se os compostos probucol e succinobucol seriam capazes de proteger as células frente a toxicidade da cisplatina, as células foram pré-tratadas com os compostos nas concentrações escolhidas anteriormente durante 24h. Após o pré-tratamento com os compostos antioxidantes, nas concentrações de 10 μM para o probucol e 3 μM para succinobucol, foi realizado o tratamento com cisplatina na concentração de 200 μM durante 24h. Posteriormente foram realizados ensaios de viabilidade celular (Figura 7).

Figura 7 – Linha do tempo representando o protocolo experimental utilizado para investigar o efeito protetor dos compostos probucol e succinobucol frente a toxicidade da cisplatina



Legenda: As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com 6.000 células/poço e incubadas durante 24h em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Em seguida as células foram tratadas com os compostos probucol (10 µM) e succinobucol (3 µM) e incubadas mais 24h nas mesmas condições. Após este pré-tratamento, as células foram expostas à cisplatina (200 µM) e novamente incubadas durante 24 h e, em seguida foi realizado o ensaio de viabilidade celular (MTT).

4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para o ensaio de viabilidade celular, as células foram semeadas em placas com configuração de 96 poços, na densidade de 6.000 células/poço. O ensaio de redução do MTT (MOSMAN, 1983) foi utilizado para verificar a viabilidade celular. Neste ensaio verifica-se a capacidade da redução do sal tetrazólico, MTT, [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium], pelas desidrogenases provenientes das mitocôndrias das células, em um composto azulado denominado formazan. Após os tratamentos, o meio de cultivo foi removido e adicionado aos poços 100 µL de uma solução de MTT 0,5 mg/mL. As células foram incubadas durante uma hora e meia a 37 °C protegidas da luz. Após o tempo de incubação, a solução de MTT foi removida e 100 µL do solvente DMSO foi adicionado aos poços para solubilizar o formazan. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 - TECAN) no comprimento de onda de 540nm. A viabilidade celular foi expressa pela porcentagem do controle (células tratadas com veículo, 100%).

4.4 ENSAIO DE MORTE CELULAR

Para os ensaios de morte celular, as células foram semeadas em placas com configuração de 96 poços, na densidade de 6.000 células/poço. Como ensaio de morte celular, utilizou-se o teste da incorporação do iodeto de propídio (IP), um marcador nuclear fluorescente de coloração vermelha que se intercala em qualquer DNA desde que a membrana celular esteja permeável (ROSA et al., 1997). Esta propriedade deve-se ao fato de que marcadores de DNA de elevado peso molecular, como o PI, não são capazes de penetrar na célula intacta. Desta forma somente marcam células que apresentem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, o que ocorre nos estágios finais do apoptose ou na morte celular por necrose.

Para este ensaio, primeiramente foi adicionado 10 µL de uma solução de Triton X-100 2% em alguns poços chamados de controle positivo (100 % de morte) e a placa foi incubada por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada poço 5 µL de uma solução de iodeto de propídio 147 µg/mL e as células foram incubadas por 20 minutos a 37°C. Posterior foi realizada a leitura da fluorescência em 535 nm de excitação e 617 nm de emissão, utilizando espectrofotômetro (Multileitora Infinite M200 – TECAN). Os resultados foram determinados em porcentagem em relação ao controle positivo (100% de morte celular, células tratadas com Triton X-100 2% por 10 minutos).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa STATISTICA, na versão 8.0 (StatSoft, Inc., 2008). Análises de variância (ANOVA) de uma ou duas vias foram utilizadas para avaliar as diferenças entre grupos, seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey. Os dados foram representados como média ± erro padrão da média e diferenças entre grupos foram consideradas significativas para um valor de $p < 0,05$. Através do programa GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) foi realizada a produção dos gráficos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITOS DO PROBUCOL E SUCCINOBUCOL NA VIABILIDADE DE CÉLULAS HEK 293

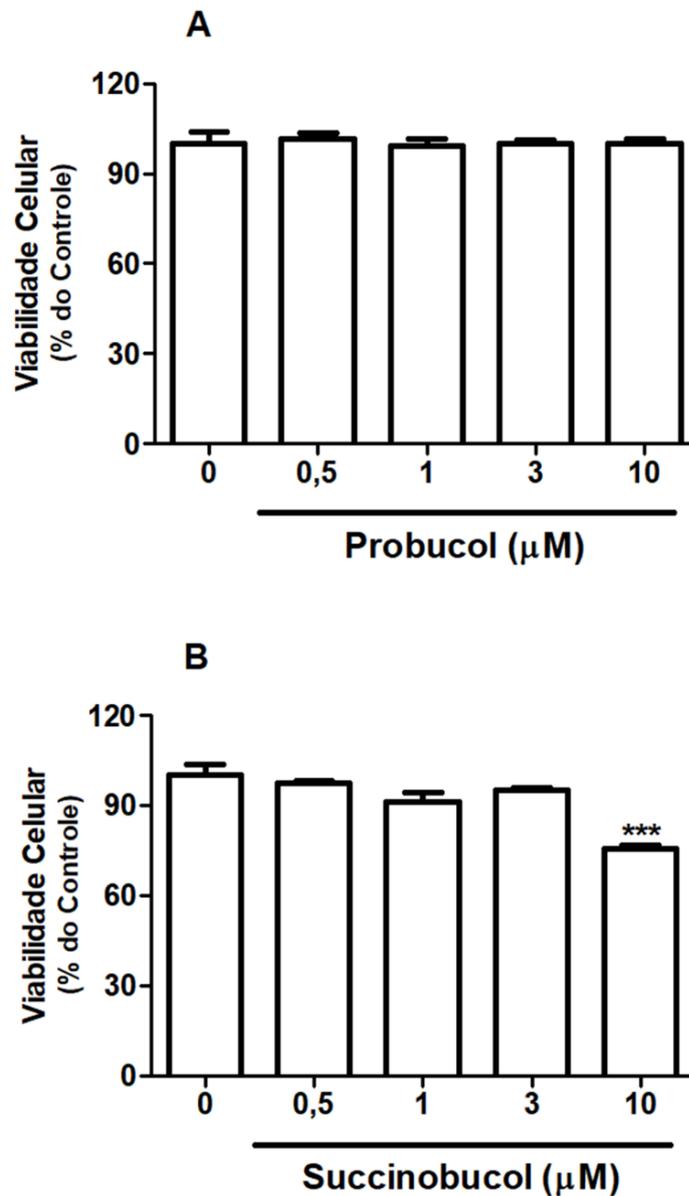
Primeiramente foi avaliada a viabilidade das células HEK 293 após o tratamento com os compostos antioxidantes probucol e succinobucol. O tratamento com o composto probucol durante 48 h, não causou alterações significativas na viabilidade celular, em nenhuma das concentrações testadas (Figura 8A). Por outro lado, foi observada uma redução de aproximadamente 25% na viabilidade das células tratadas com o composto succinobucol na concentração de 10 μM ($p < 0,001$; Figura 8B). A partir destes resultados, estabeleceu-se então as concentrações de 10 μM para o probucol e 3 μM para o succinobucol, as quais não demonstraram efeitos citotóxicos no ensaio de viabilidade celular, para serem utilizadas nos ensaios posteriores.

5.2 TOXICIDADE DA CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293

Em seguida, investigou-se o efeito da cisplatina nas células HEK 293. Para este experimento, as células foram expostas à cisplatina, em concentrações crescentes durante 24 h. O tratamento com cisplatina causou uma redução significativa na viabilidade celular apenas na concentração de 200 μM ($p < 0,001$; Figura 9A). Essa redução observada na viabilidade celular foi em torno de 30 % em relação ao grupo controle. Os resultados observados estão de acordo com outros dados observados na literatura, onde também houve uma diminuição da viabilidade celular após exposição a cisplatina.

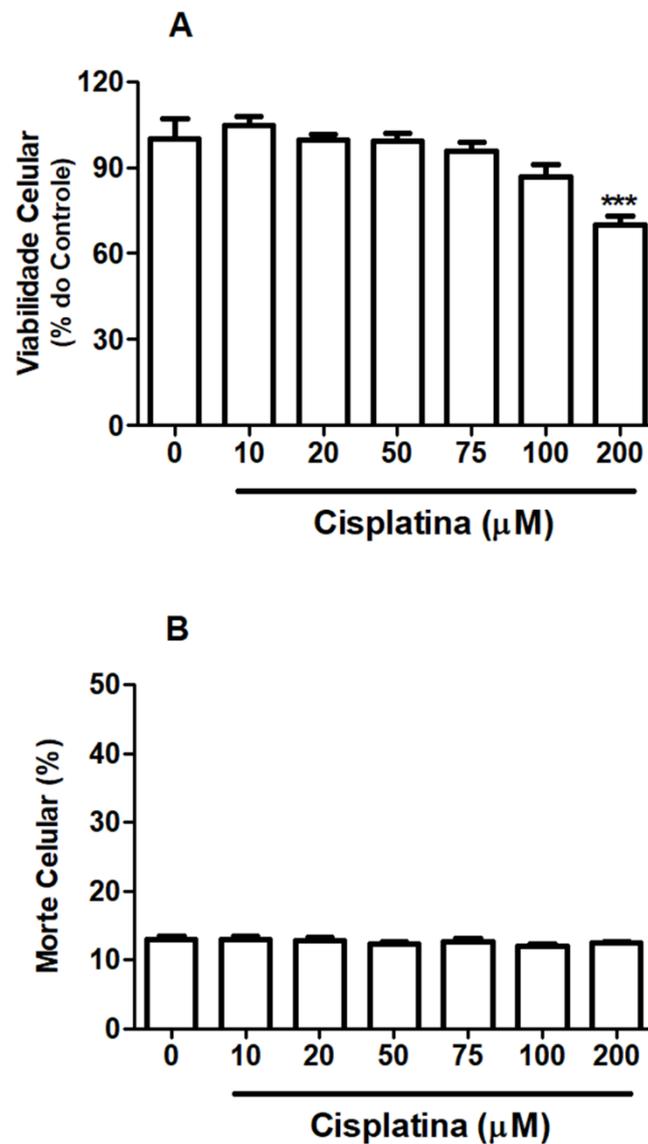
Avaliou-se também a morte celular através do ensaio de incorporação do iodeto de propídio (IP) para as mesmas condições celulares e não foi observada nenhuma alteração significativa nas concentrações utilizadas (Figura 9B).

Figura 8 –Efeitos do tratamento com os compostos probucol e succinobucol na viabilidade de células HEK 293



Legenda: As células foram tratadas com concentrações crescentes dos compostos probucol (A) e succinobucol (B) por 48 h. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam médias \pm EPM de 4 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ indica diferença estatística em relação ao grupo controle através de análise de variância de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Figura 9 – Efeitos da exposição à cisplatina sobre a viabilidade e morte celular em células HEK 293



Legenda: As células foram tratadas com concentrações crescentes de cisplatina durante 24 h. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT (A) e a morte celular através do ensaio de incorporação do iodeto de propídio (B). Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam médias \pm EPM de 6 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ indica diferença estatística em relação ao grupo controle através de análise de variância de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

O IP é um composto fluorescente que somente é capaz de entrar nas células quando houver rompimento de membrana plasmática. Desta forma, este corante somente marca células que apresentem alterações na permeabilidade na membrana, o que corresponde com os estágios finais do processo de apoptose ou na morte

celular por necrose. No presente estudo, não foi observado nenhum efeito na incorporação do IP nas células expostas à cisplatina, mesmo na concentração de 200 μM , a qual foi capaz de induzir uma redução significativa na viabilidade celular (Figura 9A).

Este resultado pode estar relacionado a alguns fatores como o tempo de incubação com cisplatina nas células HEK 293, que pode não ter sido suficiente para induzir morte celular. Desta forma, podemos concluir que a exposição das células HEK 293 à cisplatina durante 24 h compromete a viabilidade celular, porém sem afetar a integridade da membrana celular. Entretanto, não se pode descartar que potenciais vias de morte por mecanismos de apoptose podem ter sido ativas após o tratamento com cisplatina. Em um ensaio descrito por Zhang e colaboradores, foi relatado que em uma concentração de 50 μM de cisplatina, as células HEK 293 apresentaram aumento no percentual de apoptose comparado com o grupo controle (ZHANG et al, 2005). Assim como Cummings e colaboradores demonstraram, em outras linhagens celulares, que há um aumento significativo de morte celular por apoptose induzida pelo tratamento com cisplatina (CUMMINGS et al, 2003).

Dados na literatura mostram que a cisplatina induz morte celular tanto por mecanismos de necrose quanto por apoptose. O que parece determinar o tipo de morte é a concentração ou dose utilizada. Em um estudo realizado por Lierberthal e colaboradores, a exposição de culturas primárias de células tubulares proximais de camundongo a uma concentração alta de cisplatina (800 μM) induziu morte celular por necrose, enquanto que em baixas concentrações (8 μM), foi observada morte celular através de mecanismos de apoptose (LIEBERTHAL et al, 1996).

Duas vias de apoptose estão relacionadas à toxicidade da cisplatina no tecido renal, a intrínseca e a extrínseca. A primeira, envolve organelas celulares como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático e a segunda, também conhecida como via do receptor de morte celular, envolvendo a ativação de receptores de morte celular. Ambas as vias são responsáveis pela ativação de proteínas caspases, culminado com a morte das células. Podemos destacar a via intrínseca, relacionada à mitocôndria, como principal responsável pela morte de células renais causada por cisplatina. A exposição à sinais de morte celular modifica as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, gerando uma alteração na membrana da mitocôndria o que libera fatores apoptogênicos, como o citocromo c e o fator de indução de apoptose (AIF), culminando com ativação de caspases e conseqüentemente a morte celular. Outros

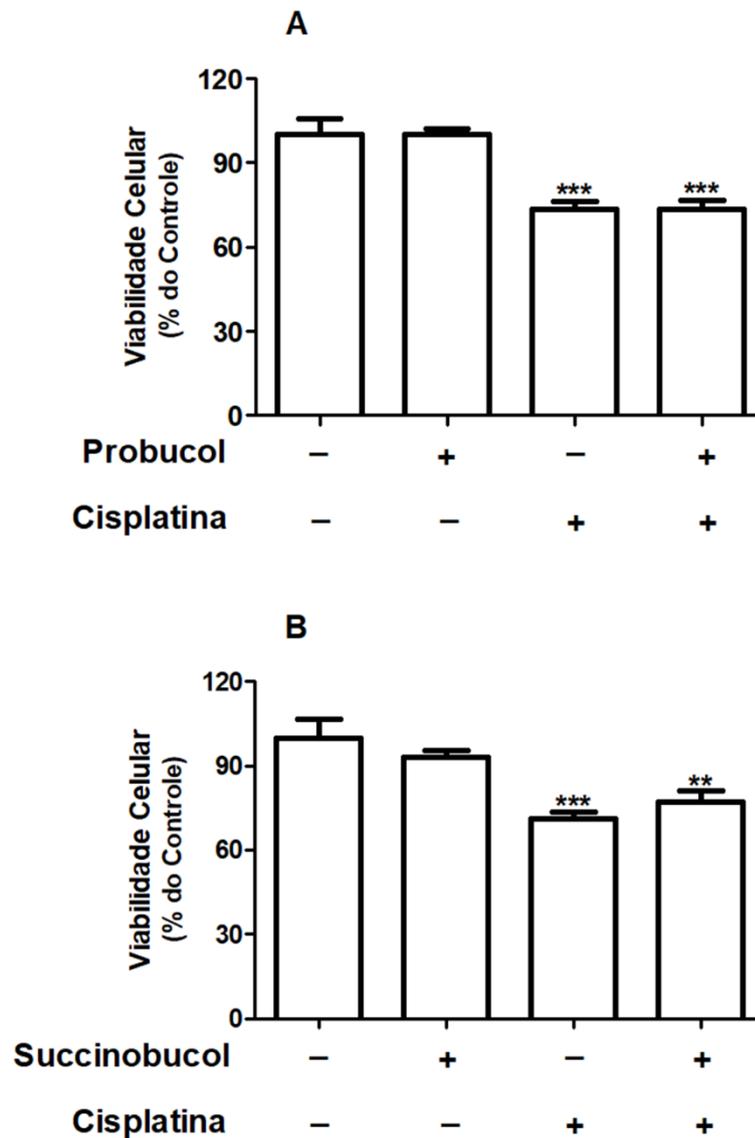
fatores também parecem estar envolvidos na indução de apoptose por cisplatina como a ativação de transdutores de sinais como proteínas cinases (MAPKs) e fatores de transcrição (NF- κ B e p53), sendo a p53, um fator crítico para indução de apoptose. Sua ativação representa o início do processo de apoptose em células renais, pois promove a ativação da caspase-2 e a liberação de AIF mitocondrial (PERES et al, 2013).

Em nosso estudo não avaliamos parâmetros de morte celular por apoptose após exposição à cisplatina e, portanto, mais estudos são necessários para melhor elucidar os mecanismos de toxicidade da cisplatina em células HEK 293.

5.3 EFEITOS DO PROBUCOL E SUCCINOBUCOL NA TOXICIDADE INDUZIDA POR CISPLATINA EM CÉLULAS HEK 293

Tendo em vista os resultados obtidos anteriormente, investigou-se o possível efeito protetor do probucol e do succinobucol na toxicidade induzida por cisplatina. Nestes experimentos as células foram pré-tratadas com probucol e succinobucol durante 24 h e, posteriormente expostas à cisplatina. O ensaio de viabilidade celular foi realizado após 24 h de exposição à cisplatina. Na figura 10A podemos observar que a cisplatina induziu uma redução significativa na viabilidade celular [$F(1,20) = 53,161, p < 0,001$], porém o pré-tratamento com o composto probucol não foi capaz de proteger as células contra o efeito citotóxico induzido pela cisplatina [$F(1,20) = 0,003, p = 0,9565$]. De maneira semelhante, na Figura 10B, o tratamento com cisplatina reduziu a viabilidade celular [$F(1,20) = 29,035, p < 0,001$] e o pré-tratamento com o succinobucol também não foi efetivo em proteger as células frente à redução da viabilidade induzida pela cisplatina [$F(1,20) = 0,003, p = 0,9565$].

Figura 10 – Efeito dos compostos probucol e succinobucol na redução da viabilidade celular induzida por cisplatina.



Legenda: As células foram pré-tratadas com 10 μM de probucol (A) e 3 μM de succinobucol (B) durante 24h e posteriormente expostas a 200 μM de cisplatina. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de redução do MTT. Os resultados são expressos em porcentagem do controle. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados representam médias \pm EPM de 6 experimentos independentes. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferença estatística em relação ao grupo controle através de análise de variância de duas vias, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

Diversas evidências na literatura apontam para o potencial efeito protetor dos compostos probucol e succinobucol em diferentes modelos de patologias (SUNDELL et al, 2003; TARDIF et al, 2008; SANTOS et al, 2012; RIBEIRO et al, 2013; COLLE et al, 2013; COLLE et al, 2016; SANTOS et al, 2017). Entretanto, no presente estudo, os

compostos não foram capazes de proteger as células HEK 293 da toxicidade induzida por cisplatina. A falta de um efeito protetor em nosso protocolo experimental pode ser devido ao tempo de pré-tratamento com os compostos utilizado no presente estudo (24 horas).

Em um estudo recente, o succinobucol demonstrou um efeito protetor em células SH-SY5Y frente a toxicidade induzida pelo ácido 3-nitropropiónico (um modelo de doença de Huntington) e tal efeito foi somente observado após o pré-tratamento com succinobucol na concentração de 3 μM durante 6 dias (COLLE et al., 2016). O efeito protetor do composto foi atribuído à ativação da enzima GCL e aumento da síntese de GSH, o que ocorreu após 6 dias de tratamento com o succinobucol (COLLE et al, 2016). Além disso, dados ainda não publicados do nosso grupo mostraram que o pré-tratamento com probucol (10 μM) durante 6 dias protegeu da toxicidade induzida por peróxidos em células SH-SY5Y, o que foi correlacionado à ativação da enzima glutathione peroxidase 1 (GPx1) induzida pelo probucol (SANTOS et al., 2019, no prelo). As glutathione peroxidases representam uma importante classe de enzimas antioxidantes que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio ou dos hidroperóxidos orgânicos às custas da glutathione reduzida (URSINI et al, 1995).

O efeito do probucol em aumentar a atividade da GPx foi também observado em um estudo *in vivo* em ratos, onde o tratamento com o composto por 2 meses aumentou a atividade da GPx o que conferiu proteção frente ao estresse oxidativo e disfunção mitocondrial induzidos pelo ácido 3-nitropropiónico em um modelo de doença de Huntington (COLLE et al., 2013a).

Em conjunto, esses dados mostram que os compostos probucol e succinobucol possuem um potencial efeito benéfico terapêutico, o qual foi correlacionado com a ativação de defesas antioxidantes celulares (aumento da atividade da GPx e aumento nos níveis de GSH, respectivamente) (COLLE et al, 2016; COLLE et al 2013). Esses efeitos somente foram observados após tratamentos prolongados com os compostos. Além desses efeitos, tanto o probucol como o succinobucol apresentam atividade antioxidante direta, agindo como *scavengers* de espécies reativas, ou seja, são capazes de neutralizar as espécies reativas diretamente. Dados da literatura mostram que a cisplatina induz estresse oxidativo através da geração de EROs e, neste caso, compostos com atividade *scavenger* podem representar uma importante estratégia para conter o estresse oxidativo (KRUIDERING et al, 1997; PABLA et al, 2007; MANOHAR et al, 2018). Entretanto, em nosso modelo experimental, nem mesmo uma

possível atividade *scavenger* dos compostos foi capaz de proteger contra a toxicidade da cisplatina. Assim, mais estudos são necessários para melhor compreender tanto os mecanismos de toxicidade da cisplatina nas células HEK 293 quanto o papel dos compostos probucol e succinobucol como estratégias de proteção.

6.CONCLUSÃO

A toxicidade renal da cisplatina é um importante fator limitante na terapia contra o câncer em pacientes que utilizam este fármaco. Os antioxidantes têm sido extensivamente estudados como estratégias de proteção na nefrotoxicidade induzida pela cisplatina, entre eles estão melatonina, dimetiluréia (DMTU), N-acetilcisteína, vitaminas, entre outros (SENER et al, 2000; TSURUYA et al, 2003; DICKEY et al, 2005; APPENROTH et al, 1997). Atualmente, o único composto autorizado pelo FDA para este uso é a Amifostina, um composto citoprotetor (HENSLEY et al, 2009).

Neste estudo buscamos avaliar o efeito protetor dos compostos probucol e succinobucol frente à toxicidade induzida por cisplatina em células HEK 293. A exposição das células HEK 293 à cisplatina causou redução na viabilidade celular, porém os compostos probucol e succinobucol não foram capazes de proteger contra essa diminuição na viabilidade induzida pelo agente antineoplásico cisplatina. Tal resultado pode ser justificado pelo tempo de pré-tratamento das células com os compostos, que comparado com outros estudos que demonstraram o potencial efeito benéfico dos mesmos (COLLE et al, 2016; SANTOS et al, 2016), foi menor em nosso estudo.

Tendo em vista que existe a necessidade de efetivos agentes protetores capazes de reduzir o efeito tóxico da cisplatina sobre o tecido renal, mais estudos são necessários, utilizando tempos maiores de pré-tratamento com os compostos. Além disso, estudos adicionais são também importantes para melhor entender o mecanismo de toxicidade da cisplatina em células HEK 293, além do potencial mecanismo de proteção dos compostos.

REFERÊNCIAS

- ALI, S.F., et al. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. **Neurotoxicology** 3, 637-648. 1992.
- APPENROTH, D., et al. Protective effects of vitamin E and C on cisplatin nephrotoxicity in developing rats. **Arch Toxicol** 1997. 71: 677.
- ARANY I., SAFIRSTEIN R.L. Cisplatin nephrotoxicity. **Semin Nephrol** 2003; 23:460–464
- BALIGA, R.; et al. Role of cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Kidney International**, vol. 54, no 5, pp 1562-1569. 1998.
- BINDOKAS, VP; Jordan, J; Lee, CC. et al. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. **J Neurosci**, 16:1324-1336, 1996.
- CIARIMBOLI G, et al. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. **Am J Pathol** 2005; 167: 1477–1484.
- CIARIMBOLI G., et al. Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions. **Am J Pathol**. 2010 Mar;176(3):1169-80.
- COLLE D., et al. Probucol increases striatal glutathione peroxidase activity and protects against 3-nitropropionic acid-induced pro-oxidative damage in rats. **PLoS One**. 2013. (a)
- COLLE D., et al., Succinobucol, a Lipid-Lowering Drug, Protects Against 3-Nitropropionic Acid-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Cells via Upregulation of Glutathione Levels and Glutamate Cysteine Ligase Activity. **Mol Neurobiol**. 2016.
- COLLE D., et al. Succinobucol versus probucol: higher efficiency of succinobucol in mitigating 3-NP-induced brain mitochondrial dysfunction and oxidative stress in vitro. **Mitochondrion** 13:125–33. 2013.
- CRIM W.S., et al. AGI-1067, a novel antioxidant and antiinflammatory agent, enhances insulin release and protects mouse islets. **Mol Cell Endocrinol**, 323(2): 246-55, 2010.
- Cummings, B. S. Role of an Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-Independent phospholipase A2 in Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis. **Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, 2003. 308, 921–928
- DICKEY, T. D., et al. Neuwelt Protection against Cisplatin-Induced Toxicities by N-Acetylcysteine and Sodium Thiosulfate as Assessed at the Molecular, Cellular, and in

Vivo Levels. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2005, 314 (3) 1052-1058.

ELLMAN, G.L., et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem Pharmacol** 7, 88-95. 1961.

FARINA M., et al. ProbucoI increases glutathione peroxidase-1 activity and displays long-lasting protection against methylmercury toxicity in cerebellar granule cells. **Toxicol Sci**, 112(2): 416-26, 2009

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 2015. ISSN 1097-0215.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, **Vaccines and related biological products advisory committee – meeting**, 16 de maio de 2001. p. 81. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/transcripts/3750t1_01.pdf>. Acesso em 13 de abril de 2019.

GOMEZ F.J. C., et al. Cisplatin nephrotoxicity: symptomatic hypomagnesemia and renal failure. **Int J Pediatr Nephrol** 1986; 7: 151–152.

GONZALES-VITALE J.C., et al. The renal pathology in clinical trials of cis-platinum (II) diamminedichloride. **Cancer** 1977; 39:1362–1371.

GORDON, J. A.; GATTONE, V. H. Mitochondrial alterations in cisplatin-induced acute renal failure. **Am. J. Physiol., Bethesda**, v.250, n. 6, p. F991-98, 1986.

HAIBIN Y; YAN Y; JINJIN D. **Preparation of probucoI monosuccinate**. Patent No CN 1970536, 2006.

HARTMANN, A. E. Nitrogen metabolites and renal function. In: MACCLATCHEY, K.D. Clinical laboratory medicine. **Baltimore: Williams & Wilkins**, 1994. cap.16, p.371-85.

HAN, X.; YUE, J.; CHESNEY, R. W. Functional TauT protects against acute kidney injury. **J Am Soc Nephrol**, v. 20, n. 6, p. 1323-32, Jun 2009. ISSN 1533-3450. =

HANIGAN, M. H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. **Cancer Ther**, v. 1, p. 47-61, 2003. ISSN 1543-9135. =

HENSLEY, M.L., et al. American Society of Clinical Oncology 2008 clinical practice guideline update: use of chemotherapy and radiation therapy protectants. **J. Clin. Oncol.** 27, 127–145. 2009

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

HSU, C. Y. et al. Community-based incidence of acute renal failure. **Kidney Int**, v. 72, n. 2, p. 208-12, Jul 2007. ISSN 0085-2538.

HOYERT, D. L.; XU, J. Deaths: preliminary data for 2011. **Natl Vital Stat Rep**, v. 61, n. 6, p. 1-51, Oct 2012. ISSN 1551-8922.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 30 de abril de 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa da incidência de câncer no Brasil em 2018**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>>. Acesso em 30 de abril de 2019.

KUMAR, V.; ABBAS, A., ASTER, J. **Robbins Patologia Básica**. 10 ed. Cap 6. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018

KRUIDERING M, et al. Cisplatin-induced nephrotoxicity in porcine proximal tubular cells: mitochondrial dysfunction by inhibition of complexes I to IV of the respiratory chain. **J Pharmacol Exp Ther** 1997; 280: 638–649.

LIEBERTHAL, W.; TRIACA, V.; LEVINE, J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. **Am J Physiol**, v. 270, n. 4 Pt 2, p. F700-8, Apr 1996. ISSN 0002-9513.

LIU H., BALIGA R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. **Kidney Int** 2003; 63: 1687–1696.

LUDWIG T. et al. Nephrotoxicity of platinum complexes is related to basolateral organic cation transport. **Kidney Int** 2004; 66: 196–202.

LUYENDYK JP; A novel class of antioxidants inhibit LPS induction of tissue factor by selective inhibition of the activation of ASK1 and MAP kinases. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 27(8): 1857-63, 2007.

MANOHAR, S.; LEUNG, N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. **J Nephrol**, v. 31, n. 1, p. 15-25, 02 2018. ISSN 1724-6059.

MA X., et al. Probucol Protects Against Contrast-Induced Acute Kidney Injury via the Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2 (ERK1/2)/JNK-Caspase 3 Pathway in Diabetic Rats. **Med Sci Monit**. 2019; 25:1038–1045. 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 63, 65-55. 1983.

MOSTAFA, I.; MANSOUR, S.; BADRELDIN, H. Effect of Curcumin on Cisplatin- and Oxaliplatin-Induced Oxidative Stress in Human Embryonic Kidney (HEK) 293 Cells, **Renal Failure**, 33:5, 518-523. 2011.

MUNDT, L.A., SHANAHAN K. **Exame de Urina e de Fluidos Corporais de Graff**. 2ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2011

NAZIROGLU, M.; KARAOGLU, A.; AKSOY, O. Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats **Toxicology**, 195. 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Câncer. Disponível em - <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em agosto, 2019.

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney Int**, v. 73, n. 9, p. 994-1007, May 2008. ISSN 1523-1755.

PERES, L. A. B.; CUNHA JUNIOR, A. D. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: mecanismos moleculares. **J. Bras. Nefrol.**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 332-340. 2013.

PETO, J. Cancer epidemiology in the last century and the next decade. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 390-5, May 2001. ISSN 0028-0836.

PFUETZE KD, DUJOVNE CA. Probuco. **Curr Atheroscler Rep**. 2000; 2: 47- 57. 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 8ª ed. Cap. 50. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016

RIBEIRO R.P., et al. Probuco. affords neuroprotection in a 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease. **Neurochem Res**. 2013.

ROSA, R., C. SANFELIU, et al. The mechanism for hexachlorocyclohexane-induced cytotoxicity and changes in intracellular Ca²⁺ homeostasis in cultured cerebellar granule neurons is different for the gamma- and delta-isomers. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.142, n.1, Jan, p.31-9. 1997.

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

SAAD S.Y., AL-RIBAKI A. C. Protection effects of taurine supplementation against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Chemotherapy**, 48. 2002.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, P. D. LÓPEZ-HERNANDÉZ, F. J.; LÓPEZ-NOVOA, J. M.; MORALES, A. I. An integrative view of the pathophysiological events leading to cisplatin nephrotoxicity. **Crit Rev Toxicol**, v. 41, n. 10, p. 803-21, Nov 2011. ISSN 1547-6898.

SANTOS D. B., et al., Probuco. and Succinobuco. display similar lipid-lowering and antioxidant effects: a subacute/subchronic study in mice. **Revista Vitale** 28. 2016.

SANTOS D.B., et al. Probuco., a lipid-lowering drug, prevents cognitive and hippocampal synaptic impairments induced by amyloid β peptide in mice. **Exp Neurol**. 2012.

SANTOS D. B., et al. Succinobuco., a Non-Statin Hypocholesterolemic Drug, Prevents Premotor Symptoms and Nigrostriatal Neurodegeneration in an Experimental Model of Parkinson's Disease. **Mol Neurobiol**. 2017.

SANTOS, D.B., et al. On the mechanisms of probucol-induced increase of glutathione peroxidase activity. 2019. No prelo.

SANTOS, N; SANTOS, A. Efeito da cisplatina na função, stresse oxidativo e estado redox mitocondrial renal em ratos: efeito protetor da dimetiltiouréia. 2006.

Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60134/tde-22052007-091457/> >

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

SAWAYAMA Y, et al. Effects of probucol and pravastatin on common carotid atherosclerosis in patients with asymptomatic hypercholesterolemia. Fukuoka Atherosclerosis Trial (FAST). **J Am Coll Cardiol**, 39(4): 610-6, 2002.

ŞENER, G., et al. The protective effect of melatonin on cisplatin nephrotoxicity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 14: 553-560, 2000.

SHIMEDA Y., et al. Protective effects of capsaicin against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Biol Pharm Bull**, 28. 2005.

SCHNELLMANN, R. Toxic responses of the kidney. **Casarett and Doull's the Basic Science of Poisons**, 2008.

SUNDELL CL; et al. AGI-1067: a multifunctional phenolic antioxidant, lipid modulator, anti-inflammatory and antiatherosclerotic agent. **J Pharmacol Exp Ther**, 305(3): 1116-23, 2003.

TARDIF JC; et al. Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, 371(9626): 1761-8, 2008.

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

TSURUIA, K. et al. Antioxidant ameliorates cisplatin-induced renal tubular cell death through inhibition of death receptor-mediated pathways. **American journal of physiology. Renal physiology**. 285. 2003

URSINI F. et al. Diversity of glutathione peroxidases. **Methods in enzymology** 252:38-53, 1995.

YAMAMOTO A. A unique antilipidemic drug--probucol. **J Atheroscler Thromb**, 15(6): 304-5, 2008.

YAMASHITA S, et al. Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events: a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan. **J Atheroscler Thromb**, 15(6): 292-303, 2008.

YAMASHITA S; MATSUZAWA Y. Where are we with probucol: a new life for an old drug? **Atherosclerosis**, 207(1): 16-23. 2009.

YANG S, et al. ProbucoI ameliorates renal injury in diabetic nephropathy by inhibiting the expression of the redox enzyme p66Shc. **Redox Biol.** 2017.

YANG H, et al. The Protective Effects of Sika Deer Antler Protein on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. **Cell Physiol Biochem** 2017; 43:395-404.

YU, L.; et al. Insuficiência Renal Aguda. **Braz. J. Nephrol.** (J. Bras. Nefrol.) 2007.

WEINGARTEN D. **Process of preparing esters and ethers of probucoI and derivatives thereof**, Patent WO2004062622. 2004.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Number of deaths (World) by cause. Global health observatory data repositon.** Disponível em: <https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/>. Acesso em: 30 de abril de 2019

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

ZHANG, L., PETERSON, B. L., CUMMINGS, B. S. The effect of inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A2 on chemotherapeutic-induced death and phospholipid profiles in renal cells. **Biochemical Pharmacology**, 70(11), 1697–1706. (2005).