RUTINA PROTEGE O TECIDO ADIPOSO CONTRA O DANO OXIDATIVO NA TERAPIA DO CÂNCER COM DOXORRUBICINA

Genômica Brasil, 1ª edição, de 10/04/2021 a 11/04/2021
ISBN dos Anais: 978-65-89908-01-2

FREITAS; Paula Alexandre de [1], LANDIM; Raquel Cristina de Sousa Lima [2], MAGALHÃES; Laryssa Alves [3], OLIVEIRA; Keciany Alves de [4], OLIVEIRA; Ariclécio Cunha de [5]

RESUMO

RESUMO

Introdução: A doxorrubicina (DX) é uma droga quimioterápica amplamente utilizada por pacientes com câncer, entretanto promove efeitos colaterais deletérios em tecidos não tumorais, como o tecido adiposo. A terapia com DX tem sido associada a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, causando um desequilíbrio redox. O tratamento com fitoterápico com efeito antioxidante, como a rutina, pode ser benéfico na redução dos efeitos adversos dessa droga. **Objetivo:** verificar o efeito da rutina na adiposidade e homeostase redox do tecido adiposo de camundongos tratados com doxorrubicina. **Método:** Camundongos Swiss machos foram divididos em três grupos: o grupo controle(CT); o grupo doxorrubicina (DX), no qual os camundongos receberam cloridrato de DX (2,5 mg/kg peso corporal)por via intraperitoneal (i.p.), duas vezes por semana durante 2 semanas, e o grupo RT (DX + rutina), no qual camundongos foram tratados com DX e rutina, sendo essa administrada diariamente, por via oral (gavagem) (10 mg / kg de peso corporal).O consumo alimentar e o peso corporal foram avaliados semanalmente. Ao final do tratamento, os camundongos foram eutanasiados e coletado os coxins do tecido adiposo (subcutâneo, periepididimal e retroperitoneal), sendo pesados e armazenados a $-80^{\circ}C$ para avaliação do dano oxidativo e da atividade da enzima antioxidante catalase. **Resultados:**O tratamento por 2 semanas com DX e rutina não gerou redução de peso corporal ou da ingestão de alimentos. No entanto, o tratamento com rutina atenuou a perda de tecido adiposo causada pela terapia com a DX nos tecidos (CT x DX x RT) subcutâneo (0,9367 x 0,2998 x 0,7161g), retroperitoneal (0,05683 x 0,0160 x 0,01978g) e periepididimal (0,3682 x 0,1506 x 0,2623g),apresentando seu efeito protetor contra a ação deletéria da DX na massa gorda. E esses animais apresentaram ainda um dano oxidativo menor quando comparado aos animais que receberam apenas o quimioterápico, observado pelo aumento do tiol(47,90 versus 35,78mmol de DTNB reduzido/mg de proteína) e uma melhora da defesa antioxidante com aumento da atividade da catalase no tecido subcutâneo (237,3 *versus* 168,9 U CAT/mg de proteína), demonstrando o efeito antioxidante desse fitoterápico. **Conclusão:** Esses resultados indicam que a rutina é capaz de reduzir o dano oxidativo no tecido adiposo induzido pela DX, porém estudos que avaliem os mecanismos moleculares da regulação gênica da rutina no tecido adiposo são necessários a fim de

[1] Universidade Estadual do Ceará, paulaalexandref@gmail.com
[2] Universidade Estadual do Ceará, raquelnut@gmail.com
[3] Universidade Estadual do Ceará, laryssa.alves@aluno.uece.br
[4] Universidade Estadual do Ceará, keciany.oliveira@uece.br
[5] Universidade Estadual do Ceará, ariclecio@hotmail.com

esclarecer seu papel como protetor na terapia quimioterápica com DX.

Palavras-chave: Desequilibrio redox; Doxorrubicina;Fitoterápico ;Rutina;Tecido adiposo.

ABSTRACT

Introduction: Doxorubicin (DX) is a chemotherapeutic drug widely used by cancer patients, however it promotes deleterious side effects in non-tumoral tissues, such as adipose tissue. DX therapy has been associated with increased production of reactive oxygen species, causing a redox imbalance. Treatment with herbal medicine with an antioxidant effect, such as rutin, can be beneficial in reducing the adverse effects of this drug. Objective: to verify the effect of rutin on adiposity and redox homeostasis of adipose tissue in mice treated with doxorubicin. Method: Male Swiss mice were divided into three groups: the control group (CT); the doxorubicin group (DX), in which the mice received DX hydrochloride (2.5 mg / kg body weight) intraperitoneally (ip), twice a week for 2 weeks, and the RT group (DX + rutin), in which mice were treated with DX and rutin, which was administered daily, orally (gavage) (10 mg / kg body weight). Food consumption and body weight were assessed weekly. At the end of the treatment, the mice were euthanized and the adipose tissue cushions (subcutaneous, periepididimal and retroperitoneal) were collected, weighed and stored at −80◦C to assess oxidative damage and the activity of the catalase antioxidant enzyme. Results: Treatment for 2 weeks with DX and rutin did not result in a reduction in body weight or food intake. However, treatment with rutin attenuated the loss of adipose tissue caused by DX therapy in subcutaneous tissue (CT x DX x RT) (0.9367 x 0.2998 x 0.7161g), retroperitoneal (0.05683 x 0 , 0160 x 0.01978g) and periepididymal (0.3682 x 0.1506 x 0.2623g), presenting its protective effect against the deleterious action of DX in the fat mass. And these animals also showed less oxidative damage when compared to animals that received only the chemotherapy, observed by the increase in thiol (47.90 versus 35.78mmol of reduced DTNB / mg of protein) and an improvement in antioxidant defense with increased activity of catalase in subcutaneous tissue (237.3 versus 168.9 U CAT / mg protein), demonstrating the antioxidant effect of this herbal medicine. Conclusion: These results indicate that rutin is able to reduce the oxidative damage in adipose tissue induced by DX, however studies that evaluate the molecular mechanisms of gene regulation of rutin in adipose tissue are necessary in order to clarify its role as a protector in chemotherapy. with DX.

Keywords: Redox imbalance; Doxorubicin; Phytotherapic; Rutin; Adipose tissue.

INTRODUÇÃO

O câncer é apontado como a segunda principal causa de morte no mundo, com uma incidência global de 18,1 milhões de casos e 9,6 milhões de mortes em 2018 (ZHANG et al.,2016, IARC, 2018). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INC, 2015) estima um total de 600 mil novos casos de câncer por ano, demonstrando ainda que, nas próximas décadas o número será maior.

[1] Universidade Estadual do Ceará, paulaalexandref@gmail.com
[2] Universidade Estadual do Ceará, raquelnut@gmail.com
[3] Universidade Estadual do Ceará, laryssa.alves@aluno.uece.br
[4] Universidade Estadual do Ceará, keciany.oliveira@uece.br
[5] Universidade Estadual do Ceará, ariclecio@hotmail.com

Embora um diagnóstico precoce e tratamentos como quimioterapias, cirurgias e radiações tenham aumentado a expectativa de vida desses pacientes, ainda são muitos seus efeitos adversos, pois as drogas antineoplásicas não atuam somente nas células tumorais, mas também geram efeitos colaterais em diversos órgãos. Entre as diferentes drogas utilizadas por esses pacientes, doxorrubicina(DX), uma droga intravenosa, tem se destacado, devido sua eficácia no tratamento, entretanto, seu uso é limitado devido sua grande toxicidade (INC, 2015).

Enquanto grande parte da literatura investiga o efeito da DX sobre o tecido cardíaco, poucos são os estudos que investigam seu efeito sobre o metabolismo e as alterações moleculares nos adipócitos e no tecido adiposo. Esse tecido tem um papel fundamental para manter a homeostasia energética e endócrina do organismo e a manutenção da sua massa e das suas funções está correlacionada positivamente com a expectativa e qualidade de vida em pacientes com câncer (BING, 2011).

Embora o mecanismo de ação da DX na geração da cardiotoxicidade não tenha sido totalmente esclarecido, vários estudos demonstraram está associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)(MINOTTI et al., 2004; FAN et al., 2008; MUKHOPADHYAYet al., 2009). Portanto, a descoberta de co-terapias, que atuem no controle desse efeito oxidante, pode apresentar efeitos benéficos na vida desses pacientes.

Nesse contexto, a rutina se destaca, por ser um flavanoide com diversos efeitos, como antiglicêmicos (PRESTA; PEREIRA, 1987), antilipidêmicos (BARBOSA *et* al.,2010), analgésico e anti-inflamatório (CASTILHO et al.,2011), protetor contra danos ao DNA e antioxidante (PRESTA; FONSECA; BERNARDO-FILHO, 2007). Além disso, MA e colaboradores (2017),demonstraram que a rutina tem um papel protetor na disfunção cardíaca induzida pela DX em cardiomiócitos de camundongos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito da rutina na adiposidade e homeostase redox do tecido adiposo de camundongos tratados com DX.

METODOLOGIA

ANIMAIS E TRATAMENTO

Todos os procedimentos experimentais realizados estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará (processo número 05198059/2019).

Foram utilizados camundongos Swiss machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os camundongos foram mantidos no biotério de experimentação do Instituto Superior de Ciências Biomédicas em caixas coletivas (46 x 24 x 20 cm, com 3 - 4 animais/caixa), sob condições de temperatura ambiental controlada de 25 ºC, ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas (período claro iniciado às 6:00h) e exaustão de amônia controlada. Os animais foram alimentados com dieta padrão (Presence®) e receberam água ‘ad libitum’.

Durante o experimento, foi realizado semanalmente o acompanhamento do peso e consumo alimentar dos animais, e as dosagens dos tratamentos foram ajustadas conforme evolução do peso.

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em três grupos: grupo controle saudável(CT), o grupo doxorrubicina (DX), no qual os camundongos receberam cloridrato de doxorrubicina na dose de 2,5 mg / kg peso corporal intraperitoneal (i.p.) duas vezes por semana durante 2 semanas (dias 1 , 4, 8 e 11, sempre ás 9hs), conforme proposto por Biondo e colaboradores (2018), e grupo RT (DX + rutina), no qual camundongos além de receberem a doxorrubicina i.p., receberam a rutina dissolvida em salina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) diariamente (a cada 24hs) por via oral (gavagem), na dose de 10 mg / kg de peso.

Após 24 horas da última dose de rutina, os camundongos foram eutanasiados e foi coletado os coxins do tecido adiposo (subcutâneo, periepididimal e retroperitoneal), pesados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

[1] Universidade Estadual do Ceará, paulaalexandref@gmail.com
[2] Universidade Estadual do Ceará, raquelnut@gmail.com
[3] Universidade Estadual do Ceará, laryssa.alves@aluno.uece.br
[4] Universidade Estadual do Ceará, keciany.oliveira@uece.br
[5] Universidade Estadual do Ceará, ariclecio@hotmail.com

DOSAGENS NO TECIDO ADIPOSO

Preparo do homogenato

Amostras de 400 mg do tecido subcutâneo, foram homogeneizadas em 1000 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, NaCl 0,9 % (p/v), pH 7.4, utilizando-se ohomogeneizador ultra-turrax (Jamke&Kunkel IKA – Labortechnik Alemanha). Os homogenatos foram centrifugados por 30 minutos na velocidade de 720 g a 4ºC e o sobrenadante utilizado para as análises de tiol e catalase.

Quantificação de grupamentos tióis

A quantificação de grupamentos tiol livre nos tecidos foi determinada usando reagente ácido dithionitrobenzóico (DTNB) em espectrofotômetro (Hitachi U-3300). O tiol reage com o DTNB clivando o disulfeto ligado à molécula, levando à formação de 2-nitro-5-benzoato (NTB-), que se ioniza a NTB2- em meio aquoso em pH neutro ou alcalino. O NTB2- foi quantificado em espectrofotômetro utilizando a absorbância da luz visível a 412 nm.

Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT) foi mensurada por meio do desaparecimento do peróxido de hidrogênio (H2O2), formando água e oxigênio. O experimento consistiu em avaliar a diminuição da absorção de luz em 240nm do meio de reação (tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7.0, triton X-100 0,002%, EDTA 0,1mM, peróxido de hidrogênio 15mM, com volume final da reação de 1mL) durante 1 minuto. Foi adicionado 100 µg de proteína e a absorção de luz foi acompanhada por 2 min. A atividade da CAT foi obtida por meio da diferença entre a taxa de diminuição da absorbância com e sem homogenato, sendo calculada por meio da quantidade de H2O2 consumido por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar do H2O2 (43,6M-1). A atividade da enzima foi expressa em unidades por miligrama de proteína (U.mg-1). Uma unidade representou 1 micromol de H2O2 consumido por minuto.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Resultados foram expressos como media ± SEM. O teste one-way ANOVA seguido por pós-teste de Bonferroni foi adotado. Diferenças foram consideradas significantes quando $p<0.05$. As análises foram realizadas usando o software estatístico GraphPad Prism versão 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O tratamento por 2 semanas com doxorrubicina e rutina não gerou redução de peso corporal ou da ingestão de alimentos nos camundongos. No entanto, o tratamento com a DX reduziu a adiposidade dos animais, constatada pela diminuição do peso dos tecidos (CT x DX x RT) subcutâneo (0,9367 x 0,2998 x 0,7161g), retroperitoneal (0,05683 x 0,0160 x 0,01978g) e

[1] Universidade Estadual do Ceará, paulaalexandref@gmail.com
[2] Universidade Estadual do Ceará, raquelnut@gmail.com
[3] Universidade Estadual do Ceará, laryssa.alves@aluno.uece.br
[4] Universidade Estadual do Ceará, keciany.oliveira@uece.br
[5] Universidade Estadual do Ceará, ariclecio@hotmail.com

periepididimal (0,3682 x 0,1506 x 0,2623g). E foi observado que a rutina foi eficiente na redução dessa perda, demonstrando seu efeito protetor contra a ação deletéria da DX na massa gorda desses animais.

A redução de massa gorda em pacientes neoplásicos está associada a caquexia e mau prognostico desses pacientes. Pois, o tecido adiposo é um importante órgão endócrino, capaz de sintetizar, armazenar e liberar adipocinas, tendo um papel fundamental na homeostase sistêmica(GRADINARU et al.,2017; JOKINEN et al.,2017).

Além disso, a manutenção do tecido adiposo e das suas funções está correlacionada positivamente com a expectativa e qualidade de vida em pacientes com câncer (BING, 2011).

Corroborando com nossos achados, Biondo e colaboradores (2016) também demonstraram efeitos deletérios da DX em células adiposas, que além de reduzir o tecido adiposo de ratos tratados com uma única dose de DX, também diminuiu a viabilidade dos adipócitos *in vitro*. Nesse estudo, a DX também reduziu a captação de glicose pelos adipócitos, o nível sérico de adiponectina e a expressão dos genes lipogênicos e adipogênicos, demonstrando seus diversos efeitos colaterais no tecido adiposo.

Outro estudo, demonstrou que o tratamento com DX por duas semanas também resultou em uma redução dos tecidos subcutâneo, retroperitoneal e epididimal, porém não foram observadas diferenças significativas no peso e consumo alimentar, semelhante a nossa pesquisa (BIONDO et al., 2018).

Os animais que receberam rutina junto com DX apresentaram um dano oxidativo menor quando comparado aos animais que receberam apenas o quimioterápico (34,23 x 35,78 x 47,90mmol de DTNB reduzido/mg de proteína), e um aumento da atividade da catalase no tecido subcutâneo (282,3 x 168,9 x 237,3U CAT/mg de proteína). Contudo, não foi observado efeitos da DX no dano oxidativo.

Entretanto os efeitos tóxicos das drogas antineoplásicas dependem do tempo de exposição e da concentração plasmática utilizada. Tomando como exemplo, os efeitos da DX no tecido cardíaco, foi relatado que a DX pode gerar consequências anos após o uso deste quimioterápico, devido seu efeito cumulativo (LIPSHULTZ et al., 2013). Nesse sentido, torna-se relevante estudos em tempos diferentes da utilização da droga, visto que seus efeitos deletérios têm sido associados a maior produção de ERO.

Nesse contexto a rutina mostrou ser um componente importante no combate aos possíveis efeitos oxidativos da DX, visto que foi capaz de aumentar a atividade da enzima antioxidante catalase em animias tratados com essa droga. A atividade antioxidante da rutina, está diretamente relacionada com a sua propriedade redutora e estrutura química, que lhe conferem a capacidade de neutralizar ou sequestrar radicais livres, quelando os metais de transição e agindo tanto no início, como na transmissão do processo oxidativo (PAULA et al., 2014).

Além disso, a rutina já demonstrou seu papel protetor na disfunção cardíaca induzida pela DX em cardiomiócitos de camundongos (MA et al., 2017). Nesse contexto, podemos constatar que embora a rutina tenha apresentado um potencial antioxidante em diversos estudos, são necessários mais estudos para avaliar sua ação sobre os efeitos da DX.

Além disso, mais estudos são necessários para elucidar de que forma a melhora da defesa antioxidante está associada a perda de peso encotrada no estudo.

CONCLUSÕES

A administração de rutina concomitante com doxorrubicina, atenuou a perda de tecido adiposo causada por esse quimioterápico, e melhorou a atividade da enzima catalase, demonstrando seu importante potencial efeito antioxidante, mesmo com o uso desse medicamento. Esses resultados demonstram a importância de novos estudos para esclarecer o papel da rutina na redução dos efeitos colaterais relacionados à quimioterapia em órgãos

[1] Universidade Estadual do Ceará, paulaalexandref@gmail.com
[2] Universidade Estadual do Ceará, raquelnut@gmail.com
[3] Universidade Estadual do Ceará, laryssa.alves@aluno.uece.br
[4] Universidade Estadual do Ceará, keciany.oliveira@uece.br
[5] Universidade Estadual do Ceará, ariclecio@hotmail.com

relevantes para o controle da homeostase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BING C. Lipid mobilization in cachexia: mechanisms and mediators. **Curr Opin Support Palliat Care**,v. 5, n. 4, p. 356-60, 2011.

BIONDO LA, BATATINHA HA, SOUZA CO, TEIXEIRA AAS, SILVEIRA LS, ALONSO-VALE MI, OYAMA LM, ALVES MJ, SEELAENDER M, NETO JCR. Metformin Mitigates Fibrosis and Glucose Intolerance Induced by Doxorubicin in Subcutaneous Adipose Tissue. **Front Pharmacol.**,v. 8, n. 9, p.452, 2018.

BIONDO LA, LIMA JUNIOR EA, SOUZA CO, CRUZ MM, CUNHA RD, ALONSO-VALE MI, OYAMA LM, NASCIMENTO CM, PIMENTEL GD, DOS SANTOS RV, LIRA FS, ROSA NETO JC. Impact of Doxorubicin Treatment on the Physiological Functions of White Adipose Tissue. **PLoS One**, v. 25, n.11, p e0151548, 2016.

CASTILHO, R. O.; KAPLAN, M. A. C. Phytochemical study and antimicrobial activity of Chrysobalanus icaco. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 3, p. 436, 2011.

FAN, G.C,ZHOU X., WANG, X. *et al*. Heat shock protein 20 interacting with phosphorylated Akt reduces doxorubicin-triggered oxidative stress and cardiotoxicity**.** **Circ. Res**., v.103, p. 1270-1279, 2008.

GRADINARU, D.; MARGINA, D.; BORSA, C.; IONESCU, C.; ILIE, M.; COSTACHE, M.; DINISCHIOTU, A.; PRADA, G. I. Adiponectin: possible link between metabolic stress and oxidative stress in the elderly. **Aging Clin Exp Res**., v. 29, n. 4, p. 621-629, 2017

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Quimioterapia**. 2018. Avaliable from: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=101>. Acesso em 08 ago 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **GLOBOCAN**, 2018. Avaliable from: < https://www.iarc.fr/featured-news/latest-global-cancer-data-cancer-burden-rises-to-18-1-million-new-cases-and-9-6-million-cancer-deaths-in-2018>Acesso em 08 ago 2019. Acesso em 08 ago 2019.

JOKINEN, R.; PIRNES-KARHU, S.; PIETILÄINEN, K. H.; PIRINEN, E. Adipose tissue NAD+-homeostasis, sirtuins and poly(ADP-ribose) polymerases-important players in mitochondrial metabolism and metabolic health. **Redox Biol**., n. 12, p. 246-263, 2017.

LIPSHULTZ SE, COCHRAN TR, FRANCO VI *et al.* Treatment-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancer.**Nat RevClin Oncol**., v. 10, n. 12, p. 697-710, 2013.

MA Y, YANG L, MA J, LU L, WANG X, REN J, YANG J. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis. Biochim Biophys Acta Mol **Basis Dis.,** v.

[1] Universidade Estadual do Ceará, paulaalexandref@gmail.com
[2] Universidade Estadual do Ceará, raquelnut@gmail.com
[3] Universidade Estadual do Ceará, laryssa.alves@aluno.uece.br
[4] Universidade Estadual do Ceará, keciany.oliveira@uece.br
[5] Universidade Estadual do Ceará, ariclecio@hotmail.com

1863, n. 8, p. 1904-1911, 2017

MINOTTI, G.. MENNA, P SALVATORELLI, E. *et al.*Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and **cardiotoxicity Pharmacol. Rev**., v. 56, p. 185-229, 2004.

MUKHOPADHYAY, Partha et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, n. 5, p. H1466-H1483, 2009.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; HIROTA, B. C. K.; CAMPOS, R.; OLIVEIRA, V. B.; KALEGARI, M.; SILVA, C. B.; SILVA, G. M.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Potencial antioxidante in vitro das folhas da Bauhinia ungulata L. **Revista deCiências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 35, n. 2, p. 217-222, 2014.

PRESTA, Giuseppe A.; FONSECA, Adenilson S.; BERNARDO-FILHO, Mario. A Chrysobalanus icaco extract alters the plasmid topology and the effects of stannous chloride on the DNA of plasmids. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 331-335, 2007.

PRESTA, G. A.; PEREIRA, N. A. Activity of abejeru (Chrysobanalus icaco lin chrysobalanacea) in experimental study of hypogycemiant plants. **Revista Brasileira de Farmácia**, n. 68, p.91-101, 1987.

ZHANG, Jixiang et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

PALAVRAS-CHAVE: Desequilibrio redox, Doxorrubicina, Fitoterápico, Rutina, Tecido adiposo

[1] Universidade Estadual do Ceará, paulaalexandref@gmail.com
[2] Universidade Estadual do Ceará, raquelnut@gmail.com
[3] Universidade Estadual do Ceará, laryssa.alves@aluno.uece.br
[4] Universidade Estadual do Ceará, keciany.oliveira@uece.br
[5] Universidade Estadual do Ceará, ariclecio@hotmail.com