

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

POLIANA RODRIGUES ALVES DUARTE

**EFEITOS DA LEUCINA NO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO E RENAL EM
RATOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA**

**UBERLÂNDIA - MG
2017**

POLIANA RODRIGUES ALVES DUARTE

**EFEITOS DA LEUCINA NO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO E RENAL EM
RATOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Elmiro Santos Resende.

**UBERLÂNDIA-MG
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

D812e
2017 Duarte, Poliana Rodrigues Alves, 1986
 Efeitos da leucina no estresse oxidativo hepático e renal em ratos
 tratados com doxorubicina / Poliana Rodrigues Alves Duarte. - 2017.
 70 p. : il.

 Orientador: Elmiro Santos Resende.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.
 Inclui bibliografia.

 1. Ciências Médicas - Teses. 2. Doxorubicina - Teses. 3. Leucina -
Teses. 4. Stress oxidativo - Teses. I. Resende, Elmiro Santos. II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

FOLHA DE APROVAÇÃO

Poliana Rodrigues Alves Duarte

EFEITOS DA LEUCINA NO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO E RENAL EM RATOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA

Uberlândia, 04 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Elmiro Santos Resende – Orientador

Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Uberlândia

Prof. Dr. Valdo José Dias Silva - Membro da banca examinadora

Departamento Bioquímica, farmacologia e fisiologia – Universidade Federal do Triângulo Mineiro.

Profa. Dra. Mara Rubia Nunes Celes- Membro da banca examinadora

Instituto de Patologia- Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Érica Carolina Campos Pulici - Membro da banca examinadora

Faculdade de Fisioterapia- Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Simone Ramos Deconte - Membro da banca examinadora

Faculdade de IFASC -Faculdade Santa Rita de Cássia

*Dedico este trabalho a minha amada avó Olinda
Maria Batista (in memoriam), anjo em minha vida,
fonte eterna de força e inspiração.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por cada oportunidade em minha vida de aprendizado.

Aos meus pais José e Aldaci, pelo amor e incentivo.

Ao meu querido esposo Fabrício Borges Duarte, pelo carinho, incentivo e confiança em meu trabalho, não me deixando desanimar em nenhum momento.

Meu pequeno João Francisco, presente de Deus em nossas vidas, que me ensina diariamente o sentido da vida e o que é o AMOR na sua forma mais sublime.

Aos meus sogros Cleusa e Adnor que me ajudaram muito nessa etapa final, cuidando com todo amor do netinho.

Ao meu mestre e orientador Prof. Dr. Elmiro Santos Resende pela confiança, apoio e ensinamentos científicos e de vida que com toda certeza irão me acompanhar em toda minha vida profissional e pessoal.

Aos colaboradores deste trabalho fundamentais para a conclusão deste trabalho, Mateus e Suzana - Hospital Veterinário- UFU; Prof. Foued, Renata, Danielle, Douglas e Adriele – Labibi-UFU; Simone - laboratório de fisiologia –UFU e ao Prof. Dr Marcelo Emílio Beletti – Histologia-UFU.

Aos meus amigos de trabalho pelo apoio e entendimento dos momentos de ansiedade: Silvana, Elaine, Fernanda, Inês, Jeovane, Anielle, Roger e Prof. Aguinaldo.

As secretárias da Pós-Graduação Viviane e Gisele pelo acolhimento e carinho no atendimento sempre, muito obrigada!

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para com a realização deste trabalho.

“Não percas a tua fé entre as sombras do mundo.

Ainda que os teus pés estejam sangrando, segue para a frente, erguendo-a por luz celeste, acima de ti mesmo.

Crê e batalha.

Esforça-te no bem e espera com paciência.

Tudo passa e tudo se renova na Terra, mas o que vem do céu permanecerá.

De todos os infelizes, os mais desditosos são os que perderam a confiança em Deus e em si mesmos, porque o maior infortúnio é sofrer a privação da fé e prosseguir vivendo.

Eleva, pois, o teu olhar e caminha.

Luta e serve.

Aprende e adianta-te.

Brilha a alvorada além da noite.

Hoje é possível que a tempestade te amarfanhe o coração e te atormente o ideal, aguilhoando-te com aflição ou ameaçando-te com a morte...

Não te esqueças, porém, de que amanhã será outro dia”

Meimei/ Francisco Cândido Xavier

RESUMO

A toxicidade hepática e renal é um dos efeitos colaterais da doxorubicina utilizada no tratamento antineoplásico. O objetivo deste estudo foi determinar se a suplementação com leucina na dieta de ratos tratados com doxorubicina tem ação protetora hepática e renal evidenciada pela redução do estresse oxidativo. O experimento incluiu 36 ratos distribuídos em quatro grupos sendo 8 Controles, 8 LEUcina, 10 DOXorrubicina e 10 DOX+LEU. Os animais dos grupos DOX e DOX+LEU foram tratados com injeções intraperitoneais de doxorubicina durante duas semanas, três vezes por semana, atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg. Os animais dos grupos C e LEU receberam volume intraperitoneal de solução salina, diariamente, semelhante àquele administrado como veículo da doxorubicina. Os grupos LEU e DOX-LEU receberam o aminoácido leucina ao longo do estudo acrescido em 5% à dieta basal. O estresse oxidativo tecidual hepático e renal foi avaliado pelas dosagens das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx), glutathione redutase (GR) e também dos níveis de glutathione reduzida (GSH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); a atividade oxidante foi medida pela peroxidação lipídica (ácido tiobarbitúrico TBARS). O teor de colágeno hepático foi avaliado em análise histológica utilizando-se a coloração *picrosirius red*; para análise do tecido hepático e renal empregou-se a coloração pelo tricrômico de Gomori. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os resultados mostraram que, no fígado, o grupo DOX comparado ao LEU apresentou aumento da atividade antioxidante de SOD, catalase e Gpx, e níveis de GSH e menores níveis de peroxidação lipídica e de deposição de colágeno. O grupo DOX+LEU comparado ao grupo LEU apresentou menores níveis de peroxidação lipídica e de deposição de colágeno e, finalmente, o grupo DOX +LEU, quando comparado ao grupo DOX, apresentou diminuição da atividade oxidante TBARS e da atividade antioxidante de SOD, catalase, Gpx e GSH. As análises renais mostraram um aumento do estresse oxidativo no grupo LEU evidenciado pelo aumento de GR. Todos os grupos experimentais apresentaram redução no número total de glomérulos em relação ao controle. Não houve alteração quanto à deposição de colágeno. Conclui-se que o acréscimo de 5% de leucina à dieta administrada aos ratos tratados com DOX mostrou efeito hepatoprotetor. A hipótese de efeito nefroprotetor da leucina evidenciado pela redução do estresse oxidativo, não foi demonstrada.

Palavras Chave: Doxorubicina; Leucina; Estresse Oxidativo Hepático e Renal.

ABSTRACT

Hepatic and renal toxicity is one of the side effects of doxorubicin used in the antineoplastic treatment. The aim of this study was to determine if leucine supplementation in the diet of Wistar rats treated with doxorubicin has protective hepatic and renal action evidenced by the reduction of oxidative stress. The experiment included 36 rats distributed in four groups, with 8 Control, 8 LEUcina, 10 DOXorubicin and 10 DOX + LEU. Animals from the DOX and DOX + LEU groups were treated with intraperitoneal injections of doxorubicin for two weeks, three times a week, at a cumulative dose of 7.5 mg / kg. The animals of groups C and LEU received intraperitoneal volume of saline daily, similar to that administered with doxorubicin. The LEU and DOX-LEU groups received the amino acid leucine throughout the study plus 5% added to the basal diet. Hepatic and renal tissue oxidative stress was evaluated by the dosages of the antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx), glutathione reductase (GR) and also reduced levels of glutathione (GSH) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); the oxidizing activity was measured by lipid peroxidation (thiobarbituric acid-TBARS). The hepatic collagen content was evaluated in histological analysis using picrosirius red staining; for analysis of the hepatic and renal tissues the Gomori trichrome was used. The results were presented as mean \pm standard error of the mean (EPM), using GraphPad Prism software version 5.0. The results were compared by the Student's t-Test or the analysis of variance (ANOVA), as appropriate. To verify the detected differences between the groups, the Tukey test was used. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The results showed that, in the liver, the DOX group compared to the LEU presented higher antioxidant activity of SOD, catalase and Gpx, and GSH levels and lower levels of lipid peroxidation and collagen deposition. The group DOX + LEU compared to the LEU group also presented lower levels of lipid peroxidation and collagen deposition, and finally, the DOX + LEU group, when compared to the DOX group, presented lower oxidant activity and lower antioxidant activity of SOD, catalase, Gpx and GSH. The renal analyzes showed an increase in oxidative stress in the LEU group evidenced by the increase in GR. All experimental groups had a reduction in the total number of glomeruli in relation to the control. There was no change in collagen deposition. It was concluded that the addition of 5% leucine to the diet administered to doxorubicin treated rats showed a hepatoprotective effect. The hypothesis of leucine nephroprotective effect evidenced by the reduction of oxidative stress was not demonstrated.

Key words: Doxorubicin; Leucine; Oxidative stress; hepatic and kidney.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Doxorrubicina farmacologia e efeitos colaterais 14

Figura 2. Timeline 16

ARTIGO 1

Figura 1. Sistema de defesa antioxidante no fígado de ratos 35

Figura 2. Análise da peroxidação lipídica (TBARS) no fígado de ratos..... 36

Figura 3. Deposição total de colágeno no fígado 36

Figura 4. Imagens das lâminas de fígado - Picrosirius red e Tricrômico de Gomori..... 37

ARTIGO 2

Figura 1. Sistema de defesa antioxidante no rim de ratos 54

Figura 2. Análise da peroxidação lipídica (TBARS) no rim de ratos 55

Figura 3. Imagens das lâminas de rim - Picrosirius red e Tricrômico de Gomori.....55

Figura 4. Média do número de glomérulos por campo 56

Figura 5. Deposição de colágeno no rim 56

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN	<i>American Institute of Nutrition</i>
C	Controle
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
DOX	Doxorrubicina
DOX+LEU	Doxorrubicina + Leucina
EPM	Erro Padrão da Média
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G6PDH	Atividade De Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
Gpx	Atividade da Glutathiona Peroxidase
GR	Atividade da Glutathiona Redutase
GSH	Glutathiona Reduzida
LEU	Leucina
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
ROS	Espécies Reativas a Oxigênio
SOD	Atividade da Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
HIPÓTESE.....	17
OBJETIVOS	19
MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS E CONCLUSÕES.....	25
ARTIGO 1	26
ARTIGO 2	45
REFERÊNCIAS	62

ANEXO 1 COMPROVANTE DO COMITÊ DE ÉTICA (CEUA)

ANEXO 2 COMPROVANTE DE ENVIO PARA REVISTA - ARTIGO 1

ANEXO 3 COMPROVANTE DE ENVIO PARA REVISTA- ARTIGO 2

INTRODUÇÃO

A doxorubicina é um antibiótico glicosídico do grupo das antraciclinas, isolado do fungo *Streptomyces peucetius* var. *Caesius*, que apresenta atividade antineoplásica, (NAKAGE e SANTANA, 2008). É um medicamento amplamente utilizado na oncologia e é considerado como um dos mais potentes quimioterápicos já aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA).

São conhecidas alterações patológicas e funcionais induzidas pelos antibióticos antraciclínicos no coração as quais se assemelham às cardiomiopatias e incluem degeneração miocárdica com inflamação, fibrose, dilatação e insuficiência cardíaca (SILVA et al, 2005).

O resultado do efeito cardiotóxico da doxorubicina é caracterizado, clinicamente, por insuficiência cardíaca congestiva (ICC), com hipotensão, anormalidades eletrocardiográficas, arritmias e morte súbita (MÖRSCHBÄCHER, 2012). Além dos efeitos sobre o coração também são descritas a hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade (HORTOBAGYI, 1997).

A metabolização da doxorubicina ocorre em três fases. Na primeira delas há rápida distribuição do fármaco para o fígado, pulmões, coração, rins e baço; na segunda fase ocorre a liberação da droga nestes órgãos e em seus compartimentos vasculares e tecidos. Finalmente, o fármaco é metabolizado no fígado e excretado principalmente na bile, fezes e urina (KIRIAQUE et al, 2010; TABACZAR et al, 2017; BIRBEN et al, 2012; EVANS et al 2012).

No seu mecanismo de ação, a doxorubicina altera a estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA) ao se intercalar entre os pares de bases adjacentes de um filamento e inibir sua atividade celular original (PAGE et al 1992; ZWEIT et al 1993). Os danos ao DNA também podem ocorrer pela formação de radicais livres de oxigênio (ROS). Neste processo, a semiquinona da doxorubicina, um metabólito tóxico, pode reagir com o oxigênio produzindo ROS e com outras moléculas, como o DNA mitocondrial, interferindo na função mitocondrial, na expressão de proteínas e na oxidação lipídica (EDER, 2006). Estas ações são responsáveis por graves danos celulares e das membranas mitocondriais (MYERS et al 1993). Os efeitos antineoplásico da doxorubicina são observados durante a fase S (período de síntese de DNA) e G2 (período de síntese de RNA e de proteínas) do ciclo celular, reduzindo, assim, o índice mitótico (LIU; THURMAN, 1992; HALLIWELL, 1991; SHIMOMURA; HARRIS, 2006).

A doxorubicina também provoca um desequilíbrio entre a produção de radicais livres de oxigênio e os antioxidantes; as ROS são produzidas como resultado do metabolismo celular e são moléculas altamente reativas que podem danificar estruturas celulares e alterar suas funções.

Às mudanças no estado de equilíbrio entre a produção de oxidantes e antioxidantes denomina-se "estresse oxidativo" (CHETEY et al 2017).

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e as defesas antioxidantes. Este desequilíbrio em favor da produção de ROS pode gerar dano celular (HALLIWELL, 2007).

As mitocôndrias, presentes em todas as células aeróbias, são fontes fisiológicas das ROS. No fígado, a produção mitocondrial de energia é responsável por cerca de 2% da utilização total de oxigênio (BOVERIS, 1998).

Em hepatócitos, o retículo endoplasmático bem desenvolvido, além de outras fontes subcelulares relevantes e presentes também em outros tipos celulares, proporcionam uma fonte igualmente importante destes radicais (YUSUF KALENDER, 2005)

Os organismos aeróbicos desenvolveram sistemas antioxidantes integrados, que incluem atividades enzimáticas e não enzimáticas. Em condições patológicas, estes sistemas podem estar alterados e contribuir para complicação e perpetuação de doenças neurológicas, cardiovasculares, hepáticas, renais, metabólicas e câncer (DENG, 2007).

As defesas antioxidantes atuam no sentido de restabelecer o equilíbrio e assim minimizar os danos decorrentes da intensificação do estresse oxidativo. Dentre as defesas enzimáticas, as mais conhecidas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (Gpx). A catalase decompõe o peróxido de hidrogênio gerando água e oxigênio; a enzima Gpx também decompõe esta molécula porém, fazendo uso de um mecanismo diferente, ela utiliza a glutathione reduzida (GSH) para transformar o peróxido de hidrogênio em água. A glutathione oxidada nesta reação é reduzida novamente pela ação da enzima glutathione redutase (GR), consumindo fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH). Entre as defesas não enzimáticas estão o tripeptídeo γ -glutathione (GSH, na forma reduzida) e substâncias como o ácido ascórbico e vitaminas A e E (BOVERIS, 1998).

Do equilíbrio pleno deste intrincado sistema depende a continuidade da vida em sistemas com metabolismo que envolvem o oxigênio.

Apesar de ser um bom quimioterápico, os efeitos colaterais da doxorubicina limitam suas aplicações clínicas. Neste cenário verifica-se que boa parte dos estudos existentes investigaram os efeitos tóxicos da doxorubicina nas células musculares cardíacas, porém poucos verificaram essa toxicidade e as alterações dela decorrentes no que se refere aos seus processos metabólicos no fígado e rins (CARVALHO 2009).

A hepatotoxicidade acontece em aproximadamente 40% dos pacientes tratados com a doxorubicina (LEE, 1980) e pode paralisar o ciclo celular de hepatócitos inibindo sua

autorregeneração. Muitos estudos sugerem que os efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos se devem à grande quantidade de ROS gerada na presença da doxorubicina. A expressiva produção de ROS e a depleção de antioxidantes endógenos causam ativação da cascata do estresse oxidativo desencadeando resposta imune e inflamação (LEE, 1980).

Assim como a hepatotoxicidade, a nefrotoxicidade é um dos principais efeitos deletérios causado pela administração de doxorubicina. Devido à baixa capacidade regenerativa dos rins, eles são mais suscetíveis aos danos citotóxicos e lesões epiteliais são as primeiras a aparecer levando à degeneração dos glomérulos cujo curso final é a glomerulosclerose, principal nefropatia relacionada ao uso de doxorubicina. Os mecanismos pelos quais a doxorubicina induz a toxicidade não são totalmente compreendidos e a principal hipótese levantada, assim como se sugere no fígado, é o aumento de ROS (ROOK et al, 2005; BERTANI, 1986).

Nos rins é descrito aumento da peroxidação lipídica com dano oxidativo em células renais, aumento da permeabilidade capilar glomerular e alterações da arquitetura tubular. Com isso ocorrem mudanças estruturais e funcionais das macromoléculas orgânicas que, em seu curso final, induzem apoptose e perda glomerular (GEWIRTZ 1999; DI MARCO et al 1965). Detalhes relativos à farmacologia e efeitos colaterais da doxorubicina podem ser vistas na Figura 1.

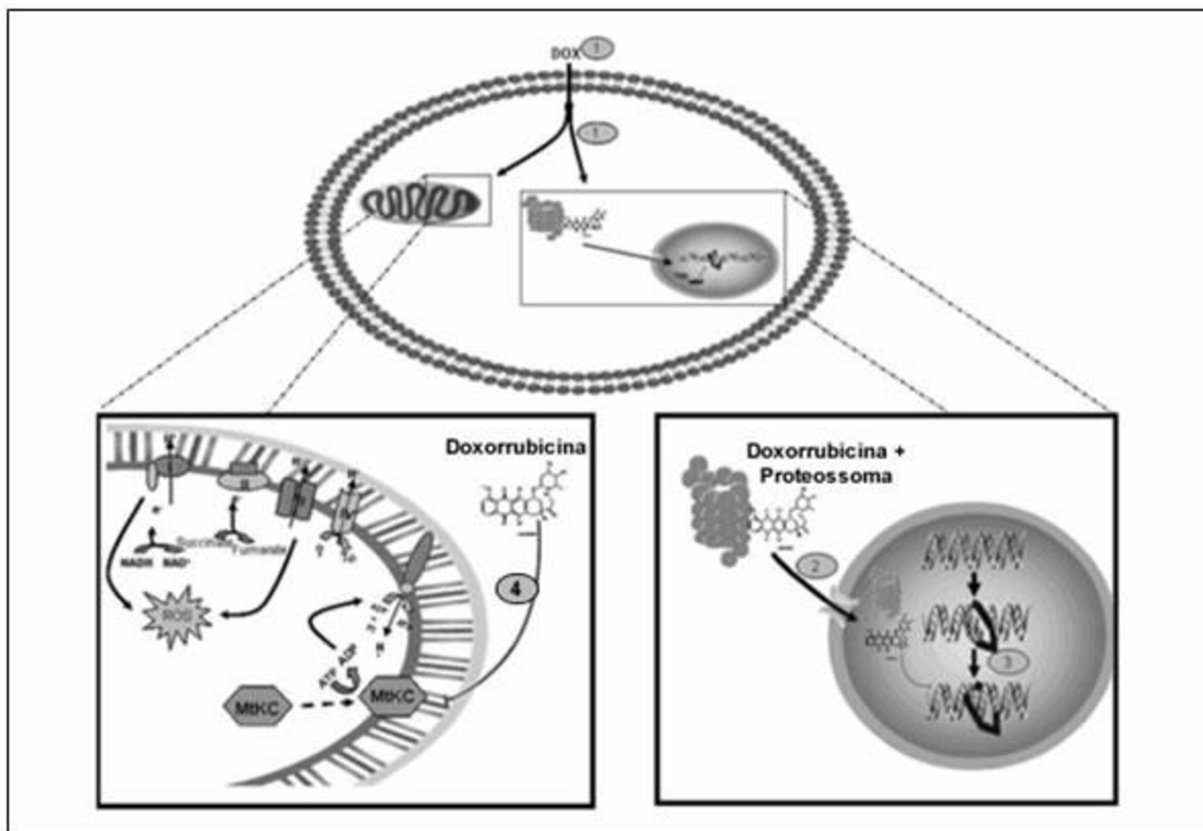


Figura 1: Doxorrubicina farmacologia e efeitos colaterais: 1- Doxorrubicina penetrando na célula; 2 - Mecanismo nuclear - ligação covalente a proteínas- complexo proteossômico no núcleo; 3 - doxorrubicina dissociada intercalada na hélice de DNA; 4 - doxorrubicina interagindo com as mitocôndrias e ligando-se à cardiolipina bloqueando a ligação da creatina quinase mitocondrial (MtCK) às membranas mitocondriais. Aumento do ciclo doxorrubina-redox pelo complexo I da cadeia respiratória mitocondrial leva a um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). NADH (dinucleótido de nicotinamida adenina reduzido); NAD⁺ (dinucleótido de nicotinamida adenina oxidado); ADP (difosfato de adenosina); ATP (trifosfato de adenosina), Pi (fosfato inorgânico) (Modificado de CARVALHO et al, 2009).

A suplementação nutricional é uma área promissora na pesquisa clínica que busca neutralizar efeitos e mudanças físicas provocadas pelas doenças e efeitos colaterais dos tratamentos para essas doenças, modificando características da dieta. A suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) na dieta tem demonstrado aumento da massa muscular esquelética, reduzida no processo do envelhecimento ou devido a doenças como *diabetes mellitus* e câncer (ROBERTS; SINDHU, 2009).

Os BCAA, particularmente a leucina, são aminoácidos envolvidos na regulação da produção de proteínas servindo também como substrato para a síntese proteica. A leucina também está envolvida em vários processos celulares, como o metabolismo energético e a regeneração tecidual. Dentre os BACC, a leucina é conhecida por aumentar o metabolismo do músculo esquelético e regular a síntese de proteínas (ROBERTS; SINDHU, 2009).

O aminoácido leucina sempre ocupou uma posição clássica na bioquímica pois é o único que é puramente lipogênico, tem efeitos sobre o metabolismo e participa da síntese de proteínas (NISSEN, 1997).

Embora os efeitos regulatórios e metabólicos da leucina sejam conhecidos há cerca de 30 anos, até o presente momento não há uma compreensão clara de como ela participa do metabolismo das proteínas. Está descrito na literatura que o metabólito P-hidroxi P-metilbutirato (HMB) é responsável pelos efeitos metabólicos da leucina. Além disso propõe-se que o HMB produzido no metabolismo da leucina seja convertido em P-hidroxi + metilglutaril CoA (HMG-CoA) em alguns tecidos e este substrato é utilizado na síntese endógena de colesterol sendo este necessário para manter a função celular máxima (NISSEN, 1997).

A reposição no organismo do aminoácido leucina é dependente de fatores exógenos (dietéticos) ou endógenos (alfa ketoisocaproate - KIC). Grande parte da oxidação da KIC, ocorre no fígado, mais precisamente nas mitocôndrias hepáticas, formando β -hydroxy+methylglutaryl CoA (HMG-CoA). O HMG-CoA citosólico produzido a partir de HMB proporciona um substrato conveniente para a enzima HMG-CoA redutase na síntese de colesterol (NISSEN, 1997).

A leucina, isoleucina e valina, juntas, exercem efeitos anabolizantes semelhantes aos da insulina sendo a leucina um dos reguladores do metabolismo proteico (HARBHAJAN, 1978). Em meio de cultura, pesquisas demonstraram que a síntese de proteína cardíaca e, em particular, da miosina, aumentou em aproximadamente 40% quando todos os aminoácidos ou apenas a leucina tiveram as suas concentrações plasmáticas aumentadas de 1 a 5 vezes (FREXES-STEED, 1992). Achados semelhantes foram posteriormente observados no fígado e músculos esqueléticos (MORGAN et al, 1981).

O primeiro uso clínico da leucina foi no tratamento da doença hepática crônica. Os primeiros relatórios mostraram que a infusão de doses elevadas deste BCAA melhoraram a insuficiência e a encefalopatia hepáticas. Relatos posteriores, no entanto, incluindo um estudo multicêntrico europeu randomizado, não conseguiram mostrar quaisquer efeitos benéficos com a combinação dos três aminoácidos de cadeia ramificada para a insuficiência hepática (MARCHESINI, 1982).

Outros estudos que examinaram o uso de leucina em situações estressantes, em geral mostraram benefícios com a suplementação. No entanto, devido aos diferentes tipos de estresse empregados, da quantidade de leucina administrada e a falta de controles adequados, os resultados foram variáveis ao longo dos estudos subsequentes (NISSEN e ABUMRAD 1997)

Os suplementos dietéticos voltaram-se para aspectos relacionados à musculatura esquelética. O músculo esquelético é um tecido adaptativo envolvido na produção de energia, apresenta

elevado metabolismo e grande *turnover* de proteínas sendo, portanto, importante fonte de produção e armazenamento de energia. Estudos mostram que a leucina estimula a síntese proteica nos músculos esqueléticos através da via da mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e indicam que ela pode regular a biogênese mitocondrial do músculo esquelético, a absorção de glicose e a oxidação de ácidos graxos. (IMAMURA et al 2013; TANIGUCHI et al 2017; RIEGER et al 2017). A mTOR é uma via de sinalização que integra sinais intra e extracelulares e funciona como um centro regulador de metabolismo, de crescimento e proliferação e de sobrevivência celular. Esta via está ativa em diversos processos celulares como a oncogênese e a angiogênese, resistência à insulina, adipogênese e ativação dos linfócitos T (LAPLANTE, M; SABATINI, DM; 2009).

Além desses efeitos descritos, estudos prévios também demonstraram que uma dieta rica em leucina pode melhorar o balanço de nitrogênio e recuperar a massa corporal magra, agindo especificamente, portanto, no músculo esquelético, na placenta e no coração. Assim, a suplementação da dieta com leucina pode se constituir em um campo promissor de investigação pois esta intervenção pode até mesmo atuar na prevenção dos efeitos colaterais causados em pacientes que fazem tratamento com antineoplásicos, como a doxorrubicina, podendo reduzir os efeitos indesejáveis da caquexia decorrente do câncer, por exemplo (FAN et al 2017).

Muito se tem investido em estudos clínicos na busca por novos medicamentos. Porém, nossos conhecimentos sobre os múltiplos efeitos favoráveis e desfavoráveis daquelas moléculas já conhecidas e em uso clínico ainda são insuficientes. Torna-se, assim, importante investigar terapias coadjuvantes que possam diminuir os efeitos tóxicos da doxorrubicina com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes durante e após o período de tratamento (CRUZ, GOMES-MARCONDES; 2014), pelo menos até que novas opções cruzem as fronteiras de biossegurança definidas pela pesquisa clínica e venham substituir aquelas existentes, com vantagens e menos efeitos colaterais.

Até o momento e no limite dos nossos conhecimentos, não há estudos divulgados que tenham avaliado os efeitos metabólicos, no que se refere ao comportamento do estresse oxidativo, decorrentes da associação da doxorrubicina a uma suplementação dietética com a leucina. O presente estudo tem por objetivo verificar modificações no comportamento do estresse oxidativo hepático e renal decorrentes da administração de doxorrubicina isoladamente ou associada à suplementação dietética com leucina em ratos Wistar, utilizando para isso dosagens de substâncias envolvidas nesse estresse e análises histológicas.

HIPÓTESE

Os efeitos colaterais da doxorrubicina limitam seu uso clínico e podem produzir situações clínicas de difícil controle podendo conduzir ao óbito. O mecanismo proposto para explicar a maioria destes efeitos indesejáveis tem como base o desequilíbrio provocado no estresse oxidativo pela alta produção de ROS sem a devida compensação antioxidante. (KOCAHAN, 2017).

A hipótese de que a modulação das respostas indesejáveis à doxorrubicina pode ocorrer pelo emprego de suplementação de leucina na dieta foi testada no presente estudo e, para isso, levou-se em conta o comportamento do estresse oxidativo em sítios como o fígado e o rim nos quais são descritos efeitos tóxicos derivados de ROS após a administração deste medicamento. Neste sentido, um modelo em ratos Wistar hígidos foi proposto. A definição da dose cumulativa, dos tempos de administração e o intervalo de administração e de realização das medidas dos indicadores do estresse oxidativo foram definidos com base na literatura e em um ensaio piloto.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar no fígado e rins o efeito da leucina suplementada na dieta de ratos Wistar submetidos ao tratamento com Doxorubicina.

Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o efeito da dieta acrescida com leucina no estresse oxidativo hepático e renal em ratos Wistar tratados com doxorubicina, utilizando-se as dosagens de atividade SOD, catalase, GSH, GPx, GR, G6PDH e da peroxidação lipídica;
- ✓ Analisar a deposição de colágeno no fígado e rins na presença de doxorubicina, de leucina e da sua associação;
- ✓ Quantificar o número de glomérulos renais na presença de doxorubicina, de leucina e da sua associação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com aproximadamente 12 semanas de idade (peso variando entre 250g e 300g). Os animais foram alojados no biotério da instituição, com ambiente controlado e monitorados diariamente, com livre acesso à ração e à água.

O Protocolo experimental foi aprovado pela comissão de ética e utilização de animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, conforme o protocolo 115/14.

Grupos e tratamentos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: C (controle) com oito animais, DOX (doxorrubicina) com dez animais, LEU (leucina) com oito animais e DOX+LEU (doxorrubicina e leucina) com dez animais. Os animais dos grupos DOX e DOX+LEU receberam doxorrubicina injetada via intraperitoneal. Os grupos LEU e DOX+LEU tiveram a ração acrescida em 5% de leucina.

Formulação das dietas

Para a elaboração da dieta seguiu-se o recomendado pelo *American Institute of Nutrition* (20), que estabelece como base a formulação AIN-93G, adequada ao crescimento, gestação e lactação de roedores. A caseína utilizada na elaboração da dieta apresentou concentração de proteína adequada (85,07%), conforme laudo do fornecedor.

Como descrito por Reeves e colaboradores (1993), a dieta apresenta em sua composição a concentração mínima de leucina de 1,54g/100g (1,5%). Para o grupo tratado com leucina foi fornecida dieta padrão modificada na concentração adicionada de leucina em 5%. As dietas foram confeccionadas em laboratório com controle de riscos de contaminação química e biológica.

As dietas e água foram oferecidas *ad libitum*, sendo que os animais dos quatro grupos experimentais iniciaram o experimento com suas respectivas dietas 21 dias antes das aplicações da doxorrubicina.

Tratamento com Doxorrubicina

Os animais receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de Doxorrubicina (FaulDoxo, Libbs Farmacêutica, Embú, São Paulo), três vezes por semana, durante duas semanas, atingindo-se dose cumulativa de 7,5 mg/kg (adaptado de Campos e colaboradores,

2011). O grupo C recebeu volume de solução salina 0,9% igual àquela utilizada como veículo da doxorubicina durante o mesmo período empregado no tratamento.

Duas semanas após a última dose de doxorubicina os animais foram pesados e anestesiados utilizando-se Ketamina 74 mg/kg e Xilazina 8 mg/kg via injeção intraperitoneal. Imediatamente após a anestesia o fígado e os rins foram removidos após incisão abdominal. Em seguida o órgão foi pesado e lavado com solução gelada (4°C) de NaCl a 0,9%, seccionado em frações e secos em papel de filtro sendo uma parte congelada em nitrogênio líquido para posterior análise do estresse oxidativo e a outra parte foi fixada em solução de formalina a 4% para análise histológica.



Figura 2: Timeline

Coleta das amostras e preparação dos tecidos

O fígado e os rins de cada animal foram removidos, uma fração congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -80°C. Após descongelamento, os fragmentos hepáticos e os rins direitos foram, macerados e homogeneizados em 20 mM de tampão fosfato de sódio, contendo 140 mM de KCl, pH 7,4, na proporção (1:10 p/v). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g durante 10 minutos a 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi recolhido para a realização das dosagens dos parâmetros de estresse oxidativo. Foram realizadas seis amostras de cada grupo.

Estresse Oxidativo

As análises oxidativas seguiram os protocolos adaptados por Diniz-Vilela e colaboradores (2016).

a) Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD se baseia na capacidade de auto-oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente do radical superóxido. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente analisada em espectrofotômetro a 420 nm, em um meio contendo 50 mM de tampão Tris com 1 mM de EDTA pH 8.2, 80 U/ml de catalase, 0,38 mM de pirogalol e 15 µl de amostra. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão. A inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol é definido como uma unidade de SOD.

b) Catalase

A catalase é uma enzima produzida pelo peroxissomo cuja função é acelerar a conversão do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. Na região do UV é possível observar a decomposição direta do H_2O_2 pela diminuição da absorbância a 240 nm. Para isso foi adicionado 10 µl de triton 10 % para cada 100 µl do homogeneizado, e mantidos sob agitação. Após 15 minutos de repouso em gelo, 10 µl dessa amostra foi pipetada em poços de microplaca, onde foi adicionado 300 µl de solução de H_2O_2 (0,22% v:v em tampão fosfato de potássio 10 mM). A leitura da microplaca foi realizada imediatamente após adição da solução de H_2O_2 e em intervalos de 15 segundos, durante 10 minutos, a 240 nm, pelo equipamento fluorímetro Perkin Elmer- Em Spire Multimode Plate Reader.

c) Glutathiona reduzida (GSH).

Os conteúdos proteicos das amostras foram precipitados inicialmente pelo ácido metafosfórico (MPA) na proporção 1: 1 (homogeneizado / MPA). As amostras foram centrifugadas a 7000 g durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as medições. Uma curva padrão de GSH (0,001-0,1 mM) foi feita para quantificar as amostras utilizando valores de regressão. O GSH reage com o orto-ftalaldeído (OPT 1 mg/ml de metanol) diluído em fosfato de sódio monobásico, tampão (0,1 M) e

EDTA (0,005 M). A leitura foi feita em fluorômetro com excitação de 350 nm e emissão de 420 nm.

d) Atividade da glutathiona peroxidase (Gpx).

Para quantificar a atividade da glutathiona peroxidase, o homogeneizado foi incubado com tampão Gpx (fosfato de potássio 100 mM com EDTA 1 mM, pH 7,7), azida de sódio 40 mM, GSH (diluído em ácido metafosfórico a 5%), GR (Gpx diluído em tampão), NADPH (diluído com bicarbonato de sódio a 5%) e 0,5 mM Tert-butilo. A decomposição da concentração de NADPH foi avaliada por 10 minutos em espectrofotômetro, a 340 nm.

e) Atividade da Glutathiona Redutase (GR).

A quantificação da atividade enzimática da GR foi registrada por uma diminuição na concentração de NADPH nas amostras, utilizando-se GR Tampão (fosfato de sódio 200 mM pH 7,5, EDTA 6,3 mM) e NADPH. A leitura cinética foi realizada a 340 nm por 10 minutos.

f) Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

A atividade da G6PDH foi monitorada pela produção de NADPH com consequente aumento da absorbância a 340 nm. A análise foi realizada utilizando uma microplaca onde as amostras foram incubadas com Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), cloreto de magnésio, NADP + (0,5 mM) e glucose 6-fosfato (1 mM). A leitura cinética foi realizada por 10 minutos.

g) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 100 µl de amostra, 200 µl de ácido tricloroacético a 10% e 300 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% em sulfato de sódio a 7,1% foram misturados em microtubos. As soluções foram incubadas por duas horas em banho de água fervente (95°C). Posteriormente as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. O complexo rosa resultante foi extraído com 400 µl de butanol. A fluorescência da fase orgânica foi lida a 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva de calibração foi realizada utilizando o 1,1,3,3-tetrametoxipropano e

submetida ao mesmo tratamento que as amostras. Os níveis de TBARS foram calculados como nmol de TBARS/mg de proteína.

Análise Histológica

Para a análise histológica foi padronizada a fração do lobo hepático direito e os rins esquerdos. Os órgãos removidos foram fixados em solução de formalina a 4% (pH 7,2) por 24 horas. Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) seguidas de duas trocas de xilol e embebidas em parafina para constituição dos blocos. Os cortes histológicos foram cortados com 5 μ de espessura e montados em lâminas de vidro. Antes da coloração, os cortes foram desparafinizados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente.

Os cortes foram corados com tricrômico de Gomori para a visualização da morfologia geral; para quantificação de colágeno a coloração utilizada foi o *picrosirius red*. As secções foram visualizadas a partir da câmera do tipo Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Alemanha, acoplada ao microscópio e as imagens obtidas utilizando-se objetiva de 40X.

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), usando o software GraphPad Prism versão 5.0, e comparados pelo Teste *t* de *Student* ou através da análise de variância (two way- ANOVA), conforme apropriado. Para verificar as diferenças entre os grupos, foi utilizado o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados mostraram que, no fígado, o grupo DOX comparado ao LEU apresentou maior atividade antioxidante de SOD, catalase e Gpx, e níveis de GSH e menores níveis de peroxidação lipídica e de deposição de colágeno. O grupo DOX+LEU comparado ao grupo LEU apresentou menores níveis de peroxidação lipídica e de deposição de colágeno e, finalmente, o grupo DOX +LEU, quando comparado ao grupo DOX, apresentou menor atividade oxidante e menor atividade antioxidante de SOD, catalase, Gpx e GSH. As análises renais mostraram um aumento do estresse oxidativo no grupo LEU evidenciado pelo aumento de GR.

Todos os grupos experimentais apresentaram redução no número total de glomérulos em relação ao controle. Não houve alteração quanto à deposição de colágeno. Conclui-se que o acréscimo de 5% de leucina à dieta administrada aos ratos tratados com DOX mostrou efeito hepatoprotetor. A hipótese de efeito nefroprotetor da leucina evidenciado pela redução do estresse oxidativo, não foi demonstrada.

ARTIGOS SUBMETIDOS

O estudo possibilitou a preparação dos seguintes artigos:

- 1) AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO NA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA NA DIETA DE RATOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA
- 2) AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO RENAL NA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA EM DIETA DE RATOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA

Os artigos estão inseridos abaixo.

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO HEPÁTICO NA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA NA DIETA DE RATOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA

Poliana Rodrigues Alves Duarte¹, Danielle Diniz Vilela², Renata Roland Teixeira², Douglas Carvalho Caixeta², Adriele Vieira de Souza², Simone Ramos Deconte³, Clesnan Mendes-Rodrigues¹, Thiago Montes Fidale¹, Foued Salmen Espindola² and Elmiro Santos Resende¹.

1. Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil
2. Instituto de Genética e Bioquímica; Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil
3. Instituto de Ciências Biomédicas; Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil

RESUMO

A toxicidade hepática é um dos efeitos colaterais das antraciclinas utilizadas no tratamento antineoplásico. O objetivo deste estudo foi determinar se a suplementação com leucina na dieta de ratos tratados com DOX tem ação protetora hepática contra as lesões induzidas pelo estresse oxidativo causado pela DOX. O experimento foi composto por 36 ratos distribuídos em quatro grupos (08 C, 08 LEU, 10 DOX e 10 DOX+LEU). Os animais dos grupos DOX e DOX+LEU foram tratados com injeções intraperitoneais de DOX durante duas semanas, 3 vezes por semana, atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg. Os animais dos grupos C e LEU receberam volume intraperitoneal de solução salina semelhante. Os grupos LEU e DOX-LEU receberam o aminoácido leucina acrescido à dieta a concentração de 5%; ao longo do estudo. O estresse oxidativo tecidual hepático foi avaliado, através das dosagens das enzimas antioxidantes: catalase, SOD, Gpx, GR também dos níveis de GSH e G6PDH e a atividade oxidante foi medida pela peroxidação lipídica. O teor de colágeno hepático foi avaliado em análise histológica, utilizando a coloração *picrosirius red* e para análise do tecido Tricrômico de Gomori. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), usando o software GraphPad Prism versão 5.0. Estes foram comparados pelo teste *t* de Student ou através da análise de variância (two way - ANOVA), conforme apropriado. Para verificar as diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Os resultados mostraram que o grupo DOX comparado ao LEU teve maior atividade antioxidante SOD, catalase e Gpx, e níveis de GSH e menores níveis de peroxidação lipídica e deposição de colágeno. O grupo DOX+LEU comparado ao grupo LEU também apresentou menores níveis de peroxidação lipídica e deposição de colágeno e finalmente o grupo DOX +LEU quando comparado ao grupo DOX apresentou menor atividade oxidante e menor atividade antioxidante SOD, catalase, Gpx e GSH. Concluímos que o acréscimo para 5% de concentração de leucina a dieta administrada para os ratos tratados com DOX, mostrou benefício, evidenciado na redução do estresse oxidativo pelas medidas antioxidantes GSH, Gpx, SOD e catalase e também redução da atividade oxidante pela peroxidação lipídica e deposição de colágeno. Esses resultados são animadores, entretanto mais estudos são necessários para implementar a suplementação com leucina as práticas clínicas futuras.

Palavras Chave: Doxorubicina; Leucina; Estresse Oxidativo e Hepático.

Abreviaturas: C, controle; DOX, doxorubicina; DOX+LEU, doxorubicina associado a leucina; Gpx, glutathione peroxidase; G6PDH, glucose-6-fosfato desidrogenase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione reduzida; LEU, leucina; SOD, superóxido dismutase; TBARS, ácido tiobarbitúrico.

1. INTRODUÇÃO

A doxorubicina é um antibiótico antracíclico glicosídico, com atividade antineoplásica, isolado do fungo *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* (1). São conhecidas as alterações patológicas e funcionais induzidas pelos antibióticos antraciclínicos no coração que se assemelham às das cardiomiopatias e incluem degeneração miocárdica com fibrose, inflamação, dilatação e insuficiência cardíaca (2). O resultado do efeito cardiotóxico da doxorubicina é caracterizado, clinicamente, por insuficiência cardíaca congestiva (ICC), hipotensão, anormalidades eletrocardiográficas, arritmias e morte súbita (3).

Verifica-se que boa parte da literatura investiga os efeitos da doxorubicina sobre as células musculares cardíacas, porém poucos estudos verificam os efeitos de toxicidade causado pela doxorubicina nos hepatócitos e as alterações em seus processos metabólicos (4).

A metabolização da doxorubicina, ocorre em três fases: primeira fase representa a rápida distribuição do fármaco para o fígado, pulmões, coração, rins e baço; segunda fase ocorre a liberação da doxorubicina nestes órgãos, compartimentos vasculares e tecidos. Finalmente, o fármaco é metabolizado no fígado e excretado principalmente na bile e nas fezes também é excretado também na urina (5, 6, 7 e 8).

A doxorubicina altera a estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA) ao intercalar entre os pares de bases adjacentes de um filamento e inibir sua atividade original (9, 10). Os danos ao DNA também podem ocorrer pela formação de radicais livres os quais são responsáveis por severas injúrias celulares e das membranas mitocondriais (11). Os efeitos citotóxicos da doxorubicina são observados durante a fase S (período de síntese de DNA) e G2 do ciclo celular (período de síntese de RNA e proteína), reduzindo, assim, o índice mitótico (12, 13 e 14).

A suplementação nutricional é uma promissora área na pesquisa clínica, a fim de neutralizar efeitos e mudanças físicas provocadas pelas doenças e pelos efeitos colaterais dos tratamentos para essas doenças. A suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada tem demonstrado contribuir com a melhora da massa muscular esquelética que é diminuída no processo do envelhecimento ou devido a doenças como diabetes (15). A leucina é conhecida pelo seu papel no metabolismo do músculo esquelético e regulação da síntese de proteínas. Os aminoácidos de cadeia ramificada, particularmente a leucina, são aminoácidos proteicos envolvidos na regulação homeostática, além de servir como substrato para síntese proteica, a leucina também está envolvida em vários processos celulares como metabolismo energético e regeneração tecidual. Muitos estudos indicaram que a leucina pode regular a biogênese mitocondrial do músculo esquelético, absorção de glicose e oxidação de ácidos graxos, o músculo esquelético é um tecido

adaptativo envolvido em energia metabolismo e turnover de proteína. Os músculos esqueléticos são importante fonte de armazenamento de energia, estudos anteriores mostraram que a leucina estimula a síntese proteica nos músculos esqueléticos através da via rapamicina (mTOR) (16, 17 e 18).

Além disso, estudos prévios têm demonstrado que uma dieta rica em leucina pode melhorar o balanço de nitrogênio e a massa corporal magra, especificamente no músculo esquelético, placenta e coração. Assim, a suplementação da dieta com leucina também pode se constituir um promissor tratamento e até mesmo atuar na prevenção dos efeitos colaterais causados em pacientes que fazem tratamento com antineoplásicos, como a doxorrubicina, podendo reduzir os efeitos da caquexia decorrente do câncer (19).

Muito se tem investido em estudos clínicos na busca por novas drogas, porém nossos conhecimentos sobre os múltiplos efeitos daquelas já conhecidas e em uso clínico ainda são muitas vezes insuficientes. É importante investigar terapias coadjuvantes que diminuam os efeitos tóxicos da doxorrubicina com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes durante o período de tratamento (20).

É conhecido que a doxorrubicina provoca um desequilíbrio entre a produção de radicais livres de oxigênio e os antioxidantes. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas como resultado do metabolismo celular normal e ambiental. ROS são moléculas altamente reativas e podem danificar estruturas celulares e alterar suas funções. As mudanças no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é denominado "estresse oxidativo" (21).

Os organismos aeróbicos têm sistemas antioxidantes integrados, que incluem enzimática (SOD, catalase, GR e Gpx) e não enzimática (vitaminas A, C e E) em condições patológicas, os sistemas podem estar alterados e contribuir para complicação e perpetuação de doenças neurológicas, aterosclerose, hipertensão, isquemias, diabetes e câncer (22).

Até o momento não há estudos divulgados que tenham avaliado os efeitos metabólicos da associação do tratamento com doxorrubicina e uma suplementação dietética com aminoácido de cadeia ramificada leucina. O presente estudo verifica os efeitos da associação suplementação leucina e tratamento doxorrubicina no fígado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com aproximadamente 12 semanas de idade (peso variando entre 250g e 300g). Os animais foram alojados no biotério da instituição, com ambiente controlado e monitorados diariamente, com livre acesso à ração e à água.

Protocolo aprovado pela comissão de ética e utilização de animais da Universidade Federal de Uberlândia, conforme o protocolo 115/14.

Grupos e tratamentos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: C (controle) com oito animais, DOX (doxorrubicina) com dez animais, LEU (leucina) com oito animais e DOX+LEU (doxorrubicina e leucina) com dez animais. Os grupos LEU e DOX+LEU tiveram a ração acrescida para concentração de 5% de leucina.

Formulação das dietas

Para a elaboração da dieta seguiu-se o recomendado pelo *American Institute of Nutrition* (20), que estabelece como base a formulação AIN-93G, adequada ao crescimento, gestação e lactação de roedores. A caseína utilizada na elaboração da dieta apresentou concentração de proteína adequada (85,07%), conforme laudo do fornecedor.

Como descrito por Reeves e colaboradores em 1993, a dieta apresenta em sua composição a concentração mínima de leucina de 1,54g/100g (1,5%). Para o grupo tratado com leucina foi fornecida dieta padrão modificada na concentração de leucina (5%) 5,0g/100g (21). As dietas foram confeccionadas em laboratório com controle para riscos de contaminação química e biológica.

As dietas e água foram oferecidas *ad libitum*, sendo que os animais dos quatro grupos experimentais iniciaram com suas respectivas dietas 21 dias antes do início do experimento.

Tratamento com Doxorrubicina

Os animais receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de Doxorrubicina (FaulDoxo, Libbs Farmacêutica, Embú, São Paulo), três vezes por semana, durante duas semanas, atingindo-se dose cumulativa de 7,5 mg/kg adaptado de Campos e colaboradores (22). O grupo C recebeu volume semelhante de solução salina 0,9% no mesmo período empregado aos animais tratados com Doxorrubicina.

Duas semanas após a última dose de Doxorubicina os animais foram eutanasiados. Os mesmos foram pesados e anestesiados utilizando-se Ketamina 74 mg/kg e Xilazina 8 mg/kg via injeção intraperitoneal. Imediatamente após a anestesia o fígado foi removido após incisão abdominal. Em seguida o órgão foi pesado e lavado com solução gelada (4°C) de NaCl 0,9%, particionado em frações e secos em papel filtro parte congelados em nitrogênio líquido, para posterior análise do estresse oxidativo e a outra parte fixados em solução de formalina a 4% para análise histológica.

Coleta das amostras e preparo dos tecidos

Logo após a eutanásia, o fígado de cada animal foi removido, uma fração congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer a -80°C. Após descongelamento os fragmentos hepáticos foram, macerados e homogeneizados em 20 mM de tampão fosfato de sódio, contendo 140 mM de KCl pH 7.4, na proporção (1:10 p/v). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 g durante 10 min. a 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi recolhido para a realização das dosagens dos parâmetros de estresse oxidativo.

Estresse Oxidativo

As análises oxidativas seguiram os protocolos adaptados por Diniz Vilela e colaboradores (23).

h) Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD se baseia na capacidade de auto oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente do radical superóxido. A inibição do auto oxidação do pirogalol ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente analisada em espectrofotômetro a 420 nm, em um meio contendo 50 mM de tampão Tris com 1 mM de EDTA pH 8.2, 80 U/ml de catalase, 0,38 mM de pirogalol e 15 µl de amostra. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão. A inibição de 50% da auto oxidação do pirogalol é definido como uma unidade de SOD.

i) Catalase

A catalase é uma enzima produzida pelo peroxissomo, cuja função é converter o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio. Na região do UV é possível observar a decomposição direta do H₂O₂ pela diminuição da absorbância a 240 nm. Para isso foi adicionado 10 µl de triton 10 % para cada 100 µl do homogeneizado, e

mantidos sob agitação. Após 15 minutos de repouso em gelo, 10 µl dessa amostra foi pipetada em poços de microplaca, onde foi adicionado 300 µl de solução de H₂O₂ (0,22% v:v em tampão fosfato de potássio 10 mM). A leitura da microplaca foi realizada imediatamente após adição da solução de H₂O₂ em intervalos de 15 segundos, durante 10 minutos, a 240 nm pelo equipamento fluorímetro Perkin Elmer-Em Spire Multimode Plate Reader.

j) Glutathiona reduzida (GSH).

Os conteúdos proteicos das amostras foram precipitados inicialmente pelo ácido metafosfórico (MPA) na proporção 1: 1 (homogeneizado / MPA). As amostras foram centrifugadas a 7000g durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as medições. Uma curva padrão de GSH (0,001-0,1 mM) foi feita para quantificar as amostras utilizando valores de regressão. O GSH reage com o ortoftalaldeído (OPT 1 mg/ml de metanol) diluído em fosfato de sódio monobásico, tampão (0,1 M) e EDTA (0,005 M). A leitura foi feita em fluorômetro com excitação de 350 nm e emissão de 420 nm.

k) Atividade da glutathiona peroxidase (Gpx).

Para quantificar a atividade da glutathiona peroxidase, o homogeneizado foi incubado com tampão Gpx (fosfato de potássio 100 mM com EDTA 1 mM, pH 7,7), azida de sódio 40 mM, GSH (diluído em ácido metafosfórico 5%), GR (Gpx diluído em tampão), NADPH (diluído com bicarbonato de sódio a 5%) e 0,5 mM Tert-butilo. A decomposição da concentração de NADPH foi avaliada por 10 minutos em espectrofotômetro, a 340 nm.

l) Atividade da Glutathiona Redutase (GR).

A quantificação da atividade enzimática da GR foi registrada por uma diminuição na concentração de NADPH nas amostras, utilizando-se GR Tampão (fosfato de sódio 200 mM pH 7,5, EDTA 6,3 mM) e NADPH. A leitura cinética foi realizada a 340 nm por 10 minutos.

m) Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

A atividade da G6PDH foi monitorada pela produção de NADPH com consequente aumento da absorbância a 340 nm. A análise foi realizada utilizando

uma microplaca, onde as amostras foram incubadas com Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), cloreto de magnésio, NADP + (0,5 mM) e glucose 6-fosfato (1 mM). A leitura cinética foi realizada por 10 minutos.

n) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 100 µl de amostra, 200 µl de ácido tricloroacético 10% e 300 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% em sulfato de sódio 7,1% foram misturados em microtubos. As soluções foram incubadas por duas horas em banho de água fervente (95°C). Posteriormente as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. O complexo rosa resultante foi extraído com 400µl de butanol. A fluorescência da fase orgânica foi lida a 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva de calibração foi realizada utilizando o 1,1,3,3-tetrametoxipropano e submetida ao mesmo tratamento que as amostras. Os níveis de TBARS foram calculados como nmol TBARS/mg de proteína.

Análise Histológica

Para a análise histológica foi padronizada a fração do lobo hepático direito. Os órgãos removidos foram fixados em solução de formalina a 4% (pH 7,2) por duas horas. Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e seguidas de duas trocas de xilol e em seguida embebidas em parafina para constituição dos blocos. Os cortes histológicos foram cortados com 5µ de espessura e montados em lâminas de vidro. Antes da coloração, os cortes foram desparafinizados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente.

Os cortes foram corados com tricrômico de Gomori para a visualização de morfologia geral e para quantificação de colágeno a coloração utilizada foi picrosirius red. As secções foram visualizadas a partir da câmera acoplada ao microscópio, do tipo Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Alemanha e as imagens obtidas utilizando-se objetiva de 40X.

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média± erro padrão da média (EPM), usando o software GraphPad Prism versão 5.0. Estes foram comparados pelo test *t* de *Student* ou

através da análise de variância (two way - ANOVA), conforme apropriado. Para verificar as diferenças entre os grupos, foi utilizado pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Ao final do estudo a mortalidade foi zero, o estado geral dos animais era bom, alguns do grupo doxorrubicina apresentaram uma mucosite oral leve.

Os resultados mostraram que o grupo DOX comparado ao LEU apresentou maior atividade antioxidante de SOD, catalase e Gpx, e níveis de GSH (Figura 1) e menores níveis de TBARS (Figura 2) e deposição de colágeno (Figura 3). O grupo DOX+LEU comparado ao grupo LEU também apresentou menores níveis de TBARS e de deposição de colágeno e, finalmente, o grupo DOX +LEU quando comparado ao grupo DOX apresentou menor atividade oxidante de TBARS e menor atividade antioxidante de SOD, catalase, Gpx e GSH.

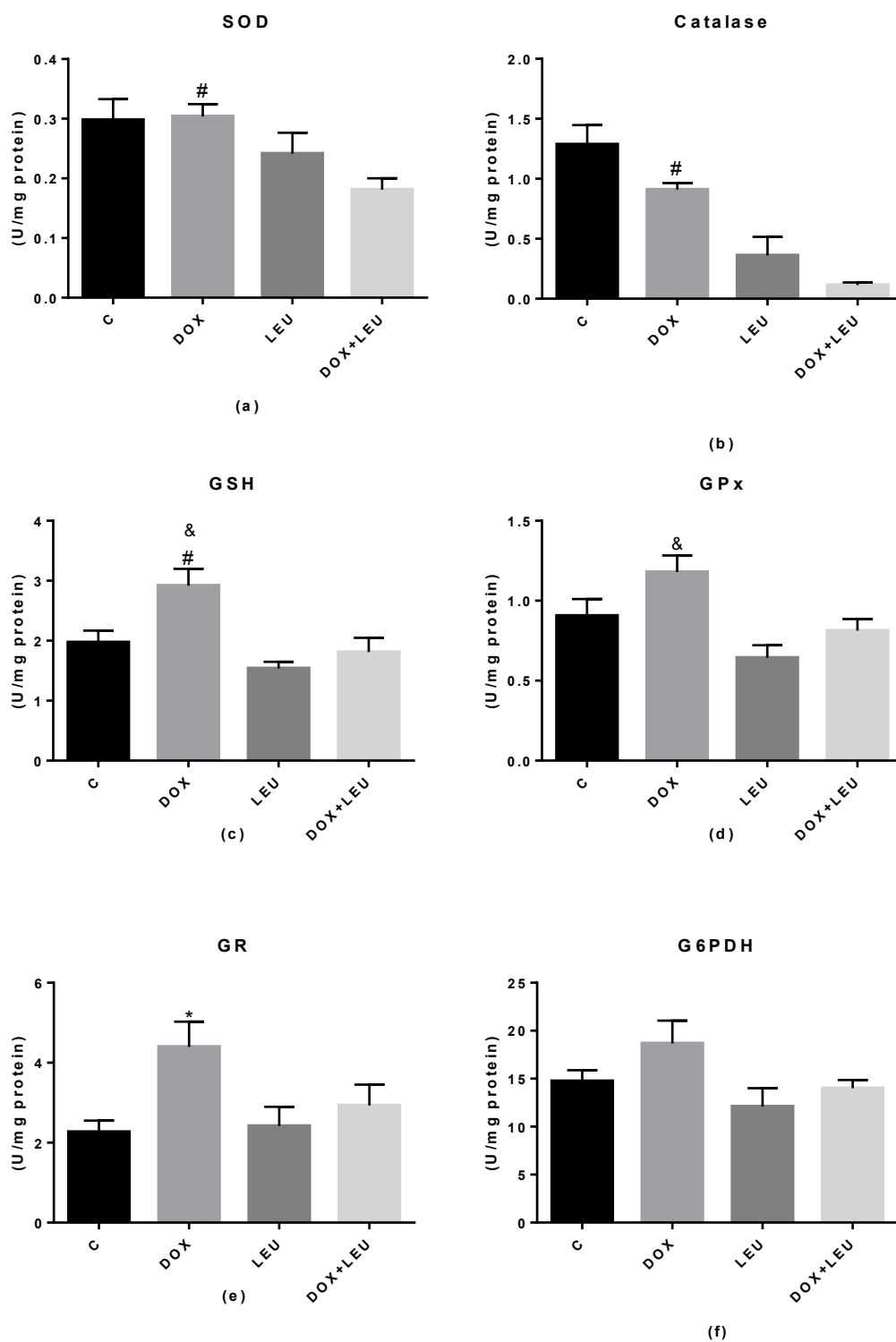


Figura 1: Sistema de defesa antioxidante no fígado de ratos tratados com Doxorubicina e/ou leucina. Atividade Glutaciona Reduzida (GSH) (c), Glutaciona Peroxidase (Gpx) (d), Glutaciona Redutase (GR) (e) e glucose6-phosphatedehydrogenase (G6PDH) (f).

* $p < 0,05$ versus controle (C), # $p < 0,05$ versus leucina (LEU) e & $p < 0,05$ versus Doxorubicina mais leucina (DOX+LEU).

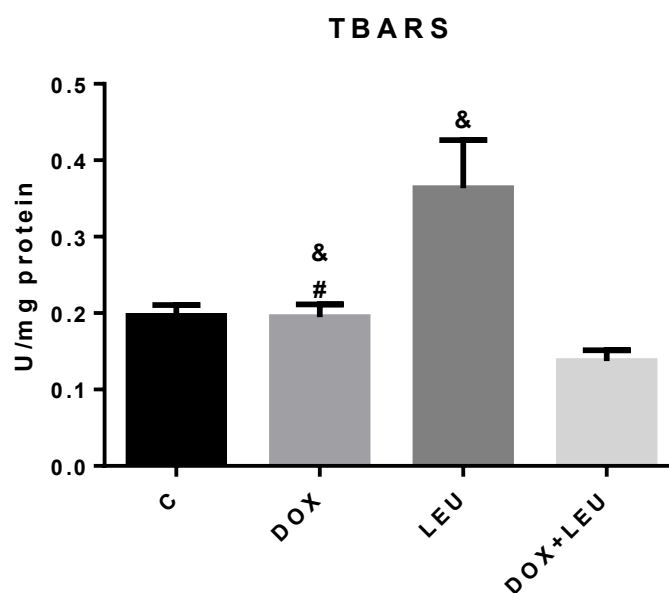


Figura 2: Análise da peroxidação lipídica (TBARS) no fígado de ratos tratados com Doxorubicina e/ou leucina. * $p < 0,05$ versus controle (C), # $p < 0,05$ versus leucina (LEU) e & $p < 0,05$ versus Doxorubicina mais leucina (DOX+LEU).

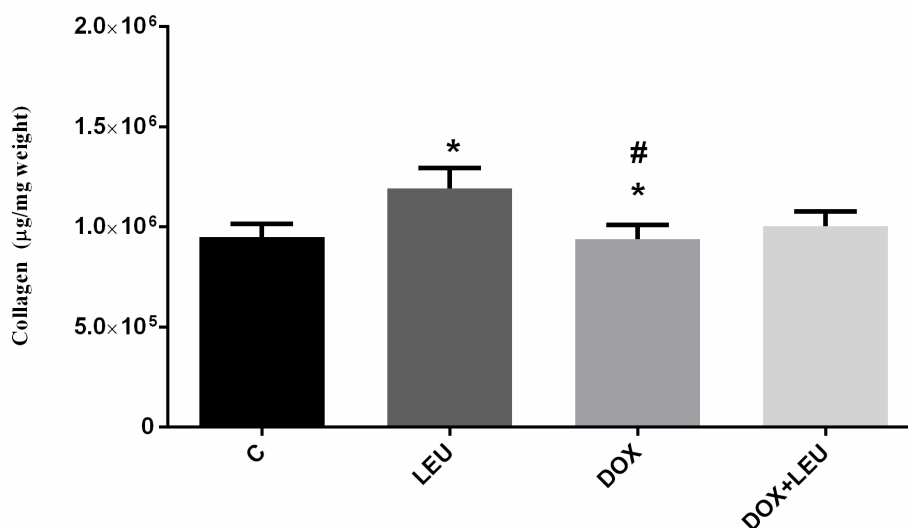


Figura 3: Deposição total de colágeno (mg/mg peso úmido) no Fígado.
* $p < 0,05$ versus controle (C), # $p < 0,05$ versus leucina (LEU).

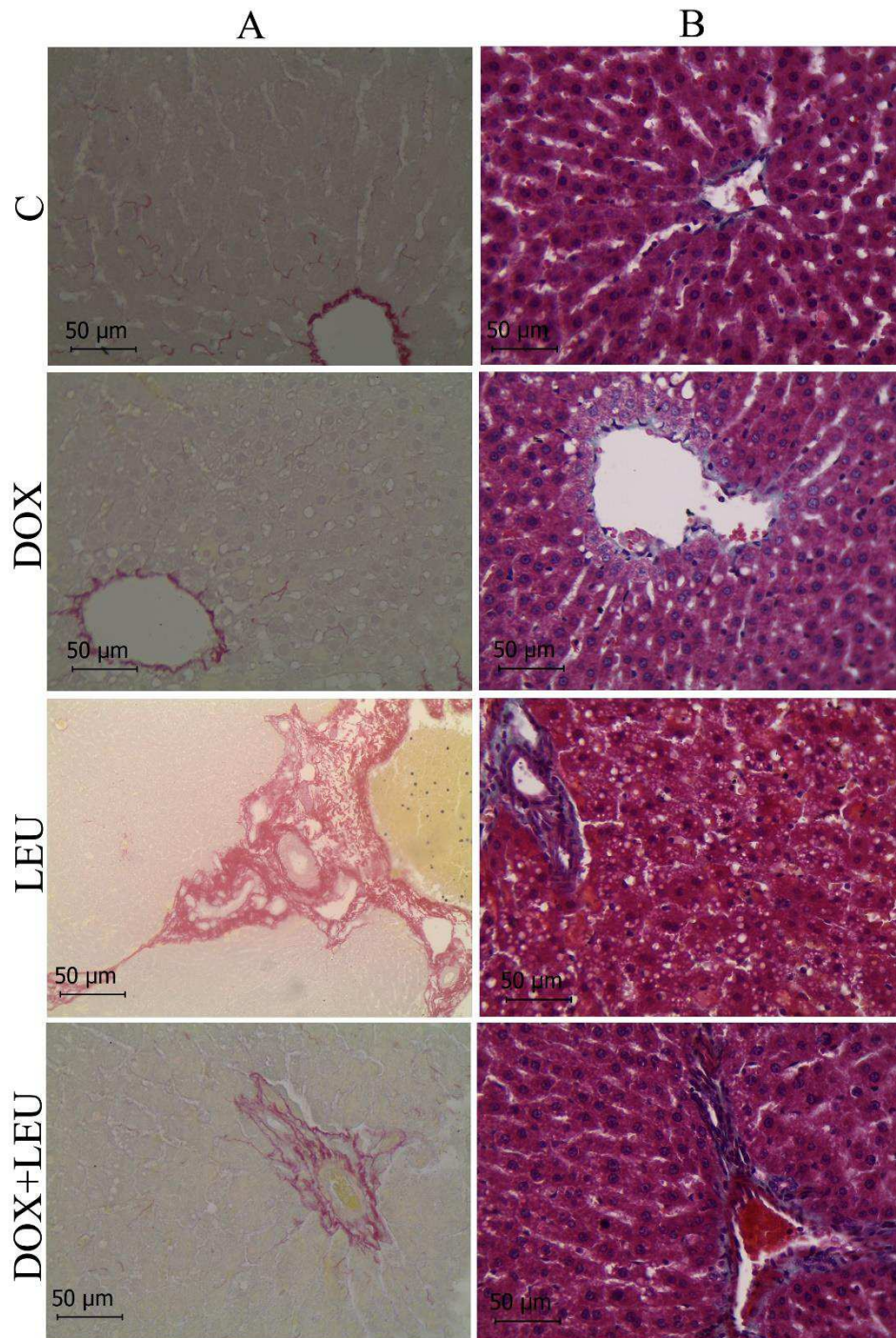


Figura 4: Em (A) observamos lâminas de fígado coradas com Picrosirius red, onde se observa a maior deposição de colágeno no grupo leucina (LEU). Em (B) a coloração de tricrômico de gomori, onde é possível observar maior grau de degeneração gordurosa no grupo leucina (LEU) e pontos de necrose perivenosa central no grupo Doxorubicina (DOX). (Objetiva 40x)

4. DISCUSSÃO

A doxorubicina é um quimioterápico, da classe das antraciclina, usado com sucesso no tratamento de vários tumores malignos sólidos e hematológicos, a exemplo de câncer de mama, de bexiga, linfoma, sarcoma e tumores sólidos infantis. É uma droga citotóxica potente, isolada a partir de colônias de *Streptomyces peucetius*, amplamente utilizada na prática oncológica humana desde 1970. Sua descoberta representou um dos grandes avanços no tratamento do câncer. Este xenobiótico apresenta um anel quinona em sua molécula que é de especial interesse por seu potencial em gerar radicais livres, uma vez que pode funcionar como doador e receptor de elétrons (24, 25).

Apesar de sua eficácia no tratamento antineoplásico, a citotoxicidade da DOX é o principal fator limitante para o uso na prática clínica (26). Pequenas quantidades de DOX são capazes de formar muitos radicais superóxido. Estes radicais, por sua vez, podem ser convertidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio, em reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (27, 28).

No presente estudo, o grupo DOX apresentou maior atividade da GR e dos níveis de GSH em comparação ao grupo controle e maior atividade das enzimas SOD e catalase e dos níveis de GSH e Gpx comparado à leucina. Este resultado também foi encontrado por Li e colaboradores 2017, que demonstraram maior atividade de GSH associado ao uso de DOX em tumores. (29).

A comparação do grupo tratado com leucina com o controle mostrou aumento da atividade oxidante, medida pelo TBARS e maior teor ou deposição de colágeno e redução do TBARS quando comparado ao grupo DOX+LEU aos grupos DOX e LEU. Este resultado é semelhante ao encontrado por Shimomura e colaboradores 2006, que utilizando altas concentrações de leucina demonstraram a ocorrência do “Paradoxo de Harper” ou “paradoxo da leucina” que reduz a concentração dos aminoácidos valina e isoleucina no organismo quando suplementa a dieta com leucina, pois estimula o aumento da oxidação dos aminoácidos isoleucina e valina o que pode ser devido, em parte, a estimulação da oxidação do *Branched-Chain Amino Acids* – BCAA, através da ativação do complexo de ceto-ácido desidrogenase de cadeia ramificada, o que pode contribuir com o aumento do estresse oxidativo (30, 31).

A peroxidação lipídica medida pelo TBARS resulta na produção de uma grande variedade de aldeídos, incluindo o malonaldeído (MDA), que afeta diretamente a membrana plasmática alterando sua permeabilidade e, conseqüentemente, a função celular. O MDA é um importante

produto da peroxidação lipídica além de funcionar como indicador da produção de espécies reativas de oxigênio (32, 33).

A atividade de SOD e catalase e os níveis de GSH foram reduzidos no grupo DOX-LEU em relação ao controle e DOX demonstrando uma possível redução do estresse oxidativo. Cruz e colaboradores 2017 mostraram que a leucina pode prevenir a degradação muscular devido à diminuição do índice de caquexia, porém não verificaram os níveis do estresse oxidativo (34). Além disso o grupo DOX+LEU apresentou redução da peroxidação lipídica em relação ao grupo DOX.

Sabe-se que existe uma importante correlação entre os níveis de glutathione em sua forma reduzida e os mecanismos enzimáticos de defesa. Esta observação tem promovido uma série de estudos clínicos sobre a interdependência entre o aumento dos níveis de glutathione no plasma e doenças cancerígenas, por exemplo (35).

Está bem estabelecido na literatura que problemas na síntese e metabolismo da glutathione estão associados a algumas doenças. A dosagem da atividade do sistema antioxidante da glutathione e das enzimas que atuam no seu metabolismo pode ser útil no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como de outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (36). Mudanças na concentração deste tripeptídeo podem ser um indicador útil em certas desordens fisiológicas como anemias causadas por infecção ou seguidas pela administração de alguns xenobióticos como a doxorrubicina (37, 38). Esta informação pode explicar os resultados encontrados no sistema glutathione no grupo DOX, comparado ao grupo C.

Esses resultados são animadores, entretanto mais estudos são necessários para implementar a suplementação com leucina as práticas clínicas futuras.

5. CONCLUSÃO

A leucina adicionada à dieta administrada aos ratos tratados com doxorubicina mostrou efeito hepatoprotetor evidenciado pela redução do estresse oxidativo medido pela redução dos antioxidantes GSH, Gpx, SOD e catalase e da atividade de peroxidação lipídica. Também ocorreu redução da deposição de colágeno no grupo DOX+LEU comparado ao DOX. Esses resultados são animadores, entretanto mais estudos são necessários para implementar a suplementação com leucina as práticas clínicas futuras.

Conflitos de Interesses

Os autores declaram que não há conflitos de interesse em relação à publicação deste artigo.

REFERENCIAS

1. NAKAGE A. P. M, SANTANA A. E, “Avaliação das funções hepática e renal de cães expostos ao antineoplásico Doxorubicina”. Revista acadêmica: ciência animal 2008; vol.06, n: 03.
2. SILVA C.E.V, CAMACHO A.A, “Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com Doxorubicina “, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2005; n:3, 300-306.
3. MÖRSCHBÄCHER, P. D., “Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas em cardiomiopatia dilatada não isquêmica induzida com Doxorubicina em coelhos Nova Zelândia”, Mestrado- Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Orientador: Contesini, Emerson Antônio , 2012.
4. CRAWLEY, M. J, “Generalized linear models in the r book”. Toxicology 2007, vol. 189, 113-127.
5. KIRIAQUE B. F. et al, “Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios” Rev. Nutr 2010; n: 4, 629-643.
6. TABACZAR S et al., “The effect of the nitrite pirolidon oxidative stress induced by Doxorubicin and taxanes in the rat brain”. J Physiol Pharmacol 2017; n: 2, 295-308.
7. BIRBEN e et al. REVIEW ARTICLE Oxidative Stress and Antioxidant Defense. World Allergy Organ J. 2012; n: 1, 9–19.
8. EVANS W K. Rationale for the treatment of non-small cell lung cancer, Lung Cancer 1993; 5-14.
9. PAGE R. L., et al, “Phase III evaluation of Doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma”. International Journal of Hyperthermia 1992; n: 2.
10. ZWEIT J et al, “Excitation functions of proton induced reactions on cobalt: Production of no-carrier added nickel-57, a positron emitting label for Doxorubicin”, Applied Radiation and Isotopes 1993, n: 12, 1411-1416.

11. MYERS, C. “Anthracyclines and DNA intercalators”, *Cancer medicine* 1993; 764-772.
12. LIU Y and THURMAN R G. “Potentiation of adriamycin toxicity by ethanol in perfused rat liver”. *The journal of pharmacology experimental therapeutics* 1992; n: 2, 651-656.
13. HALLIWELL, B., “Oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease”. *Am. j. med* 1991; n:3 S14-S22.
14. SHIMOMURA Y, HARRIS RA. “Metabolism and physiological function of branched chain amino acids: Discussion of Session 1”. *J. nutr* 2006; n: 136, 232-233.
15. ROBERTS C.K. and SINDHU K.K, “Oxidative stress and metabolic syndrome”, *life sciences* 2009; n:1 21 705–712.
16. IMAMURA W et al, “Adverse effects of excessive leucine intake depend on dietary protein intake: A Transcriptomic Analysis to identify useful biomarkers”, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2013; n: 1 45-55.
17. TANIGUCHI M, et al, “ Effects of arginine and leucine substitutions on anti-endotoxic activities and mechanisms of action of cationic and amphipathic anti microbial octadecapeptide from rice α -amylase.”, *Peptide Science* 2017; n: 3, 252-260.
18. RIEGER E et al, “Neuroprotective Effect of Creatine and Pyruvate on Enzyme Activities of Phosphoryl Transfer Network and Oxidative Stress Alterations Caused by Leucine Administration in Wistar Rats”, *Neurotoxicity Research* 2017; 1-10.
19. FAN Q et al. Dietary leucine supplementation alters energy metabolism and induces slow-to-fast transitions in longissimus dorsi muscle of weanling piglets. *Journal of Nutrition* 2017; n: 117, 1222–1234.
20. CRUZ B, GOMES-MARCONDES MC, “Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by walker-256 tumour”. *Reprod biol endocrinol* 2014; vol.12, n:2.
21. CHETEY E H et al. Human cancer-associated fibroblasts enhance glutathione levels and antagonize drug-induced prostate cancer cell death. *Cell Death Dis.* 2017; n:6 2848.

22. CAMPOS E. C et al. "Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic Doxorubicin-induced cardiomyopathy", *European Journal of Pharmacology* 2011; vol. 670, 541–553.
23. DINIZ-VILELA D et al. "The role of metformin in controlling oxidative stress in muscle of diabetic rats". *Oxid Med Cell Longev.* 2016.
24. WITHAMMD. et al. "Effects of vitamin D supplementation on markers of vascular function after myocardial infarction--a randomized controlled trial". *Int j cardiol.* 2013, n: 03, 745-9.
25. REEVES P G, "Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76 a diet" *J Nutr.* 1997; n: 127 838S-841S.
26. VIVIANE COSTA JUNQUEIRA ROCHA, "Estratégia para reduzir a cardiotoxicidade da Doxorubicina (Dox) sem afetar sua atividade antineoplásica"– Dissertação de Mestrado Fio Cruz-Bahia, 2010.
27. DENG, S et al, "GP91phox-containing NADPH oxidase increases superoxide formation by Doxorubicin and NADPH". *Free radical biology & medicine* 2007; n. 4, 466-473.
28. NAGI, M.N et al. "Protective effect of thymoquinone against Doxorubicin – induced cardiotoxicity in rats: a possible mechanism of protection". *Pharmacological research,* 2000; n: 3, 283-289.
29. LI Y et al, "Preparation and characterization of Dox loaded keratin nanoparticles for pH/gsh dual responsive release". *Materials Science and Engineering* 2017; vol. 1, n: 73 189-197.
30. SHIMOMURA Y et al. "Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids", *J Nutr.* 2006; vol. 136, 232S-3S.
31. HARPER AE et al. "Branched-chain amino acid metabolism" - Annual review of nutrition, 1984 anualreviews.org.

32. ANDREADOU I et al, “Acute Doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress”. Journal of molecular and cellular cardiology 2007; n:3, 549-558.
33. BALACHANDAR, A.V et al, “Protective role of dl α -lipoic acid against adriamycin-induced cardiac lipid peroxidation”. human& experimental toxicology 2003; vol. 22, n: 5, 249-254.
34. CRUZ B et al. “L leucine dietary supplementation modulates muscle protein degradation and increases pro-inflammatory cytokines in tumour-bearing rats” Cytokine 2017; vol.96, 253-260.
35. GABRIELA FULLIN RESENDE TEODORO, Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada atenua em proles os efeitos mediados pela dieta materna restrita em proteína - Dissertação de mestrado- Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos
36. LAÉRCIO R J et al; Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo, Quim. Nova 2001, n: 1, 112-119.
37. OBERLEY TD, OBERLEY LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. 1997; n: 2, 525-35.
38. DENEKE S M, FANBURG BL. Regulation of cellular glutathione. Am J Physiol 1989; n: 4, 163 - 73.

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO RENAL NA SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA EM DIETA DE RATOS TRATADOS COM DOXORRUBICINA

Poliana Rodrigues Alves Duarte¹, Danielle Diniz Vilela², Renata Roland Teixeira², Douglas Carvalho Caixeta², Adriele Vieira de Souza², Simone Ramos Deconte³, Clesnan Mendes-Rodrigues¹, Thiago Montes Fidale¹, Foued Salmen Espindola², Elmiro Santos Resende¹.

1. Faculdade de Medicina - Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brasil

2. Instituto de Genética e Bioquímica - Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

3. Instituto de Fisiologia - Universidade Federal de Uberlândia, 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito nefroprotetor da dieta suplementada com leucina em ratos tratados com DOX. A nefrotoxicidade causada pela doxorubicina (DOX), droga amplamente utilizada em tratamentos oncológicos, é um dos fatores limitantes para o seu uso por desencadear lesões crônicas atribuídas ao aumento do estresse oxidativo. O experimento envolveu 36 animais divididos em quatro grupos (C-controle, DOX-doxorrubicina, LEU-leucina, DOX+LEU-doxorrubicina+leucina). Os animais dos grupos com doxorubicina receberam dose cumulativa até 7,5 mg/kg; os dos grupos com leucina tiveram a dieta acrescida em 5% deste aminoácido. O estresse oxidativo tecidual renal foi avaliado pelas dosagens das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (Gpx), glutathione reductase (GR) e dos níveis de glutathione reduzida (GSH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e da peroxidação lipídica. O teor de colágeno renal foi avaliado por análise histológica. Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), usando o software GraphPad Prism versão 5.0. Os resultados foram comparados pelo Teste *t* de Student ou através da análise de variância (two way -ANOVA) complementada pelo teste de Tukey, conforme apropriado, e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Os resultados mostraram aumento no estresse oxidativo no grupo LEU evidenciado pelo aumento de GR. Houve redução no número total de glomérulos em todos os grupos tratados. Não houve alteração na deposição de colágeno em nenhum dos grupos C. A suplementação dietética com 5% de leucina administrada a ratos Wistar não alterou o estresse oxidativo renal com ou sem a presença de doxorubicina, conforme aferições dos antioxidantes GSH, Gpx, SOD, catalase e TBARS. A administração isolada da leucina na dose descrita, aumentou o estresse oxidativo renal, conforme demonstrado pela elevação da GR. Tanto a leucina, isoladamente ou em associação à doxorubicina, como a doxorubicina isoladamente produziram lesão renal caracterizada pela perda de glomérulos.

Palavras Chave: Doxorubicina; Leucina; Estresse Oxidativo; Nefroproteção.

1. INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX), uma droga antineoplásica, é amplamente utilizada na oncologia. É considerado como um dos mais potentes quimioterápicos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) (1). Contudo, os efeitos colaterais induzidos pela DOX, como a cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e a nefrotoxicidade limitam suas aplicações clínicas. (2).

Há muitos estudos que sugerem que o efeito nefrotóxico da DOX seja mediado pela grande quantidade de espécies reativas de oxigênio geradas (ROS), fato que induz a peroxidação lipídica, o dano oxidativo das células renais, um aumento da permeabilidade capilar glomerular e alterações da arquitetura tubular (3). A expressiva produção de ROS causa a ativação da cascata do estresse oxidativo e depleção de antioxidantes endógenos que desencadeiam resposta imune e medeiam a inflamação. Com isso há mudanças estruturais e funcionais das macromoléculas orgânicas que, em seu curso final, induzem apoptose e redução dos glomérulos (3, 4).

A suplementação nutricional é uma área promissora na pesquisa clínica, e tem a finalidade de atenuar ou de neutralizar efeitos e mudanças físicas provocadas pelas doenças ou decorrentes de efeitos colaterais dos tratamentos utilizados. A suplementação dietética com aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) tem demonstrado recuperar a massa muscular esquelética diminuída no processo do envelhecimento ou devido a doenças como diabetes e câncer (5). Dentre os BCAA, a leucina é conhecida por melhorar o metabolismo do músculo esquelético e a regulação da síntese de proteínas. Os BCAA, e particularmente a leucina, são aminoácidos envolvidos na regulação metabólica em animais. Além de servir como substrato para síntese proteica, a leucina também está envolvida em vários processos celulares como metabolismo energético e regeneração tecidual. Muitos estudos indicaram que a leucina pode regular a biogênese mitocondrial, a absorção de glicose e a oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético que é um tecido adaptativo com grande produção e armazenamento de energia e elevado *turnover* de proteína. Estudos anteriores mostraram também que a leucina estimula a síntese proteica nos músculos esqueléticos através da via da mTOR (6,7,8,9).

Até o presente momento não há estudos divulgados que tenham avaliado os efeitos sobre o estresse oxidativo aferido a nível renal da associação da doxorubicina com a leucina administrada como suplementação dietética.

O presente estudo se justifica pela importância clínica de se investigar terapias coadjuvantes que possam diminuir a citotoxicidade causada pela doxorubicina com o

objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes durante e após o período de tratamento com o antineoplásico (10, 11).

Este estudo tem o objetivo de investigar o possível efeito nefroprotetor da leucina na nefrotoxicidade induzida pela DOX em ratos Wistar utilizando-se medidas do estresse oxidativo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações éticas

Todas as intervenções foram conduzidas conforme as normatizações próprias e específicas de bioética em pesquisa com animais: Lei nº 6,638, de 8 de março de 1979 e Decreto no 645, de 10 de julho de 1945. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA-UFU, Protocolo 115/14).

Animais

Foram utilizados 36 ratos Wistar, machos, com aproximadamente 12 semanas de idade e com peso variando entre 250g e 300g. Os animais foram alojados no biotério da instituição, com ambiente controlado, sendo monitorados diariamente e com livre acesso à ração e água.

Grupos e tratamentos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: C (Controle) com oito animais, DOX (Doxorrubicina) com dez animais, LEU (Leucina) com oito animais e DOX+LEU (Doxorrubicina e Leucina) com dez animais.

Formulação das dietas

Os grupos LEU e DOX+LEU tiveram a ração acrescida com 5% de leucina. Para a elaboração da dieta seguiu-se o recomendado pelo *American Institute of Nutrition* (12), que estabelece, como base, a formulação AIN-93G, adequada ao crescimento, gestação e lactação de roedores. A caseína utilizada na elaboração da dieta apresentou concentração de proteína adequada (85,07%), conforme laudo do fornecedor.

Como descrito por Reeves e colaboradores em 1993, a dieta apresenta em sua composição a concentração mínima de leucina de 1,54g/100g (1,5%). Para o grupo tratado com leucina foi fornecida dieta padrão acrescida de 5,0g/100g (5%) de leucina do total de nutrientes da dieta, como já demonstrado em experimento previamente realizado (13)

As dietas foram confeccionadas em laboratório com controle para riscos de contaminação química e biológica.

As dietas e água foram oferecidas *ad libitum*, sendo que os animais dos quatro grupos experimentais receberam suas respectivas dietas por 21 dias antes de serem iniciadas as aplicações de Doxorubicina.

Tratamento com Doxorubicina

Os animais dos grupos DOX e DOX+LEU receberam injeções intraperitoneais de cloridrato de doxorubicina (FaulDOXo, Libbs Farmacêutica, Embú, São Paulo), três vezes por semana, por duas semanas, atingindo-se a dose cumulativa de 7,5 mg/kg (14).

O grupo C recebeu volume intraperitoneal semelhante de solução salina a 0,9% durante o mesmo período dos animais tratados com Doxorubicina.

Coleta das amostras e preparo dos tecidos

Duas semanas após a última dose de doxorubicina os animais foram pesados e anestesiados utilizando-se Ketamina 74 mg/kg e Xilazina 8 mg/kg, via injeção intraperitoneal. Imediatamente após a anestesia, os rins foram removidos após incisão abdominal. Em seguida os órgãos foram pesados e lavados com solução gelada (4 °C) de NaCl 0,9%, removidos e secos em papel filtro sendo o rim direito congelado em nitrogênio líquido para posterior análise do estresse oxidativo e o rim esquerdo fixado em solução de formalina a 4% para análise histológica.

Os rins direitos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C. Após descongelamento, os rins foram macerados e homogeneizados em 20 mM de tampão fosfato de sódio, contendo 140mM de KCl, pH 7.4, na proporção (1:10 p/v). Os homogeneizados foram centrifugados a 800g durante 10 min, a 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante foi recolhido para a realização das dosagens dos parâmetros de estresse oxidativo.

Estresse Oxidativo

As análises oxidativas seguiram os protocolos adaptados por Diniz Vilela e colaboradores (15).

o) Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A medida da atividade da SOD se baseia na capacidade de auto-oxidação do pirogalol, um processo altamente dependente do radical superóxido. A inibição da auto-oxidação do pirogalol ocorre na presença da SOD, cuja atividade pode ser indiretamente analisada em espectrofotômetro a 420 nm, em um meio contendo 50 mM de tampão Tris com 1 mM de EDTA pH 8.2, 80 U/ml de catalase, 0,38 mM de pirogalol e 15 µl de amostra. Uma curva de calibração foi realizada com SOD purificada como padrão. A inibição de 50% da auto-oxidação do pirogalol é definido como uma unidade de SOD.

p) Catalase

A catalase é uma enzima produzida pelo peroxissomo que tem a função de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio. Na região do UV é possível observar a decomposição direta do H_2O_2 pela diminuição da absorbância a 240 nm. Para isso foram adicionados 10 µl de triton 10 % para cada 100 µl do homogeneizado, e mantidos sob agitação. Após 15 minutos de repouso em gelo, 10 µl dessa amostra foram pipetados em poços de microplaca, onde foram adicionados 300 µl de solução de H_2O_2 (0,22% v:v em tampão fosfato de potássio 10 mM). A leitura da microplaca foi realizada imediatamente após adição da solução de H_2O_2 em intervalos de 15 segundos, durante 10 minutos, a 240 nm, pelo equipamento fluorímetro Perkin Elmer- EnSpire Multimode Plate Reader.

q) Glutathiona reduzida (GSH).

Os conteúdos proteicos das amostras foram precipitados inicialmente pelo ácido metafosfórico (MPA) na proporção 1: 1 (homogeneizado / MPA). As amostras foram centrifugadas a 7000g durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as medições. Uma curva padrão de GSH (0,001-0,1 mM) foi feita para quantificar as amostras utilizando valores de regressão. O GSH reage com o orto-ftalaldeído (OPT 1mg / ml de metanol) diluído em fosfato de sódio monobásico, tampão (0,1 M) e EDTA (0,005 M). A leitura foi feita em fluorômetro com excitação de 350 nm e emissão de 420 nm.

r) Atividade da glutathiona peroxidase (Gpx).

Para quantificar a atividade da glutathiona peroxidase, o homogeneizado foi incubado com tampão Gpx (fosfato de potássio 100 mM com EDTA 1 mM, pH 7,7),

azida de sódio 40 mM, GSH (diluído em ácido metafosfórico 5%), GR (Gpx diluído em tampão), NADPH (diluído com bicarbonato de sódio a 5%) e 0,5 mM Tert-butilo. A decomposição da concentração de NADPH foi avaliada por 10 minutos em espectrofotômetro, a 340 nm.

s) Atividade da Glutathione Redutase (GR).

A quantificação da atividade enzimática da GR foi registrada por uma diminuição na concentração de NADPH nas amostras quando utilizado GR Tampão (fosfato de sódio 200 mM pH 7,5, EDTA 6,3 mM) e NADPH. A leitura cinética foi realizada a 340 nm, por 10 minutos.

t) Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

A atividade da G6PDH foi monitorada pela produção de NADPH com consequente aumento da absorbância a 340 nm. A análise foi realizada utilizando-se uma microplaca onde as amostras foram incubadas com Tris-HCl (100 mM, pH 7,5), cloreto de magnésio, NADP + (0,5 mM) e glucose 6-fosfato (1 mM). A leitura cinética foi realizada por 10 minutos.

u) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 100 µl de amostra, 200 µl de ácido tricloroacético 10% e 300 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% em sulfato de sódio 7,1%, foram misturados em microtubos. As soluções foram incubadas por duas horas em banho de água fervente (95°C). Posteriormente as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 5 minutos. O complexo rosa resultante foi extraído com 400 µl de butanol. A fluorescência da fase orgânica foi lida a 515 nm (excitação) e 553 nm (emissão). Uma curva de calibração foi realizada utilizando-se o 1,1,3,3-tetrametoxipropano e submetida ao mesmo tratamento que as amostras. Os níveis de TBARS foram calculados como nmol TBARS/mg de proteína.

Análise Histológica

Para a análise histológica foi padronizado o rim esquerdo, que foram removidos e fixados em solução de formalina a 4% (pH 7,2), por duas horas. Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 90 e 100%) e

seguidas de duas trocas de xilol e, em seguida, embebidas em parafina para constituição dos blocos. Os cortes histológicos foram cortados com 5 μ de espessura e montados em lâminas de vidro. Antes da coloração os cortes foram desparafinizados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e lavados em água corrente.

Em seguida, os cortes foram corados com tricrômico de Gomori, para a visualização da morfologia geral. Para a quantificação de colágeno, a coloração utilizada foi o picrosirius red. A contagem dos glomérulos foi feita em 10 campos por lâmina e calculada a média. As secções foram visualizadas e as imagens obtidas utilizando-se objetiva de 10X, a partir da câmera acoplada ao microscópio, do tipo Leica Microsystems Inc., Wetzlar, Alemanha (16,17).

Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM), usando o software GraphPad Prism versão 5.0. Os resultados foram comparados pelo teste *t* de Student ou através da análise de variância (two way-ANOVA) complementada pelo teste de Tukey, conforme apropriado, e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$.

3. RESULTADOS

Evidenciou-se um aumento da glutathione redutase no grupo LEU, comparado aos demais grupos (Fig.1). A peroxidação lipídica, apresentou tendência de redução, porém sem significância estatística, no grupo DOX+LEU quando comparado ao DOX (Fig.2).

Verificou-se diminuição do número de glomérulos dos grupos LEU, DOX e DOX+LEU quando comparado ao controle (Fig.3 e 4). Houve tendência a uma menor deposição de colágeno dos grupos LEU e DOX+LEU, porém sem significância estatística, quando comparados ao grupo DOX (Fig.5).

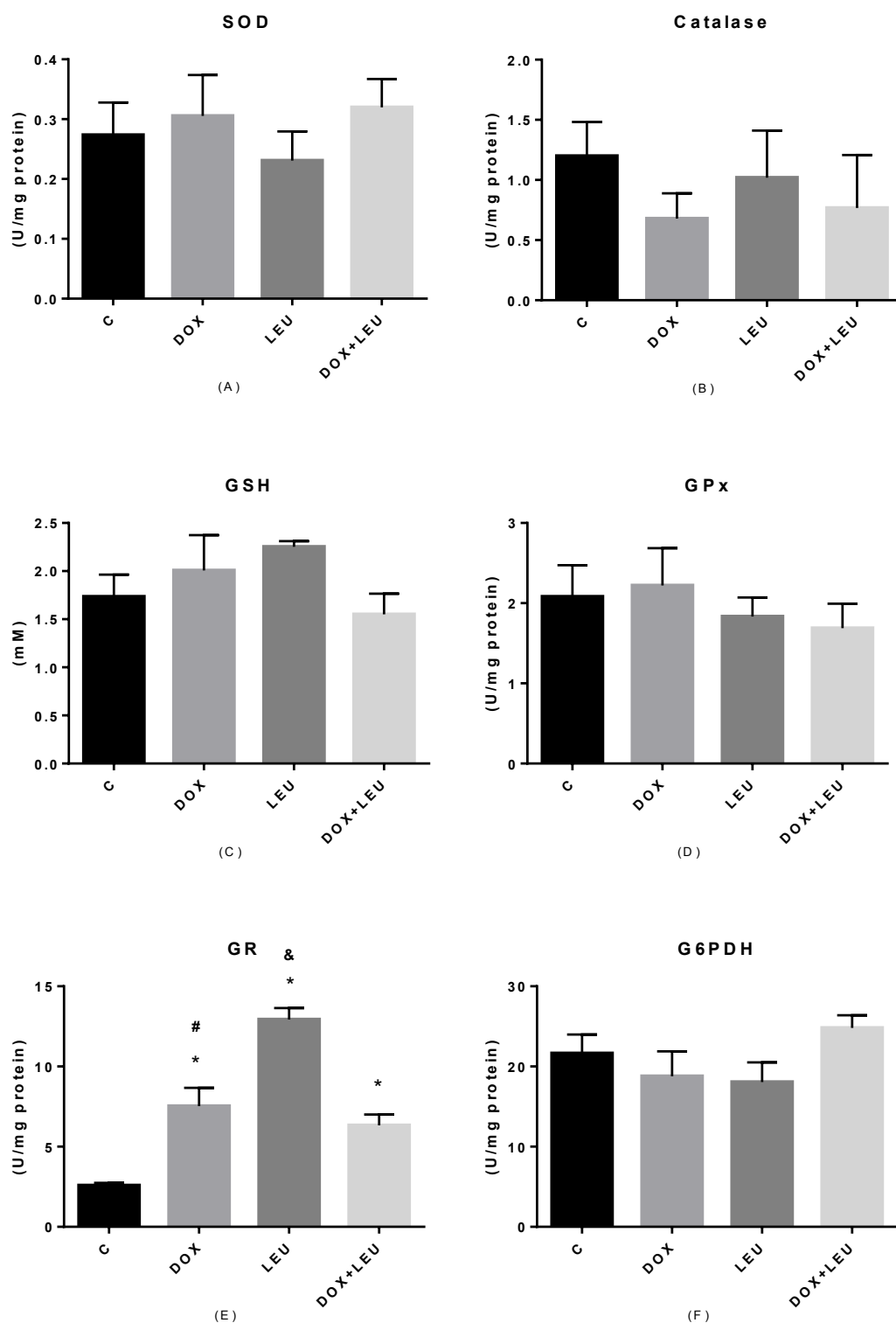


Figura 1: Sistema de defesa antioxidante no rim de ratos tratados com Doxorubicina e/ou Leucina. Atividade da Glutathione Redutase (GR) (E) apresentou maior atividade no grupo Leucina.

* $p < 0,05$ versus controle (C), # $p < 0,05$ versus leucina (LEU) e & $p < 0,05$ versus Doxorubicina mais Leucina (DOX+LEU).

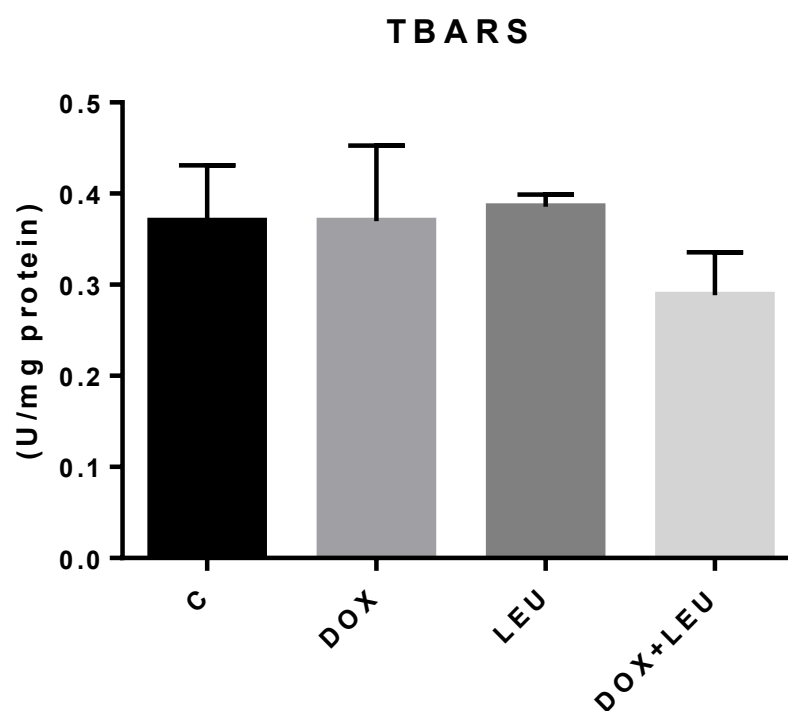


Figura 2: Análise da peroxidação lipídica no rim de ratos tratados com Doxorubicina e/ou Leucina. Não houve diferença significativa.

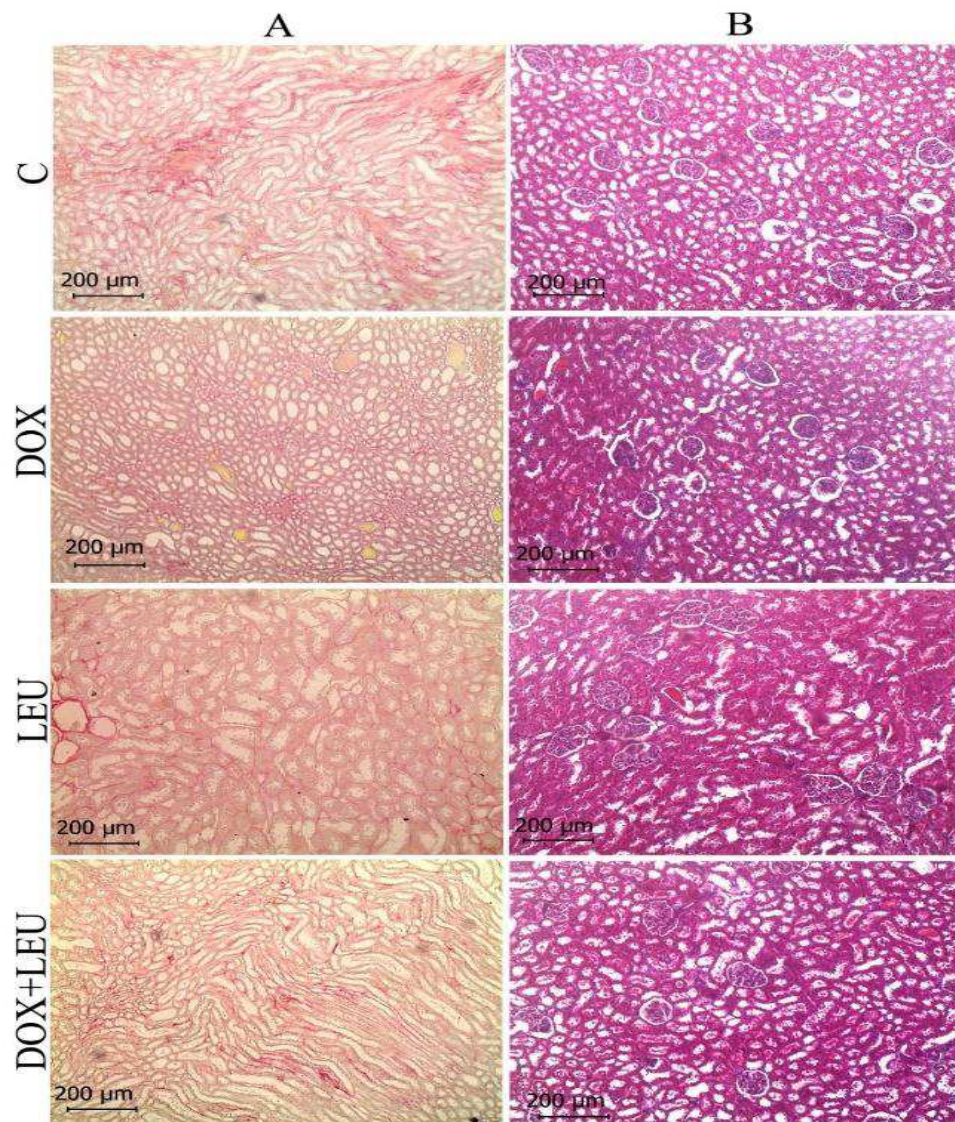


Figura 3: Em (A) lâminas de rim coradas com picrosirius red, onde se observa a deposição de colágeno (ns). Em (B) a coloração pelo tricrômico de Gomori, onde se observa menor número de glomérulos por área no grupo Leucina (10x).

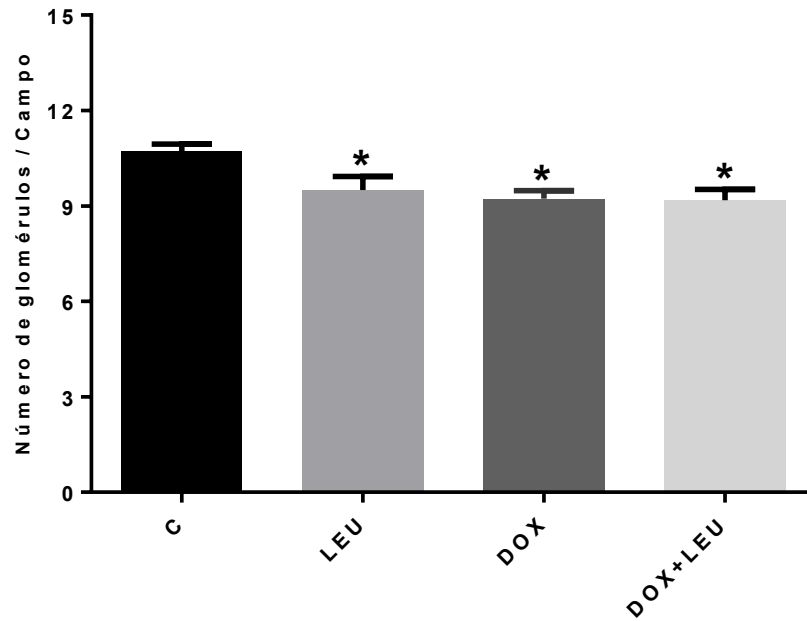


Figura 4: Média do número de glomérulos por campo. * $p < 0,05$ comparação versus Controle (C)

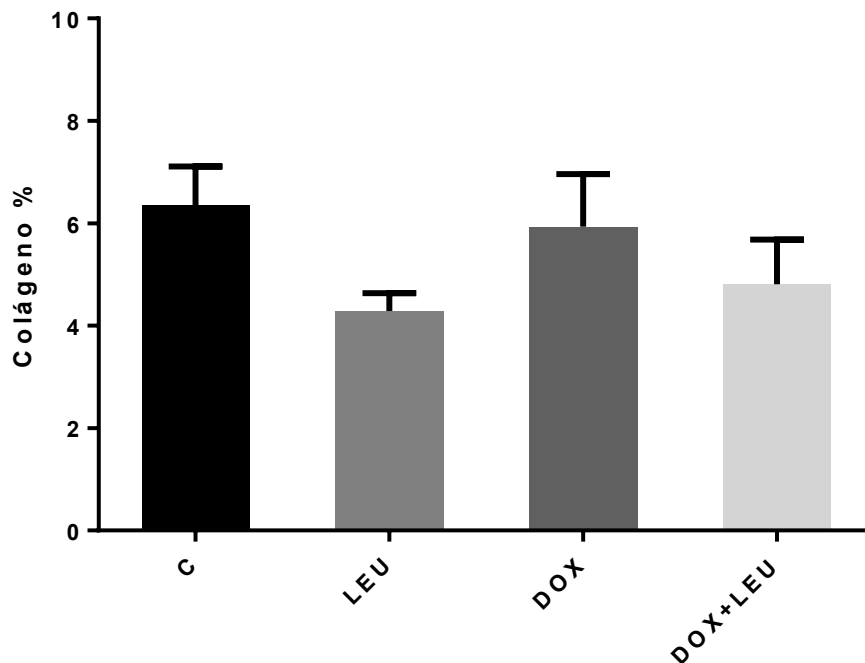


Figura 5: Deposição de colágeno no rim $\mu\text{g}/\text{mg}$ peso úmido. Não houve diferença significativa.

DISCUSSÃO

A doxorubicina tem efeito importante sobre as células tumorais mas, infelizmente, nas doses utilizadas, ela atua não apenas na formação tumoral mas também em células saudáveis e ainda se acumula nos tecidos, levando a toxicidades graves em diferentes órgãos, como os rins, fígado e coração, comprometendo o funcionamento destes e desencadeando quadros clínicos importantes e às vezes fatais (18, 19). Dentre estes efeitos indesejáveis, a nefrotoxicidade, quando instalada, continua a ser um dos mais desafiadores quadros para a condução clínica. O mecanismo provavelmente envolvido no desencadeamento destas lesões renais tem sido relacionado ao aumento do estresse oxidativo (20, 21).

No presente estudo procurou-se analisar o papel do estresse oxidativo a nível renal utilizando para essa finalidade uma série de aferições de substâncias que estão direta ou indiretamente ligadas a este aspecto específico do metabolismo, na presença de doxorubicina e/ou de leucina suplementada na dieta de ratos Wistar. Neste sentido evidenciou-se um aumento da glutathione redutase (GR) no grupo Leucina, quando comparado aos demais grupos. Uma explicação possível para este achado pode estar ligado ao chamado “Paradoxo de Harper” ou “Paradoxo da Leucina”. Este autor descreveu uma situação na qual se evidencia que quantidades aumentadas de leucina podem estimular um complexo enzimático da desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (valina e isoleucina) produzindo aumento do estresse oxidativo (22, 23, 24).

Esta exposição maior à leucina que foi acompanhada de aumento da GR não aconteceu quando doxorubicina e leucina estiveram presentes no grupo DOX+LEU por motivo ainda não explicado. Pode-se especular pelo menos três possibilidades para explicar este aumento da GR produzida pela leucina isoladamente. A primeira delas diz respeito à toxicidade celular da doxorubicina que poderia inibir parte das ações de grupos de enzimas envolvidas na gênese do estresse oxidativo quando na presença de maiores concentrações de leucina. Esta ação poderia mascarar o efeito da leucina. A segunda explicação poderia estar vinculada a uma eventual redução de absorção da leucina devido ao envolvimento do trato gastrointestinal na toxicidade à doxorubicina (24). Para solucionar esta questão são necessários estudos especialmente desenhados para esta finalidade.

A peroxidação lipídica aferida pelo TBARS apresentou tendência de redução no grupo DOX+LEU comparado ao DOX, porém não houve diferença estatisticamente significativa. Uma hipótese para a não detecção do aumento da peroxidação lipídica é a de que a dose administrada de doxorubicina tenha sido insuficiente para estabelecer um modelo de

nefrotoxicidade mais intensa. Alguns estudos (25) verificaram esta mesma nefrotoxicidade empregando doses cumulativas mais elevadas do que a utilizada no presente estudo (7,5mg/kg x 15mg/kg) e encontraram resultados diferentes dos aqui relatados. Esta informação também pode justificar a inexistência de diferença significativa entre os grupos quanto à deposição de colágeno, resultado também encontrado por El-Sayed e colaboradores (26). É preciso ainda assinalar que houve uma tendência à redução de colágeno renal nos grupos que receberam a leucina (LEU e DOX+LEU) quando comparados ao grupo DOX, porém sem significância estatística. A dose cumulativa de 7,5g/kg foi mantida no presente estudo uma vez que um ensaio piloto mostrou uma excessiva mortalidade de animais utilizando-se doses superiores.

O efeito renal dos tratamentos também foi evidenciado pela redução do número de glomérulos nos grupos LEU, DOX e DOX+LEU quando comparados ao controle. Este fato sugere algum grau de lesão renal evidenciado tanto para a leucina em elevada concentração como para a doxorrubicina. Um eventual efeito potencializador derivado da associação da doxorrubicina e leucina não pode ser detectado. O mecanismo capaz de produzir perda glomerular pode estar ligado à nefrotoxicidade da doxorrubicina em decorrência do estresse oxidativo (27) e a um efeito direto da leucina que é eliminada via renal e lembrando o mesmo efeito deletério sobre os glomérulos e sobre a função renal derivado da ingestão de grandes quantidades de proteína conforme originalmente descrito em 1982 por Brenner e colaboradores (28, 29).

4. CONCLUSÃO

A suplementação dietética com 5% de leucina administrada aos ratos tratados com doxorrubicina não alterou o estresse oxidativo renal, conforme aferições dos antioxidantes GSH, Gpx, SOD, catalase e TBARS.

A administração isolada da leucina na dose descrita aumentou o estresse oxidativo renal, conforme demonstrado pela elevação da GR.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram que não há conflitos de interesse em relação à publicação deste artigo.

REFERÊNCIAS

1. CARVALHO C; et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009; n. 16:3267-85.
2. PETRIOLI, R; et al. The role of Doxorubicin and epirubicin in the treatment of patients with metastatic hormone refractory prostate cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 2008, 34, 710-718.
3. GEWIRTZ, D. A critical evaluation of the mechanism of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, 57, 727-741
4. DI MARCO A, et al. Inhibiting effect of the new cytotoxic antibiotic daunomycin on nucleic acids and mitotic activity of HeLa cells. *J Cell Biol* 1965, 27: 545–550.
5. ROBERTS C.K and SINDHU K.K, Oxidative stress and metabolic syndrome, *life sciences* 2009; n:1 21 705–712.
6. IMAMURA W et al, Adverse effects of excessive leucine intake depend on dietary protein intake: A Transcriptomic Analysis to identify useful biomarkers, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2013; n: 1 45-55.
7. TANIGUCHI M, et al, Effects of arginine and leucine substitutions on anti-endotoxic activities and mechanisms of action of cationic and amphipathic anti microbial octadecapeptide from rice α -amylase, *Peptide Science* 2017; n: 3, 252-260.
8. RIEGER E et al, Neuroprotective Effect of Creatine and Pyruvate on Enzyme Activities of Phosphoryl Transfer Network and Oxidative Stress Alterations Caused by Leucine Administration in Wistar Rats, *Neurotoxicity Research* 2017; 1-10.
9. FAN Q et al. Dietary leucine supplementation alters energy metabolism and induces slow-to-fast transitions in longissimus dorsi muscle of weanling piglets. *Journal of Nutrition* 2017; n: 117, 1222–1234.
10. COVEY JM, et al. Topoisomerase II mediated DNA damage produced by 49-(9-acridinylamino) methanesulfon-m-anisidide and related acridines in L1210 cells and isolated nuclei: Relation to cytotoxicity. *Cancer Res* 1988. n: 48, 860–865.
11. VIVIANE COSTA JUNQUEIRA ROCHA, Estratégia para reduzir a cardiotoxicidade da Doxorubicina (Dox) sem afetar sua atividade antineoplásica– Dissertação de Mestrado Fio Cruz-Bahia, 2010.
12. REEVES P G, Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76 a diet *J Nutr*. 1997; n: 127 838S-841S.

13. REEVES P G, Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76 a diet J Nutr. 1997; n: 127 838S-841S.
14. CAMPOS E. C et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic Doxorubicin-induced cardiomyopathy, European Journal of Pharmacology 2011; vol. 670, 541–553.
15. DINIZ-VILELA D et al. The role of metformin in controlling oxidative stress in muscle of diabetic rats. Oxid Med Cell Longev. 2016.
16. GOMORI, G. A rapid one-step trichrome stain. Am. J. Clin. Path. 1950, n:20, 661-664.
17. JUNQUEIRA LC, et al. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. Histochem J. 1979; n:11, 447-55.
18. DRUMMOND D. C et al, Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. Pharmacol.Rev.1999, n:51, 691–744.
19. DAEMEN T, et al. Liposomal doxorubicin-induced toxicity: Depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. Int J Cancer 1995, n:61, 716–721.
20. LEE V.W. and HARRIS D.C., Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. Nephrology 2011, n: 16, 30–38.
21. QIN XH, LEE VW, WANG YP et al. A protective role for programmed death 1 in progression of murine adriamycin nephropathy. Kidney Int. 2006; 70: 1244–50.
22. RIEGER E, et al. Neuroprotective Effect of Creatine and Pyruvate on Enzyme Activities of Phosphoryl Transfer Network and Oxidative Stress Alterations Caused by Leucine Administration in Wistar Rats. Neurotox Res. 2017
23. HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Free radical in biology and medicine. In: Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death, Oxford University Press 2007, 188–276
24. HARPER A E et al. Branched-chain amino acid metabolism - Annual review of nutrition, 1984 annualreviews.org.
25. REFAIE M M et al. Possible Protective Effect of Diacerein on Doxorubicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. J Toxicol. 2016.
26. EL-SAYED M et al. Alpha lipoic acid prevents doxorubicin-induced nephrotoxicity by mitigation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. J Biochem Mol Toxicol 2017.

- 27.** SUDHIR S.V. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. *Kidney Int.* n:35, 1093-1106.

STEVEN L. N, NAJI N. A. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB). *The Journal of Nutritional Biochemistry* 1997, n: 6, 300-311.

- 28.** BRENNER B M et al. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med.* 1982, n: 307, 652-659.

REFERÊNCIAS

- ANDREADOU, Ioanna et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 42, n. 3, p. 549-558, 2007.
- BALACHANDAR, A. V.; MALARKODI, K. P.; VARALAKSHMI, P. Protective role of DLa-lipoic acid against adriamycin-induced cardiac lipid peroxidation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 22, n. 5, p. 249-254, 2003.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BERTANI, Tullio et al. Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy. **Kidney international**, v. 30, n. 4, p. 488-496, 1986.
- BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9, 2012.
- CAMPOS, Erica C. et al. Calpain-mediated dystrophin disruption may be a potential structural culprit behind chronic doxorubicin-induced cardiomyopathy. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 2, p. 541-553, 2011.
- CARVALHO, Cristina et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267-3285, 2009.
- CHETEH, Emarndeena H. et al. Human cancer-associated fibroblasts enhance glutathione levels and antagonize drug-induced prostate cancer cell death. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 6, 2017.
- COVEY, Joseph M. et al. Topoisomerase II-mediated DNA damage produced by 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide and related acridines in L1210 cells and isolated nuclei: relation to cytotoxicity. **Cancer Research**, v. 48, n. 4, p. 860-865, 1988.
- CRAWLEY, Michael J. Generalized linear models. **The R Book**, p. 511-526, 2007.
- CRUZ, Bread; GOMES-MARCONDES, Maria CC. Leucine-rich diet supplementation modulates foetal muscle protein metabolism impaired by Walker-256 tumour. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 2, 2014.
- CRUZ, Bread; OLIVEIRA, André; GOMES-MARCONDES, Maria Cristina Cintra. L-leucine dietary supplementation modulates muscle protein degradation and increases pro-inflammatory cytokines in tumour-bearing rats. **Cytokine**, v. 96, p. 253-260, 2017.
- DAEMEN, Toos et al. Liposomal doxorubicin-induced toxicity: Depletion and impairment of phagocytic activity of liver macrophages. **International Journal of Cancer**, v. 61, n. 5, p. 716-721, 1995.

DENEKE, SUSAN M.; FANBURG, BARRY L. Regulation of cellular glutathione. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 257, n. 4, p. L163-L173, 1989.

DENG, Shiwei et al. Gp91phox-containing NAD (P) H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 4, p. 466-473, 2007.

DI MARCO, A. et al. Inhibiting effect of the new cytotoxic antibiotic daunomycin on nucleic acids and mitotic activity of HeLa cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 27, n. 3, p. 545-550, 1965.

DINIZ VILELA, Danielle et al. The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

DRUMMOND, Daryl C. et al. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. **Pharmacological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 691-744, 1999.

EDER, Angela R.; ARRIAGA, Edgar A. Capillary electrophoresis monitors enhancement in subcellular reactive oxygen species production upon treatment with doxorubicin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 9, p. 1151-1159, 2006.

EL-SAYED, El-Sayed M.; MANSOUR, Ahmed M.; EL-SAWY, Waleed S. Alpha lipoic acid prevents doxorubicin-induced nephrotoxicity by mitigation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, 2017.

EVANS, William K. Rationale for the treatment of non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 9, p. 5-14, 1993.

FAN, Qiwen et al. Dietary leucine supplementation alters energy metabolism and induces slow-to-fast transitions in longissimus dorsi muscle of weanling piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 9, p. 1222-1234, 2017.

FREXES-STEED, M., et al. Role of leucine and other amino acids in regulating protein metabolism in vivo. **Am. J. Physiol**, vol. 262, p. E925-E935, 1992.

GEWIRTZ, David A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 727-741, 1999.

GOMORI, GEORGE. A rapid one-step trichrome stain. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 20, n. 7, p. 661, 1950.

HALLIWELL, B. Oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**. n.3, p.14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 4, p. 187-267, 2007.

HARBHAJAN, P.S. AND SIAMAK, A.A. Leucine oxidation in diabetes and starvation: effects of ketone bodies on branched chain amino acid oxidation in vitro. **Metabolism**, vol. 27, p. 185-200, 1978.

HARPER, A. E.; MILLER, R.H.; BLOCK, K. P. Branched-chain amino acid metabolism. **Annual Review of Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 409-454, 1984.

HILDEBRAND, Jennifer L. et al. Functional and energetic characterization of P-gp-mediated doxorubicin transport in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 1, p. 65-72, 2009.

HORTOBAGYI, G. Anthracyclines in the treatment of cancer: an overview. **Drugs**, vol. 54, p.1-7, 1997.

IMAMURA, Wataru et al. Adverse effects of excessive leucine intake depend on dietary protein intake: a transcriptomic analysis to identify useful biomarkers. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 59, n. 1, p. 45-55, 2013.

JUNQUEIRA, L. Cx⁺ U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **The Histochemical Journal**, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KOCAHAN. S. Protective Effect of Quercetin Against Oxidative Stressinduced Toxicity Associated With Doxorubicin and Cyclophosphamide in Rat Kidney and Liver Tissue, **Iranian Journal of Kidney Diseases**, vol.11, n. 2, 2017

LAPLANTE, Mathieu, SABATINI, David M. mTOR signaling at a glance. **Journal of Cell Science**, v.122, p. 3589-3594, 2009.

LEE, Vincent WS; HARRIS, David Ch. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 30-38, 2011.

LEE, Yeu-Tsu N. et al. Distribution of adriamycin in cancer patients. Tissue uptakes, plasma concentration after IV and hepatic IA administration. **Cancer**, v. 45, n. 9, p. 2231-2239, 1980.

LI, Yanmei et al. Preparation and characterization of DOX loaded keratin nanoparticles for pH/GSH dual responsive release. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 189-197, 2017.

LIU Y and THURMAN R G. Potentiation of adriamycin toxicity by ethanol in perfused rat liver. **The Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, n, 2, p. 651-656, 1992.

MARCHESINI, Giulio et al. Anticatabolic Effect of Branched-Chain Amino Acid-Enriched Solutions in Patients with Liver Cirrhosis. **Hepatology**, v. 2, n. 4, p. 420-425, 1982.

MORGAN, H. E. et al. Branched chain amino acids and the regulation of protein turnover in heart and skeletal muscle. **Metabolism and Clinical Implications of Branched Chain Amino and Ketoacids**, p. 219-226, 1981.

MÖRSCHBÄCHER, Priscilla Domingues. Células-tronco mesenquimais e plasma rico em plaquetas em cardiomiopatia dilatada não isquêmica induzida com doxorubicina em coelhos Nova Zelândia. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

MYERS, C. Anthracyclines and DNA intercalators, **Cancer Medicine**. p. 764-772, 1993.
NAGI, Mahmoud N.; MANSOUR, Mahmoud A. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. **Pharmacological Research**, v. 41, n. 3, p. 283-289, 2000.

NAKAGE, Ana Paula Massae; SANTANA, Aureo Evangelista. AVALIAÇÃO DAS FUNÇÕES HEPÁTICA E RENAL DE CÃES EXPOSTOS AO ANTINEOPLÁSICO DOXORUBICINA. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, v. 6, n. 3, 2017.

NISSEN, Steven L.; ABUMRAD, Naji N. Nutritional role of the leucine metabolite β -hydroxy β -methylbutyrate (HMB). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 8, n. 6, p. 300-311, 1997.

OBERLEY, T. D.; OBERLEY, L. W. Antioxidant enzyme levels in cancer. **Histology and Histopathology**, v. 12, n. 2, p. 525-535, 1997.

PAGE, R. L. et al. Phase III evaluation of doxorubicin and whole-body hyperthermia in dogs with lymphoma. **International Journal of Hyperthermia**, v. 8, n. 2, p. 187-197, 1992.

PETRIOLI, Roberto et al. The role of doxorubicin and epirubicin in the treatment of patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 8, p. 710-718, 2008.

QIN, X. H. et al. A protective role for programmed death 1 in progression of murine adriamycin nephropathy. **Kidney International**, v. 70, n. 7, p. 1244-1250, 2006.

REEVES, Philip G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 5, p. 838S-841S, 1997.

REFAIE, Marwa MM et al. Possible protective effect of diacerein on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of Toxicology**, v. 2016, 2016.

RIEGER, Elenara et al. Neuroprotective Effect of Creatine and Pyruvate on Enzyme Activities of Phosphoryl Transfer Network and Oxidative Stress Alterations Caused by Leucine Administration in Wistar Rats. **Neurotoxicity Research**, p. 1-10, 2017.

ROBERTS, Christian K.; SINDHU, Kunal K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, n. 21, p. 705-712, 2009.

ROCHA, Viviane Costa Junqueira et al. **Estratégia para reduzir a cardiotoxocidade da doxorubicina (DOX) sem afetar sua atividade antineoplásica**. 2010. Dissertação de Mestrado. Fio Cruz-Bahia.

ROOK, Mienieke et al. Individual differences in renal ACE activity in healthy rats predict susceptibility to adriamycin-induced renal damage. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, n. 1, p. 59-64, 2004.

ROVER JÚNIOR, Laércio et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, n. 1, p.112-119, 2001.

SHAH, Sudhir V. Role of reactive oxygen metabolites in experimental glomerular disease. **Kidney International**, v. 35, n. 5, p. 1093-1106, 1989.

SHAMAA, Ashraf Ali et al. Prophylactic supplementation of resveratrol is more effective than its therapeutic use against doxorubicin induced cardiotoxicity. **PLOS ONE** 2017.

SHIMOMURA, Yoshiharu; HARRIS, Robert A. Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 1, p. 232S-233S, 2006.

SILVA, C. E. V.; CAMACHO, Aparecido Antonio. Alterações ecocardiográficas em cães sob tratamento prolongado com doxorubicina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 300-306, 2005.

TABACZAR, S. et al. The effect of the nitroxide pirolin on oxidative stress induced by doxorubicin and taxanes in the rat brain. **J Physiol Pharmacol**, n. 2, p. 15, 2017.

TANIGUCHI, Masayuki et al. Effects of arginine and leucine substitutions on anti-endotoxic activities and mechanisms of action of cationic and amphipathic antimicrobial octadecapeptide from rice α -amylase. **Journal of Peptide Science**, v. 23, n. 3, p. 252-260, 2017.

TEODORO, Gabriela Fullin Resende. Suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada atenua em proles os efeitos mediados pela dieta materna restrita em proteína. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

WITHAM, Miles D. et al. Effects of Vitamin D supplementation on markers of vascular function after myocardial infarction—A randomised controlled trial. **International Journal of Cardiology**, v. 167, n. 3, p. 745-749, 2013.

ZWEIT, J. et al. Excitation functions of proton induced reactions on cobalt: Production of no-carrier added Nickel-57, a positron emitting label for doxorubicin. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 44, n. 12, p. 1411-1416, 1993.

ANEXO 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2T, sala 113 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VolP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br, www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 171/15 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 115/14

Projeto pesquisa: "Efeito da suplementação de leucina em ratos com insuficiência cardíaca induzida pela doxorubicina".

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Thiago Montes Fidale

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: SOLICITAÇÃO DE ADENDO APROVADA.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 29 de setembro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

ANEXO 2

18/07/2017

ScholarOne Manuscripts

Hepatology

Home

Author

Review

Submission Confirmation

Print

Thank you for your submission

Submitted to

Hepatology

Manuscript ID

HEP-17-1364

Title

EVALUATION OF HEPATIC OXIDATIVE STRESS BY LEUCINE SUPPLEMENTATION IN A DOXORUBICIN-TREATED RATS

Authors

ALVES, POLIANA
TEIXEIRA, RENATA
DECONTE, SIMONE
VILELA, DANIELLE
S, ADRIELE
CAIXETA, DOUGLAS
FIDALE, THIAGO
RODRIGUES, CLESNAN
ESPINDOLA, FOUED
RESENDE, ELMIRO

Date Submitted

18-Jul-2017

Author Dashboard

ANEXO 3

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: EVALUATION OF RENAL OXIDATIVE STRESS BY LEUCINE SUPPLEMENTATION IN
DOXORUBICIN-TREATED RATS

Article Type: Full Length Article

Keywords: Doxorubicin; Leucine; Oxidative, and Renal Stress.

Corresponding Author: Dr. POLIANA RODRIGUES ALVES DUARTE, Ph.D

Corresponding Author's Institution: FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLANDIA

First Author: POLIANA RODRIGUES ALVES DUARTE, Ph.D

Order of Authors: POLIANA RODRIGUES ALVES DUARTE, Ph.D; Danielle VILELA;
Renata Teixeira; DOUGLAS Caixeta; ADRIELE Souza; SIMONE DECONTE; CLESNAN
Mendes-Rodrigues; THIAGO FIDALE; FOUED ESPÍNDOLA; ELMIRO RESENDE

Abstract: This study aimed at evaluating the possible nephroprotective
effect by leucine supplementation in the diet of DOX-treated rats. The
nephrotoxicity caused by DOX, a drug widely used in oncology, is one of
the most challenging factors for medicine, since it triggers chronic
lesions by increasing the oxidative stress when administered in
chemotherapy. The experiment consisted of 36 Wistar rats divided into