

O efeito nefroprotetor da Curcumina como terapia adjuvante ao uso de Doxorrubicina: uma análise morfológica murina

Gustavo Antonelle Faria Miranda¹, Giovanna Lobo Macedo Carvalho e Silva², Isabella de Paula Rabelo², Fernanda Dias Tomé³, Iane de Oliveira Pires Porto⁴

¹Graduando, Faculdade de Medicina, Universidade de Rio Verde. Iniciação Científica – PIVIC.

²Graduando, Faculdade de Medicina, Universidade de Rio Verde. Coautor da Iniciação Científica – PIVIC.

³Co-orientador, Docente da Faculdade de Medicina da Universidade de Rio Verde, campus Aparecida de Goiânia. Email: fernandadias@unirv.edu.br

⁴Orientador, Docente da Faculdade de Medicina da Universidade de Rio Verde, campus Aparecida de Goiânia. Email: iane.porto@unirv.edu.br

Reitor:

Prof. Dr. Alberto Barella Netto

Pró-Reitor de Pesquisa e Inovação:

Prof. Dr. Carlos César E. de Menezes

Editor Geral:

Prof. Dra. Andrea Sayuri Silveira Dias Terada

Editores de Seção:

Profa. Dra. Ana Paula Fontana

Prof. Dr. Hidélberto Matos Silva

Prof. Dr. Fábio Henrique Baia

Pra. Dra. Muriel Amaral Jacob

Prof. Dr. Matheus de Freitas Souza

Prof. Dr. Warley Augusto Pereira

Fomento:

Programa PIBIC/PIVIC UniRV/CNPq 2023-2024

Resumo: A lesão renal mediada pela Doxorrubicina (DOX) no tratamento de neoplasias proliferativas é um grande desafio no prognóstico e sobrevida de pacientes com câncer. Assim, esta pesquisa procura demonstrar o efeito nefroprotetor da Curcumina (CUR) na nefropatia induzida pela DOX em um modelo experimental murino. Então, os camundongos machos, adultos, da linhagem Balb/c foram divididos randomicamente em 6 grupos: controle, CUR (100 mg/kg por gavagem), DOX 9 mg/kg (intraperitoneal, i.p), DOX 9 mg/kg mais CUR, DOX 16 mg/kg, DOX 16 mg/kg mais CUR. A nefropatia causada pela DOX já é bem conhecida e prossegue com alterações histológicas como infiltrado inflamatório intersticial, hipertrofia tubular, aumento da deposição de colágeno e espessamento da membrana basal, alargamento do espaço de Bowman e diminuição de células glomerulares. Desse modo, nossa pesquisa demonstra que a Curcumina, um polifenol amarelado extraído da *Curcuma longa*, foi capaz de reduzir a toxicidade do tecido renal causada pela DOX, evidenciada pelo aumento da sobrevida e pela preservação da arquitetura tecidual em análise histopatológica por microscopia óptica com Hematoxilina-Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). Assim, nossos resultados reforçam a evidência do efeito nefroprotetor da CUR como terapia adjuvante ao uso de DOX, porém ainda são necessárias pesquisas futuras com esse enfoque para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos, da segurança e eficácia dessa terapêutica em humanos.

Palavras-Chave: Adjuvante. Curcumina. Doxorrubicina. Rins.

The nephroprotective effect of curcumin as adjuvant therapy to doxorubicin use: a murine morphological analysis.

Abstract: The renal injury mediated by Doxorubicin (DOX) in the treatment of proliferative neoplasms is a major challenge in the prognosis and survival of cancer patients. Therefore, this research aims to demonstrate the nephroprotective effect of Curcumin (CUR) in DOX-induced nephropathy in an experimental murine model. So, adult male mice of the Balb/c lineage were randomly divided into 6 groups: control, CUR (100 mg/kg by gavage), DOX 9 mg/kg (intraperitoneal, i.p). DOX 9 mg/kg plus CUR, DOX 16 mg/kg, DOX 16 mg/kg plus CUR. DOX-induced nephropathy is well known and proceeds with histological changes such as interstitial inflammatory infiltrate, tubular hypertrophy, increased collagen deposition and thickening of the basement membrane, widening of Bowman's space and decrease in glomerular cells. Thus, our research demonstrates that Curcumin, a yellowish polyphenol extracted from Turmeric (*Curcuma longa*), has reduce renal tissue toxicity caused by DOX, evidenced by increased survival and preservation of tissue architecture in histopathological analysis by optical microscopy with Hematoxylin-Eosin (HE) and Periodic Acid-Schiff (PAS). Our results reinforce the evidence of the nephroprotective effect of CUR as an adjuvant therapy to the use of DOX, but future research with this focus is still needed to better understand the mechanisms involved, the safety and efficacy of this therapy in humans.

Keywords: Adjuvant. Curcumin. Doxorubicin. Kidneys.

Introdução

As duas primeiras antraciclinas extraídas do pigmento produzido pela bactéria *Streptomyces peuceitius* ainda no início da década de 1960 foram a Doxorubicina (DOX) e a Daunorubicina (DNX). Desde então, a DOX se destacou por ser considerada uma das drogas antineoplásicas mais potentes prescritas isoladamente ou em combinação com outros agentes, permanecendo como o composto de sua classe que possui o maior espectro de ação (Carvalho et al., 2009). Assim, mesmo sendo uma droga relativamente antiga, ela continua sendo fortemente recomendada pela OMS no tratamento de neoplasias proliferativas malignas como o câncer de mama em estágio inicial e em fase metastática, linfoma de células B, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, linfoma folicular, osteossarcoma, sarcoma de Ewing, leucemia linfoblástica aguda, tumor de Wilms e linfoma de Burkitt (The selection and use of essential medicines, 2022).

A DOX possui uma estrutura plana rígida composta de quatro anéis benzênicos e tem como principal mecanismo de ação a formação de ligações interfilamentares com o DNA, o que leva ao bloqueio da síntese do DNA e RNA e a redução da atividade da topoisomerase II (TOP II), promovendo ruptura dos filamentos da macromolécula de DNA (Silva et al., 2016).

Especificamente no tecido renal, a Doxorubicina causa deformação na barreira de filtração glomerular, na célula endotelial (inclusive glicocálice), na membrana basal glomerular e nos podócitos. Ademais, a espessura do glicocálice é reduzida, o tamanho dos poros das células endoteliais é aumentado, a seletividade da carga glomerular é reduzida e os pedicelos dos podócitos se fundem (Lee; Harris, 2010). Em experimentos com ratos e camundongos como o realizado por Okuda e colaboradores (1986), a DOX induziu lesão renal caracterizada por proteinúria precoce, glomeruloesclerose segmentar focal tardia e evolução para doença renal crônica. No microscópio óptico, essa nefropatia apresenta alterações teciduais renais como inflamação intersticial, hipertrofia tubular, aumento da deposição de colágeno e espessamento da membrana basal, alargamento do espaço de Bowman e diminuição de células glomerulares (Lee; Harris, 2010).

Então, a fim de minimizar os efeitos tóxicos dessa droga nos rins e em outros órgãos afetados, procuram-se novos tratamentos adjuvantes com fármacos derivados de extratos vegetais já conhecidos, haja vista o elevado custo de desenvolvimento e maiores efeitos colaterais de drogas sintéticas (Russo, 2017). Assim, a Curcumina (CUR), um polifenol amarelado extraído da *Curcuma longa*, vem se mostrando promissora na diminuição da nefrotoxicidade causada pela DOX, dado suas ações antioxidante, anti-inflamatória, antifibrogênica, antimicrobiana e anticancerígena (Bahramsoltani et al., 2017). Sendo assim, fica nítido a importância de mais pesquisas com esse enfoque para que se aumente a segurança e comprove a eficácia terapêutica dos efeitos

nefroprotetores da CUR em tratamentos antineoplásicos com DOX. Nesse contexto, o presente estudo tem como finalidade contribuir para o melhor prognóstico e sobrevida do câncer.

Material e Métodos

Trata-se de um projeto integrativo com a pesquisa elaborada pela Dra. Fernanda Dias Tomé, Dr. Felipe dos Santos Arruda, Dra Mara Rúbia Nunes Celes e colaboradores, com título de "EFEITO DA CURCUMINA E SUA RELAÇÃO COM A VIA mTOR NA HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO". Foram utilizados os materiais coletados desse estudo experimental, realizado no laboratório de Patologia Celular e Molecular, setor de Patologia, do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPSTP) da Universidade Federal de Goiás (UFG) sob aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA, protocolo 050/2016.

Assim, o grupo amostral foi composto por 32 camundongos machos, adultos, da linhagem Balb/c, com peso entre 30-35g, identificados e separados aleatoriamente nos seguintes grupos descritos: Grupo Controle (CON) - tratamento diário de 100µL de solução salina estéril, do dia 0 até o dia 13 (n = 4); Grupo Curcumina 100mg/kg (CUR): tratamento diário por gavagem, com 100mg/kg de peso de Curcumina (Farmácia Universitária da UFG – Lote 057939, produto de origem da China - Extrato seco > 96% fabricado em 09/2015), diluída em 100µl água destilada, durante 14 dias consecutivos (n = 4); Grupo doxorrubicina 9mg/kg (DOX9) – administração de 9mg/Kg de peso de DOX (Libbs, Farmacêutica Ltda, São Paulo) por via intraperitoneal (i.p.) no dia experimental 0 (n = 6); Grupo doxorrubicina 9mg/kg + Curcumina 100mg/kg (DOX9+CUR) - administração de 9mg/Kg de peso de DOX (i.p.) no dia experimental 0 e tratamento diário por gavagem, com 100mg/kg de peso de CUR, diluída em 100µl água destilada, durante 14 dias consecutivos (n = 6); Grupo doxorrubicina 16mg/kg (DOX16) – administração de 16mg/Kg de peso de DOX (i.p.) no dia experimental 0 (n = 6); Grupo doxorrubicina 16mg/kg + Curcumina 100mg/kg (DOX16+CUR) - administração de 16mg/Kg de peso de DOX (i.p.) no dia experimental 0 e tratamento diário por gavagem, com 100mg/kg de peso de CUR, diluída em 100µl água destilada, durante 14 dias consecutivos (n = 6).

Os rins separados foram fatiados em 5 micrômetros de espessura, colocadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação morfológica geral como da celularidade glomerular, da estrutura tubular, dos vasos e do interstício e a presença ou ausência infiltrado inflamatório intersticial e com ácido periódico de Shciff (PAS) para avaliação das membranas basais e da deposição de colágeno. As lâminas foram analisadas neste estudo por microscopia óptica no laboratório de histologia da Universidade de Rio Verde (UniRV) Campus Goiânia.

Resultados e Discussão

A planta Curcuma Longa, mais conhecida como açafrão-da-terra, é utilizada há mais de 3000 anos como alimento e remédio, sendo parte da cultura de diversos países, inclusive o Brasil. No entanto, o reconhecimento científico de seu pigmento amarelado e princípio ativo, a Curcumina, ainda é recente, e os artigos sobre o tema são escassos.

Desse modo, as poucas pesquisas sobre a associação desse polifenol no tratamento com DOX estão demonstrando que esta foi extremamente eficaz para a diminuição dos seus efeitos nocivos, principalmente nos rins, fígado e coração. As evidências atuais sugerem que os efeitos benéficos da CUR sejam devido a inibição da geração de radicais livres, por atuar como antioxidante, sequestrador de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica e por suas propriedades hipolipemiantes (Mohamad et al., 2009).

Nesse sentido, uma nova revisão sistemática observou a capacidade da CUR em prevenir e/ou controlar doenças neuronais, cardiovasculares, metabólicas, renais, endócrinas, cutâneas, respiratórias, infecciosas, gastrointestinais e câncer; devido a ter uma estrutura molecular capaz de modular diversos agentes da via de transdução de sinal em células humanas, como PI3K, Akt, mTOR, ERK5, AP-1, TGF-β, Wnt, β-catenina, Shh, PAK1, Rac1, STAT3, PPARγ, EBPα, NLRP3, p38MAPK, Nrf2, Notch-1, AMPK, TLR-4 e MyD-88, o que lhe confere propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e anti-apoptóticas (Patel et al., 2020).

Especialmente no tecido renal, o estudo de Mohamad (2009) foi um dos principais e mais relevantes. Nesse artigo usaram um modelo experimental de DOX+CUR parecido com o nosso, mas com o dobro da dose de CUR (200mg/kg de peso) e 7,5mg/kg de DOX por peso. Ao final de 10 dias de

experimento notaram que a terapia adjuvante com CUR melhorou não só a arquitetura histológica dos rins, mas também os biomarcadores que avaliam a função renal como creatinina, ureia e diminuição da proteinúria. Ademais, avaliaram as propriedades hipolipemiantes da Curcumina, um dos possíveis grandes mecanismos para explicar seu efeito nefroprotetor, uma vez que o excesso de produção e acumulação de lipídios também têm papel importante na fisiopatologia da nefropatia induzida por DOX. Na análise do tecido renal do grupo DOX+CUR houve redução significativa ($p < .001$) de peroxidação lipídica, lipídeos totais e aumento de glutathione (GSH), um antioxidante sequestrador de radicais livres.

Nesse contexto, a primeira etapa do nosso experimento foi realizada para avaliar a sobrevida dos animais após administração de diferentes concentrações de DOX (9mg/kg e 16mg/kg i.p.) e da terapia com CUR (100mg/kg g.v.), conforme a Figura 1. Os animais dos grupos controle (CON), tratados com CUR (CUR) e grupo dos animais tratados com CUR após a administração de DOX 9mg/kg (DOX9+CUR) não apresentaram alteração na sobrevida, ou seja, 100% dos animais sobreviveram até o 15º dia de experimento. Já o grupo DOX9 sem o tratamento com CUR (DOX9) apresentou 75% de sobrevida ao final do período experimental. A administração da maior dose utilizada de DOX (16mg/kg), sozinha ou em associação com a CUR, mostrou maior letalidade em relação ao grupo DOX9, apresentando índices de sobrevida de 33% e 20%, respectivamente, ao final do período experimental.

Nesse sentido, o aumento da sobrevida encontrado neste artigo de 75% para 100% com o tratamento adjuvante de CUR nas menores concentrações de DOX (9mg/kg de peso) é um achado de grande relevância clínica, uma vez que se relaciona diretamente com desfechos de morbimortalidade e a saúde do indivíduo como um todo e não apenas a alterações de biomarcadores. Em outros estudos constataram também um aumento do peso corporal dos animais ($p < .001$), outro importante dado clínico que sugere proteção da toxicidade geral da DOX. (Mohamad et al., 2009).

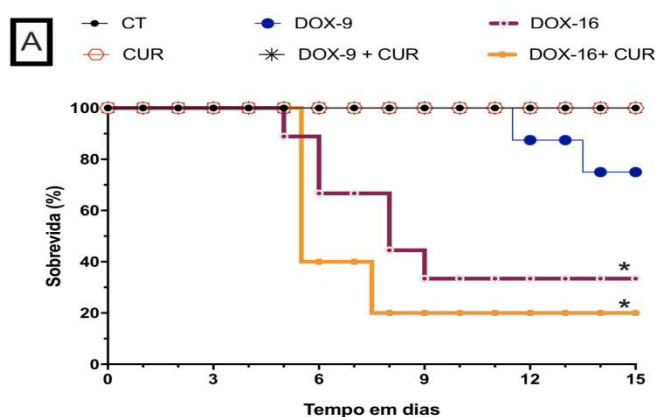


Figura 1 – Sobrevida dos grupos experimentais após administração de DOX e tratamentos com CUR (A). Controle (CT); curcumina (CUR); doxorubicina 9mg/Kg (DOX-9); doxorubicina 9mg/Kg tratado diariamente com curcumina 100mg/Kg (DOX-9+CUR); doxorubicina 16mg/Kg (DOX-16); doxorubicina 16mg/Kg tratado diariamente com curcumina 100mg/Kg (DOX-16+CUR). A sobrevida dos animais foi avaliada a cada 24 horas, por um período de 15 dias ($n = 32$, Curva de Kaplan-Meier e Logrank test $p < 0.05$)

Fonte: Imagem extraída de Tomé (2022)

O estudo histológico com HE (Figura 2) mostrou uma perda da arquitetura tecidual progressiva dose dependente de DOX nos grupos DOX9 e DOX16 se comparado ao grupo controle (CON), com presença de infiltrado inflamatório intersticial, hipertrofia tubular, alargamento do espaço de Bowman e diminuição de células glomerulares. Não houveram alterações teciduais significativas entre os grupos CUR e CON. O tratamento com CUR foi capaz de reverter parte das lesões causadas pela Doxorubicina apenas no grupo DOX9+CUR, enquanto no grupo DOX16+CUR além de não se observar essa reversão, houve pequena piora dos parâmetros avaliados o que já era esperado devido à toxicidade da DOX em doses elevadas e a sobrecarga hepática intensificada ao associar outras substâncias ao tratamento (Jiang et al., 2019).

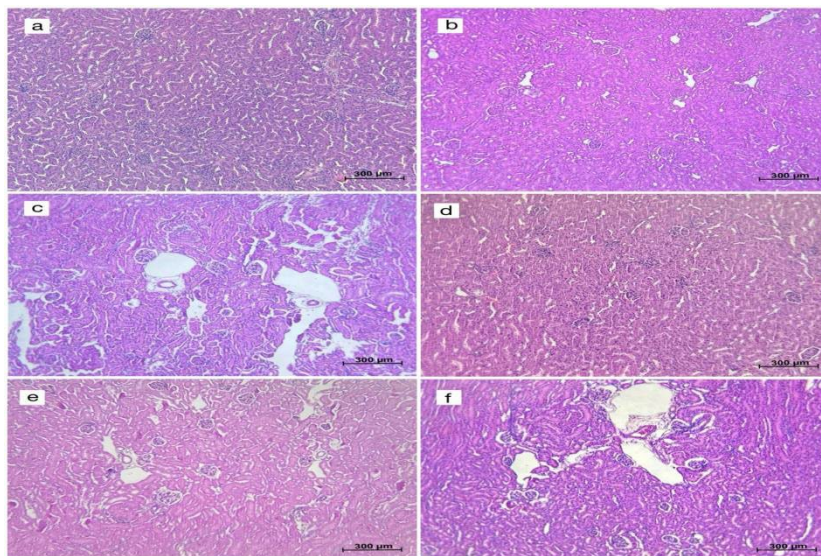


Figura 2 – Modelo histopatológico renal murino para avaliação de alterações morfológicas gerais na nefropatia induzida por Doxorrubicina e o possível papel nefroprotetor da terapia adjuvante com Curcumina. Cortes histológicos corados com HE em aumento de 40x. **a** - CON; **b** - CUR; **c** - DOX9; **d** - DOX9+CUR; **e** - DOX16; **f** - DOX+CUR. Nota-se piora progressiva da arquitetura tecidual com o aumento da dose de DOX e uma atenuação desses efeitos quando se adiciona a CUR

Fonte: Autoria própria; Laboratório de histologia da Universidade de Rio Verde Campus Goiânia

A análise das alterações da membrana basal glomerular feitas com PAS (Figura 3) revelou seu espessamento, alargamento do espaço de Bowman e perda progressiva de podócitos nos grupos tratados com DOX, também de maneira dose dependente, em relação ao grupo controle. Foi observada importante necrose glomerular no grupo DOX16+CUR. A associação de Curcumina reduziu parcialmente os danos apenas no grupo DOX9+CUR.

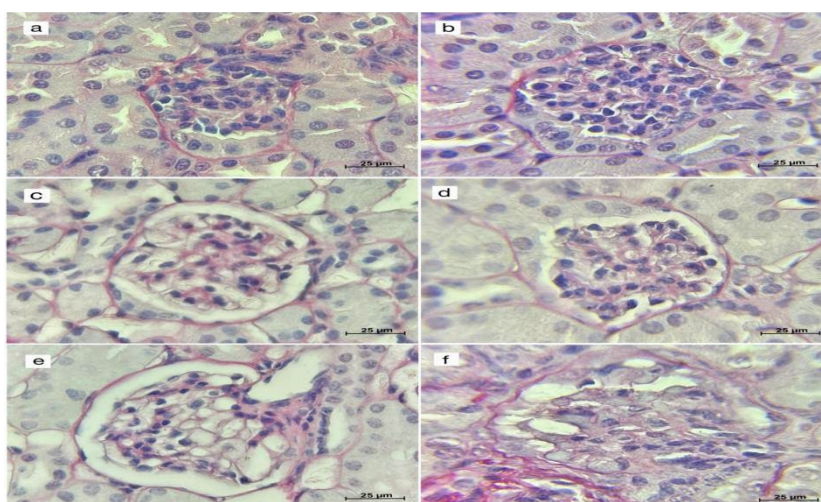


Figura 3 – Modelo histopatológico renal murino para avaliação de alterações da membrana basal na nefropatia induzida por Doxorrubicina e o possível papel nefroprotetor da terapia adjuvante com Curcumina. Cortes histológicos corados com PAS em aumento de 1000x. **a** - CON; **b** - CUR; **c** - DOX9; **d** - DOX9+CUR; **e** - DOX16; **f** - DOX+CUR. Nota-se alargamento progressivo da membrana basal com o aumento da dose de DOX e uma atenuação desses efeitos quando se adiciona a CUR

Fonte: Autoria própria; Laboratório de histologia da Universidade de Rio Verde Campus Goiânia

Conclusão

A administração de Curcumina por via oral em camundongos se mostra segura e eficaz como terapia nefroprotetora adjuvante ao uso de Doxorubicina em doses equiparadas à dose terapêutica em humanos. O uso da CUR em associação com a DOX melhora a sobrevida e a diminuição da quantidade de infiltrado inflamatório intersticial, da hipertrofia tubular, da deposição de colágeno, do espessamento da membrana basal, do alargamento do espaço de Bowman e de células glomerulares em modelo experimental murino.

Agradecimentos

Essa pesquisa só foi possível graças ao Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica da Universidade de Rio Verde que chancelou a execução do projeto.

Referências Bibliográficas

BAHRAMSOLTANI, R.; RAHIMI, R.; FARZAEI, M. H. Pharmacokinetic interactions of curcuminoids with conventional drugs: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 209, p. 1–12, set. 2017.

CARVALHO, C. et al. Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3267–3285, 1 set. 2009.

JIANG, B. et al. GRP78-targeted ferritin nanocaged ultra-high dose of doxorubicin for hepatocellular carcinoma therapy. **Theranostics**, v. 9, n. 8, p. 2167–2182, 12 abr. 2019.

LEE, V. W.; HARRIS, D. C. Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis. **Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 30–38, 23 dez. 2010.

MOHAMAD, R. H. et al. The Role of *Curcuma longa* Against Doxorubicin (Adriamycin)-Induced Toxicity in Rats. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 2, p. 394–402, abr. 2009.

OKUDA, S. et al. Adriamycin-induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. **Kidney International**, v. 29, n. 2, p. 502–510, 1 fev. 1986.

PATEL, S. S. et al. Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 6, p. 887–939, 2020.

RUSSO, E. R. **Avaliação do uso oral da droga vegetal de *Curcuma longa* L. no tratamento da nefropatia induzida por doxorubicina em um modelo animal.** Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

SILVA, E. F. et al. DNA-dox orubicin interaction: New insights and peculiarities. **Biopolymers**, v. 107, n. 3, 22 dez. 2016.

TOMÉ, F. D. **Curcumina e sua relação com a via mTOR na hepatotoxicidade induzida pela doxorubicina em modelo experimental murino [manuscrito]** Tese (Doutorado Medicina Tropical e Saúde Pública.) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2022.

The selection and use of essential medicines. [s.l.] World Health Organization, 2022.