

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Atividade da Paraoxanase 1 em cães submetidos a terapia antineoplásica e  
avaliação do balanço oxidativo e parâmetros hematopoiéticos de ratas  
submetidas a carboplatina e tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum*  
e *Hibiscus rosa-sinensis***

**Gustavo Forlani Soares**

Pelotas, 2016

**Gustavo Forlani Soares**

**Atividade da Paraoxanase 1 em cães submetidos a terapia antineoplásica e  
avaliação do balanço oxidativo e parâmetros hematopoiéticos de ratas  
submetidas a Carboplatina e tratadas com extrato aquoso de *Triticum  
aestivum* e *Hibiscus rosa-sinensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia de Oliveira Nobre  
Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Anelize de Oliveira Campello Félix

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S676a Soares, Gustavo Forlani

Atividade da Paraoxanase 1 em cães submetidos à terapia antineoplásica e avaliação do balanço oxidativo e parâmetros hematopoiéticos de ratas submetidas a carboplatina e tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum* e *Hibiscus rosa-sinensis* / Gustavo Forlani Soares. – 71f. ; il. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2016. – Orientadora Márcia de Oliveira Nobre ; coorientadora Anelise de Oliveira Campello Félix.

1.Veterinária. 2.Hibisco. 3.Mieloproteção. 4.Neoplasma. 5.Platinados. 6.Trigo. 7.Cães. I.Nobre, Márcia de Oliveira Nobre. II.Félix, Márcia de Oliveira Nobre. III.Título.

CDD: 636.7

Gustavo Forlani Soares

Atividade da Paraoxanase 1 em cães submetidos a terapia antineoplásica e avaliação do balanço oxidativo e parâmetros hematopoiéticos de ratas submetidas a Carboplatina e tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum* e *Hibiscus rosa-sinensis*

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2016

Banca examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia de Oliveira Nobre (Orientadora)  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

MV. Dr.<sup>a</sup> Anelize Campello de Oliveira Félix  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Antônio Sérgio Varela Junior  
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Pelotas

MV. Dr.<sup>a</sup> Mariana Teixeira Tillmann  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

## **Agradecimentos**

À minha mãe, por sempre considerar minha formação como prioridade máxima em sua vida.

À Márcia de Oliveira Nobre, por me ter aberto as portas da pós-graduação, assim como pela paciência, orientação pessoal e científica durante todo esse período.

Ao Casal Félix, pela amizade e contribuição científica.

A todos os integrantes do ClinPet pelas diversas formas de apoio.

A CAPES, pela bolsa e fomento a pesquisa.

Por fim, agradeço aos animais que doaram seu bem maior para a realização deste estudo.

***“Long you live and high you fly and smiles you will give and tears you will cry  
and all you touch and all you see is all your life will ever be”  
(WATERS, R.; GILMOUR, D; WRIGTH, N., 1973).***

## Resumo

FORLANI, Gustavo Soares. **Atividade da Paraoxanase 1 em pacientes oncológicos caninos submetidos a terapia com agentes antineoplásicos e avaliação do balanço oxidativo e parâmetros hematopoiéticos de ratas submetidas a Carboplatina e tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum* e *Hibiscus rosa-sinensis***. 2016. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Os neoplasmas estão entre as afecções de maior importância na medicina humana e veterinária. Entre as diretrizes terapêuticas mais utilizadas está a administração de agentes antineoplásicos como a carboplatina, a qual é eficaz no tratamento de carcinomas, entretanto possui efeitos colaterais, como a mielossupressão e a liberação excessiva de radicais livres. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o balanço oxidativo de cães submetidos a quimioterapia, assim como a utilização dos extratos aquosos de *Triticum aestivum* (trigo) e de *Hibiscus rosa-sinensis* (HRS) como adjuvante na terapia antineoplásica com carboplatina em modelo murino. Para avaliação do balanço oxidativo em caninos foram selecionados oito cães, quatro com câncer e quatro hígidos, sendo mensurada a atividade da Paraoxanase 1 (PON1) no momento que antecedeu a aplicação do agente antineoplásico (dia 0) e sete dias após a aplicação (dia 7). Foi constatado que no dia zero os pacientes oncológicos caninos (G1) apresentaram menor atividade da PON1 do que os cães do (G2) ( $p < 0,05$ ), além disso, a atividade dessa enzima foi ainda mais comprometida após a administração de fármacos antineoplásicos ( $p < 0,05$ ), sugerindo a necessidade de administração de compostos antioxidantes para esses pacientes. Para avaliar o potencial dos extratos aquosos de trigo e HRS como adjuvantes na terapia antineoplásica, foram utilizadas 48 ratas, aleatoriamente distribuídas em seis grupos: G1 - testemunha tratado com solução fisiológica; G2 - controle tratado com solução fisiológica; G3 - tratado com 100 mg/kg de extrato aquoso de trigo; G4 - tratado com 400 mg/kg de extrato aquoso de trigo; G5 - tratado com 125mg/kg de extrato aquoso de HRS; e G6 - tratado com 250mg/kg de extrato aquoso de HRS. Administrou-se 300 mg/m<sup>2</sup> de carboplatina por via intraperitoneal no dia 0 nos grupos G2, G3, G4, G5 e G6, enquanto o G1 recebeu 1mL de solução fisiológica pela mesma via. Os animais foram tratados diariamente durante 21 dias por gavagem orogástrica de acordo com seu grupo experimental. Foi coletado sangue dos animais para realização de hemograma e avaliação dos parâmetros bioquímicos alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, ureia e creatinina nos dias três, sete e 21, com a avaliação da atividade da Paraoxanase 1 no dia três. No dia 21 foi realizada a eutanásia das ratas e coletado aspirados da medula óssea para realização do mielograma e fragmentos do rim e do fígado para análise histológica. Os efeitos adversos da carboplatina foram confirmados pelas alterações observadas no G2 quando comparado ao G1. Foram observados resultados promissores com

relação ao balanço oxidativo no G3, G4, G5 e G6, devido aos animais desse grupo apresentarem atividade da PON1 superior ao G2 ( $p < 0,05$ ). Os mesmos grupos apresentaram contagem de leucócitos totais superiores ao G2, sendo significativamente superior no G4, G5 e G6 no dia 21 ( $p < 0,05$ ). Os mielogramas dos animais tratados com extratos vegetais não apresentaram as evidentes alterações de parâmetros que foram observadas no G2 (queda de células eritróides e aumento de neutrófilos segmentados e promielócitos) ( $p < 0,05$ ), indicando uma compensação do efeito da carboplatina. Os parâmetros bioquímicos e histopatológicos avaliados encontravam-se dentro do esperado para espécie em todos os animais. Nas condições deste estudo, os extratos aquosos de trigo e *Hibiscus rosa-sinensis* mostraram-se seguros nas doses utilizadas e úteis no tratamento da mielossupressão e liberação excessiva de radicais livres induzidas pelo fármaco carboplatina.

**Palavras-chave:** hibisco; mieloproteção; neoplasma; platinados; trigo

## Abstract

FORLANI, Gustavo Soares. **Paraoxanase 1 activity in canine cancer patients undergoing therapy with antineoplastic agents and evaluation of the oxidative balance and hematopoietic parameters of rats subjected to Carboplatin and treated with aqueous extract of *Triticum aestivum* and *Hibiscus rosa-sinensis***. 2016. 71f. Dissertation (Master degree in Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

Cancer is one of the most important diseases in human and veterinary medicine. Among the most commonly used therapeutic guidelines is the administration of anticancer agents such as carboplatin, which is effective in treating carcinomas, but has side effects such as myelosuppression and excessive release of free radicals. This study proposed to assess the oxidative balance of dogs undergoing chemotherapy, as well as the use of aqueous extracts of wheat and *Hibiscus rosa-sinensis* (HRS) as adjuvants to antineoplastic therapy with carboplatin in rats. To assess the oxidative balance of dogs, eight animals were selected, four cancer patients and four healthy witnesses, and the seric Paraoxanase 1 (PON1) activity was measured before and after the application of antineoplastic agents. Cancer patients were found to exhibit lower activity of PON1 ( $p < 0.05$ ), furthermore, the activity of this enzyme was further compromised after the administration of anticancer drugs ( $p < 0.05$ ). To assess the potential of aqueous extracts of wheat and HRS as adjuvants in antineoplastic therapy, 48 rats were randomly divided into six groups: G1 - witness treated with saline solution; G2 - control treated with saline solution; G3 - treated with 100 mg/kg of wheat aqueous extract; G4 - treated with 400 mg/kg of wheat aqueous extract; G5 - treated with 125mg/kg of HRS aqueous extract; and G6 - treated with 250 mg/kg of HRS aqueous extract. Three hundred mg/m<sup>2</sup> of carboplatin was administered intraperitoneally on day zero in groups G2, G3, G4, G5 and G6, while the G1 received 1mL of saline. The animals were treated daily for 21 days by orogastric gavage according to their experimental group. Blood samples were collected from animals for CBC, and blood biochemistry on days three, seven, and 21, Paraoxanase1 was assessed on day three. On day 21 the animals were euthanized and bone marrow, kidney, liver tissues were collected. The adverse effects of carboplatin were confirmed by the changes observed in G2 when compared to G1. Promising results were observed with respect to the oxidative balance in G3, G4, G5 and G6. Animals in these groups present activity of the PON 1 higher than the G2 ( $p < 0.05$ ). The same groups had higher counts of total leukocytes than G2, being significantly higher in G4, G5, and G6 on day 21 ( $p < 0.05$ ). The myelograms of animals treated with plant extracts did not show the overt parameter changes that were observed in G2 (reduction of erythroid cells and increased segmented neutrophils and promyelocytes) ( $p < 0.05$ ), indicating a compensation of the effect of carboplatin. Biochemical and histopathological parameters were within

the expected range for the species in all animals. In our study, the aqueous extracts of wheat and HRS proved to be safe at the doses used and useful in the treatment of myelosuppression and excessive release of free radicals induced by the drug carboplatin.

**Keywords:** myeloprotection; neoplasma; paraoxanase 1; phytotherapeutic; platinum

## Lista de Figuras

### Artigo 1

- Figura 1 Variação da atividade média da enzima PON1 nos cães do grupo controle, e dos pacientes oncológicos antes da quimioterapia (Pré Químio) e sete dias após a terapia (Pós Químio). Letras diferentes significam ( $p < 0,05$ )..... 31

### Artigo 2

- Figura 1 Atividade da enzima PON1 nos grupos: G1 - sem indução; G2 induzidos com carboplatina e tratados com Salina 0,9%; G3 – induzidos com carboplatina e tratados com *T. aestivum* 100 mg.Kg-1; G4 – induzidos com carboplatina e tratados com - *T. aestivum* 400 mg.Kg-1 Barras representam o valor médio, as caixas representam o desvio padrão e os bigodes representam os valores máximos e mínimos. Letras diferentes representam ( $< 0.05$ )..... 43

### Artigo 3

- Figura 1 Figura 1 - Atividade da enzima PON1 nos grupos: G1 – Salina 0,9%, sem aplicação de carboplatina; G2 – Salina 0,9%; G3 – extrato aquoso de HRS 125mg.Kg; G4 - extrato aquoso de HRS 250mg.Kg. Barras representam o valor médio e letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ( $p < 0.05$ )..... 57
- Figura 2 Variação do número de leucócitos totais nos dias zero, três, dez e 21: G1 – Salina 0,9%, sem aplicação de carboplatina; G2 – Salina 0,9%; G3 – extrato aquoso de HRS 125mg.Kg; G4 - extrato aquoso de HRS 250mg.Kg. <sup>1</sup>Letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ( $p < 0.05$ )..... 58

## Lista de Tabelas

### Artigo 2

Tabela 1	Protocolo de indução e tratamento dos diferentes grupos experimentais.....	40
Tabela 2	Média dos valores dos hemogramas de ratos tratados com extrato aquoso de trigo (G3 e G4) após indução com carboplatina comparados com os grupos controles (G1 e G2).....	41
Tabela 3	Mielograma (médias) de ratos sem indução (G1), indução sem tratamento (G2) indução e tratados com extrato aquoso de <i>T. aestivum</i> (G3 e G4) no 21º dia após administração de protocolo quimioterápico com dose única de carboplatina intraperitoneal .....	42

### Artigo 3

Tabela 1	Mielograma (médias) de ratas tratadas (G3 e G4) ou não (G1 e G2) com extrato aquoso de HRS 21 dias após protocolo quimioterápico com dose única de carboplatina intraperitoneal (G2, G3, G4).....	59
----------	---	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ALT	Alanina Amino transferase
CAR	Carboplatina
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal.
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CIS	Cisplatina
CLINPET	Grupo de clínica pesquisa e extensão em pequenos animais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EO	Estresse oxidativo
EROS	Espécies reativas ao Oxigênio
ERN	Espécies reativas ao Nitrogênio
FA	Fosfatase alcalina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HRS	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>
INCA	Instituto nacional do Câncer
MCV	Volume corpuscular médio
NaCl	Cloreto de Sódio
PON1	Paraoxanase 1
RL	Radical livre
TVT	Tumor Venéreo Transmissível
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
WBC	Contagem de células brancas do sangue

## Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Revisão da Literatura.....</b>	<b>16</b>
<b>3 Artigos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Artigo 1.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Artigo 2.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Artigo 3.....</b>	<b>46</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>60</b>
<b>Referências.....</b>	<b>62</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>70</b>

## 1 Introdução

A relação entre a espécie humana e os animais têm se estreitado cada vez mais, essa aproximação propiciou o progresso da medicina veterinária e conseqüentemente a expectativa de vida de cães e gatos. Atrelado a isso está o aumento da prevalência de doenças típicas de animais idosos, tais como os neoplasmas malignos (câncer).

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que geram uma proliferação celular acelerada e descoordenada (INCA, 2016). Entre as principais causas que originam processos neoplásicos destaca-se a alteração do genoma celular, afetando a expressão de genes que controlam o crescimento e diferenciação celular (BOS, 1989), estresse oxidativo e a capacidade do organismo em reparar essas alterações (PANIS et al., 2012). No Brasil, a diretriz terapêutica mais empregada em tumores não ressecáveis, hematopoiéticos e na prevenção de metástases é a administração de fármacos antineoplásicos sistêmicos.

O uso de agentes antilblásticos, como a carboplatina, são imprescindíveis para a oncologia, entretanto seu uso possui diversos efeitos colaterais como a mielossupressão, estresse oxidativo e ototoxicidade (WHEATE et al., 2010; CASSALI et al., 2014). Para atenuar esses efeitos é de consenso a necessidade de uso de substâncias antioxidantes e imunoprolifáticas nesses pacientes (CONKLIN, 2004). Entre as substâncias com esses potenciais aparecem os extratos vegetais. Buscando encontrar novos recursos que atuem como adjuvante na terapia antineoplásica, desenvolveu-se este estudo com *Triticum aestivum* (trigo) e *Hibiscus rosa-sinensis* (HRS); plantas estas que já vem sendo pesquisadas pelo grupo de Clínica Pesquisa e Extensão em Clínica Médica de Pequenos Animais (ClinPet). O trigo é rico em compostos com efeito benéfico para esses pacientes, tais como compostos fenólicos e flavonoides, enquanto o HRS apresenta em sua constituição antocianinas, fitoquímico com potencial antioxidante (MOHAN et al., 2013; OZKOL et al., 2015).

Assim foi desenvolvido este estudo com as seguintes hipóteses: a terapia com fármacos antineoplásicos afeta o balanço oxidativo dos cães; e que o uso de extratos aquosos de trigo e hibisco possuem potencial adjuvante ao tratamento oncológico como antioxidante e mieloprotetor. Tendo como objetivo:

- Avaliar o balanço oxidativo, através da mensuração da atividade da Paraoxanase 1, em pacientes oncológicos caninos submetidos a terapia com fármacos antineoplásicos;
- Mensurar o potencial mieloprotetor assim como o balanço oxidativo em modelo murino submetido ao fármaco carboplatina e tratados com extrato aquoso de trigo e hibisco;
- Avaliar possíveis alterações bioquímicas e histopatológicas que sugiram nefropatias e/ou hepatopatias provenientes do uso da carboplatina, assim como o efeito terapêutico dos extratos frente a essas possíveis alterações.

Desta forma a apresentação dessa dissertação consta de uma revisão bibliográfica abordando o tema referente à influência dos fármacos antineoplásicos no balanço oxidativo e potencial terapêutico do trigo e do hibisco. Em sequência o desenvolvimento dos estudos, propostos para elucidar os objetivos, que resultaram na estruturação de três artigos. Primeiramente o artigo que se refere à espécie alvo “Atividade da Paraoxanase 1 em pacientes oncológicos caninos submetidos a terapia com fármacos antineoplásicos” o qual foi a base da proposta dos outros dois artigos; Efeitos da terapia antineoplásica com carboplatina sobre o balanço oxidativo e parâmetros hematopoiéticos, de ratas tratadas com extrato aquoso de *Triticum aestivum* e Ação do extrato aquoso de *Hibiscus rosa-sinensis* sobre a atividade da enzima Paraoxanase 1 e parâmetros hematopoiéticos, renais e hepáticos de ratas tratadas com carboplatina. A meta desses estudos foi o desenvolvimento de possíveis formulações farmacológicas com atividades de interesse ao paciente neoplásico tais como mieloproteção e antioxidante.

## **2 Revisão da literatura**

### **Câncer e modalidades terapêuticas**

O Câncer pode ser definido como um conjunto de doenças que geram uma multiplicação celular desordenada que não cessa mesmo depois de interrompido o estímulo que a originou. Essa propagação celular costuma gerar massas tumorais que podem apresentar características benignas ou malignas (câncer), ou distúrbios hematopoiéticos (PUI et al., 2006; INCA, 2016). Entre as principais causas que originam processos neoplásicos destaca-se a alteração do genoma celular, afetando a expressão de genes que controlam o crescimento e diferenciação celular (BOS, 1989), estresse oxidativo (PANIS et al., 2012) e a capacidade do organismo em reparar essas alterações (INCA, 2016).

Os neoplasmas são consideradas uma das afecções de maior importância na saúde humana e animal. Mesmo com grandes investimentos em pesquisa e tratamentos, no ano de 2012 foram estimados 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes em decorrência do câncer no mundo. Sendo os mais frequentes os pulmonares, mamários e colorretais, estando os pulmonares, hepáticos e gástricos citados como os de pior prognóstico (OTIS et al., 2011; FERLAY et al., 2015). Na medicina veterinária, embora não haja um estudo global sobre a casuística de pacientes com câncer, estima-se que a rotina oncológica represente 4% de todos os atendimentos, sendo os neoplasmas mamárias, mastocitomas e urogenitais os mais prevalentes (DE NARDI et al., 2002).

A terapia antineoplásica na medicina veterinária apresenta-se em constante aprimoramento, grande parte desse progresso deve-se ao avanço nas técnicas diagnósticas, aprimoramento de cirúrgicas de exérese tumorais, radioterapia e emprego de fármacos antineoplásicos. A exérese tumoral aliada à margem de segurança apropriada é a principal conduta terapêutica para a maioria dos tumores solitários, entretanto há exceções tais como o carcinoma inflamatório mamário (CASSALI et al., 2014) onde a radioterapia pode ser empregada, apresentando resultado satisfatório (MARCONATO et al., 2009), todavia ainda é demasiadamente

restrita a alguns centros no Brasil. Sendo assim, agentes quimioterápicos como a doxorrubicina, gencitabina e a carboplatina, como agente único ou associada ao anti-inflamatório piroxicam, são as principais modalidades terapêuticas empregadas (CASSALI et al., 2014). Os tumores hematopoiéticos como o linfoma também são prioritariamente tratados com agentes antitumorais, apresentando significativo aumento da qualidade de vida e sobrevida dos pacientes tratados, em especial para os subtipos de baixo e médio grau (VALLI et al., 2013). Hemangiossarcomas localizados no baço e no coração também obtiveram melhores índices de remissão quando a quimioterapia com doxorrubicina, vincristina e/ou ciclofosfamida foram associadas à ressecção da massa (WEISSE et al., 2005), resultado também observado em osteossarcomas e adenocarcinomas de glândula apócrina, quando a carboplatina foi associada a exérese tumoral (LANE et al., 2012; WOUUDA et al., 2013).

Devido à patogenia, apresentação e a agressividade do câncer ser extremamente ampla, diversos grupos de fármacos antineoplásicos são empregados dependendo do tipo, localização e estágio da doença, assim como das particularidades do paciente. Esses grupos são divididos em agentes alquilantes, antimetabólicos, inibidores de topoisomerase, antibióticos citotóxicos, inibidores mitóticos, enzimáticos, anticorpos monoclonais, hormonais e complexos de coordenação de platina. Devido ao uso crescente dos complexos platinados por sua eficácia frente às principais neoplasmas que acometem cães e gatos, optou-se por desenvolver este estudo, com a carboplatina, que está classificada dentro dos fármacos antineoplásicos platinados, com ação análoga aos alquilantes (CONKLIN, 2004; WHEATE et al., 2010).

### **Fármacos antineoplásicos platinados.**

Os fármacos que compreendem o grupo dos platinados são assim denominados pela sua composição baseada em coordenação com a platina. Esses agentes são denominados alquilantes devido ao seu potencial citotóxico ser proporcionado por sua capacidade de transferir um grupo alquila para grupos eletronegativos do DNA celular. A alquilação de maior importância ocorre no N-7 da guanina, base participante de todo ciclo celular, dificultando assim a multiplicação celular. Além disso, esses fármacos promovem a apoptose de células irreparáveis devido à identificação da lesão pela proteína citoplasmática 53. Os principais

representantes dos compostos coordenação de platina são cisplastina, carboplatina e oxaliplatina (WHEATE, 2010).

A Cisplatina (CIS) [cis-diamminedichloridoplatinum] foi descrita há mais de 150 anos, entretanto, apenas nas últimas três décadas, foi reconhecida como um potente agente antitumoral (NISHIKAWA et al., 2001). Seu principal sítio de ligação é o N-7 da guanina, acarretando na formação de ligações cruzadas intra e interfilamentares. Essas ligações aliadas às mutações no DNA interferem na replicação e transcrição celular, propiciando a inibição seletiva da síntese de DNA, aumentando assim a taxa de reparo do mesmo e de apoptose de células não reparáveis (WANG; LIPPARD, 2005). Seu emprego na medicina veterinária destaca-se nos cânceres geniturinários (KNAPP et al., 2013) e carcinomas escamosos (TAMZALI et al., 2011). Embora sua eficácia antineoplásica seja satisfatória em caninos, equinos e humanos, seu uso vem sendo gradativamente substituído por platinados de gerações superiores em função de sua eficácia ser dose dependente, implicando em importantes efeitos colaterais tais como náusea, êmese, mielossupressão, ototoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (HANIGAN; DEVARAJAN, 2003; WHEATE et al., 2010). Sendo, inclusive, utilizada em estudos experimentais para induzir os efeitos adversos supracitados (HUSAIN et al., 2001; SANTOS, 2008; KENWARD et al., 2014).

A carboplatina (CAR) [cis-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylate)platinum(II)] é um agente antineoplásico platinado de segunda geração, tendo como principal vantagem em relação a cisplatina a sua toxicidade reduzida devido a substituição da ligação do dicloreto com a 1,1-cyclobutanedicarboxylate; permitindo que sua ligação com água e nitritos ocorra de maneira mais lenta. Atualmente é um fármaco amplamente utilizando tanto na medicina humana quanto veterinária (CASSALI et al., 2014; JI et al., 2015). Na medicina humana seu emprego é recomendado contra neoplasmas de células pequenas de pulmão, carcinoma craniano e cervical e neoplasmas ovarianos (MCKEE et al., 2015). Enquanto na medicina veterinária seu emprego destaca-se em carcinomas hepatocelulares (GOUSSEV, 2015), carcinomas mamários (CASSALI et al., 2014), mesoteliomas pleurais (SPARKES et al., 2005), linfomas (GILLEM et al., 2015).

Além de sua alta eficácia contra diversos neoplasmas, a CAR ainda se apresenta como um importante antineoplásico na medicina felina, ao contrário da cisplatina que é altamente tóxico para a espécie (KNAPP et al., 2013). Outra

vantagem é sua versatilidade terapêutica, haja vista que a mesma pode ser associada com outros fármacos antineoplásicos como a doxorrubicina (BAILEY et al., 2003), gencitabina (CASSALI et al., 2014), citarabina (GILLEM et al., 2015) sendo também viável seu emprego por via intratumoral. Os efeitos adversos mais marcantes do uso da carboplatina são sua ação imunossupressora e oxidante (HUSAIN et al., 2001), sendo bastante comum a presença de leucopenia, neutropenia, trombocitopenia e ototoxicidade, podendo causar perda parcial ou completa da audição em humanos (BAUER et al., 1992) e ratos (HUSAIN et al., 2001).

A Oxaliplatina [Oxalate(2-)-O,O $\phi$ ][1R,2R-cyclohexanediamine-N,N $\phi$ ], é um platinado de terceira geração com estrutura similar a cisplatina. Esse fármaco ainda é pouco explorado na medicina veterinária, entretanto, na medicina humana, tem demonstrando menor resistência tumoral quando comparado à cisplatina e uma maior eficácia contra células neoplásicas que a CAR, devido a mesma exigir menos complexos de DNA para garantir a citotoxicidade terapêutica. Os outros fármacos que compõe o grupo dos platinados são nedaplatina, lobaplatina e heptaplatina, todavia seu uso é restrito para humano e somente aprovada no Japão, China e Coreia do Sul, respectivamente (WHEATE et al., 2010).

Os platinados supracitados, assim como a maioria dos grupos farmacológicos antineoplásicos, têm como principal objetivo atenuar a multiplicação de células neoplásicas e fazer apoptose das mesmas. Entretanto sua ação não é seletiva, ou seja, age em células não neoplásicas, em especial nas de rápida multiplicação, sendo responsável pela morte celular de células saudáveis além de sobrecarregar o balanço oxidativo e conseqüentemente gerando estresse oxidativo (WHEATE et al., 2010).

### **Estresse oxidativo na terapia antineoplásica**

Radicais livres (RL) são quaisquer espécies químicas com um ou mais elétrons desemparelhados em seu último orbital (HALLIWELL, 2006). A geração de RL constitui um processo fisiológico inerente aos processos oxidativos e metabólicos dos seres vivos, esses RL são altamente reativos devido a sua tendência de ganhar elétrons em sua última camada, sendo assim, trabalham como mediadores para a transferência de elétrons em uma gama de reações bioquímicas (SHAMI; MOREIRA, 2004). A sua produção é atribuída a processos endógenos primordiais a vida, tais

como a respiração celular, peroxissomos, enzimas do citocromo P450 e processos inflamatórios. Somando-se aos processos gerados pelo próprio organismo há também os processos exógenos como nutrição desbalanceada, exposição a radiações, poluição ambiental e fármacos, em especial, os antineoplásicos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; WINTER et al., 2009).

A liberação de radicais livres por fármacos antineoplásicos é explicada devido a sua ação citotóxica, sendo assim, ao danificar estruturas celulares ocorre uma massiva liberação de radicais livres (CONKLIN, 2004). A partir do momento que ocorre uma geração excessiva de RL, que ultrapasse os limites reparáveis para o organismo, denominamos essa situação como estresse oxidativo (EO) (BARBOSA et al., 2010). EO é a nomenclatura utilizada para descrever diversos processos deletérios, resultantes de um desequilíbrio entre a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e os mecanismos de defesa antioxidantes. As ERO e ERN são espécies de oxigênio e nitrogênio em um estado mais reativo que o seu representante molecular. Dentre as espécies radicais mais importantes no contexto biológico estão os íons superóxido, hidroxil, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e oxigênio singlete. (MONAGHAN et al., 2009; BARBOSA et al., 2010).

Devido ao paciente oncológico já apresentar falhas em mecanismos antioxidantes, o oncologista deve ter ciência que os fármacos antineoplásicos terão um impacto oxidante ainda maior nesses pacientes. Haja vista que a administração de fármacos como a doxorubicina e a carboplatina aumentam a peroxidação lipídica e implicam na redução da capacidade antioxidante total no plasma sanguíneo, assim como a redução dos níveis plasmáticos de antioxidantes como vitamina C e E, beta caroteno e glutathione (CONKLIN, 2004). A alteração nesses marcadores influencia no aparecimento de efeitos indesejados, como a diminuição da taxa de apoptose de células neoplásicas induzida pelos agentes, assim como promove alteração em células hípidas, podendo causar alterações deletérias em diversos tecidos. Além disso, o EO é diretamente responsável pela produção de fitas simples e duplas de DNA imperfeitas, assim como pirimidinas e desoxirriboses alteradas; podendo resultar na indução de transcrição e transdução inadequadas, acarretando em instabilidade genômica que, aliada a alteração dos genes supressores tumorais, propiciam a carcinogênese (KLAUNING et al., 2010).

## **Agentes antioxidantes**

Devido a constante geração de EO, os organismos desenvolveram mecanismos antioxidantes visando evitar e controlar possíveis danos provenientes das EROS. Esses mecanismos podem ser endógenos (sistema enzimático) sendo representados pela Glutathione peroxidase, Catalase, Superoxido dismutase e a Paraoxanase 1. Os organismos contam também com outras maneiras de balancear o EO, esse sistema é denominado não enzimático e composto por diversos agentes, sendo os principais as vitaminas A, C e E, selênio, zinco e fitoquímicos como as antocianinas e compostos fenólicos e flavonoides. Essas substâncias ajudam na eliminação de radicais como o superóxido, peróxido de hidrogênio, prevenindo a formação de outras espécies nocivas como oxigênio ativo e radicais hidroxilas (AFSHARI et al., 2015).

A recomendação médica para o uso de antioxidante é crescente na medicina humana, sendo usada para alterações cardiovasculares, como a aterosclerose, neurodegenerativas, como o Alzheimer, na doença renal crônica e como adjuvante no tratamento antineoplásico. O uso de antioxidantes em pacientes oncológicos promove o benefício terapêutico por atuarem no controle da proliferação tumoral e aumentarem a eficácia de drogas antineoplásicas (ROHENKOHL et al., 2011), além de amenizarem os efeitos indesejados tais como cardiotoxicidade, mielossupressão e mucosites (CONKLIN, 2004). Há estudos que indiquem que seu uso proteja células hígdas da ação das drogas antiblásticas e aumentem a ação das mesmas nas células alvo, permitindo redução da dosagem dos quimioterápicos (ANTUNES et al., 1998; SANTOS et al., 2001). Porém há trabalhos mais recentes, que embora incentivem o uso de antioxidantes concomitantemente com a terapia antineoplásica, não corroborem com a especificidade da ação desses agentes para o tecido alvo (CONKLIN, 2004).

## **Plantas Medicinais**

Plantas medicinais ou fitoterápicas são substâncias naturais com potencial terapêutico oriundas da flora terrestre. O emprego de plantas para esse fim é relatado desde os primórdios da civilização e ainda hoje representam um importante recurso medicinal. Esse potencial é atribuído aos compostos bioativos acumulados nas plantas denominados fitoquímicos. Seus principais grupos são os carotenoides,

fenóis, alcaloides, compostos organosulfurados, nitrogenados, assim como seus derivados (DAS et al., 2015).

A Organização Mundial da Saúde incentiva a utilização de fitoterápicos desde 1978. No Brasil, o emprego de alguns fitoterápicos como a *Copaifera* e *Calendula officinalis* estão sendo incentivados e utilizados no Sistema Único de Saúde. Embora seu emprego seja encorajado por importantes órgãos mundiais, ainda há poucos estudos e principalmente escassa difusão de conhecimento técnico referente à toxicidade e posologia dos mesmos, podendo tornar-se assim um risco a grande parte dos usuários que fazem seu uso empiricamente e muitas vezes sem orientação médica (KHAN et al., 2015).

### ***Triticum aestivum***

O *Triticum aestivum*, conhecido popularmente como trigo, é uma gramínea da família *Poacea* e do gênero *Triticum* (WHENT et al., 2012). O trigo é um dos principais ingredientes da dieta mundial e seu uso pela espécie humana é milenar. Além da sua função nutricional, o trigo apresenta potencial terapêutico contra diversas enfermidades. Sua eficácia se deve principalmente pela presença de compostos fenólicos, flavonoides, Methyl-pheophorbide, níveis de vitaminas A e C, assim como os minerais: selênio e zinco (DAS et al., 2015).

Os compostos fenólicos e flavonoides, além de terem função bactericida e cicatrizante (TILLMANN et al., 2014), possuem potencial antioxidante, assim como as vitaminas A e C e os minerais selênio e zinco (KHAN et al., 2015). Sendo assim, são úteis no tratamento de afecções crônicas influenciadas pelo estresse oxidativo tais como diabetes mellitus tipo dois (MUJORIYA et al., 2011) e aterosclerose. Associado a sua função antioxidante, o trigo apresenta mais um importante fitoquímico com ação antineoplásica, o Methyl-pheophorbide, composto capaz de aumentar a taxa de apoptose de células cancerosas (DAS et al., 2015). Somando-se as ações supracitadas há estudos mostrando seu efeito promissor na prevenção e tratamento de distúrbios hematopoéticos (SINGH et al., 2011; KHAN et al., 2015). Além das suas funções terapêuticas, outro motivador do seu emprego é sua baixa toxicidade. Em estudos experimentais, mostrou-se em ratos, serem toleradas doses orais superiores a 2000mg/kg sem efeitos colaterais de importância clínica (KHAN et al., 2015).

***Hibiscus rosa-sinensis***

O *Hibiscus rosa-sinensis* é uma planta arbustiva de cerca de seis metros de altura da família das *Malvaceas* e do gênero *Hibiscus*. Originalmente habitava exclusivamente o sudeste asiático, local onde é nativa, porém atualmente é comumente cultivada e encontrada nos trópicos devido à sua adaptação climática e o interesse humano, seja pelo seu uso ornamental, culinário e/ou terapêutico (PEKAMWAR et al., 2013).

Entre suas funções, a mais promissora se refere ao seu potencial medicinal, sendo os de maior relevância o seu efeito antitussígeno, antibacteriano, anti-inflamatório, anticonvulsivante, antidiarreico, antidislipidemia e na prevenção de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, tais como diabetes mellitus tipo dois, doenças neurodegenerativas, aterosclerose e neoplasmas (SACHDEWA et al., 2003; KHAN et al., 2015; FERREIRA et al., 2015). Seu potencial terapêutico é creditado pela presença dos seguintes fitoquímicos: ácido ascórbico, alcaloides, glicosídeos, ácidos graxos, resina, esteróis, taninos, saponinas e antocianinas (WONG et al., 2002; KHAN et al., 2015). Somando-se a essas funções benéficas, outro fator que estimula seu uso é sua baixa toxicidade. KASTURE e colaboradores (2000) avaliaram a toxicidade aguda do extrato etanólico e determinaram sua segurança em modelo murino nas doses testadas (até 1000 mg/kg). Entretanto, outro estudo no mesmo modelo mostrou que até doses de 4000mg/kg do extrato da raiz não apresentaram efeitos colaterais relevantes (VASUDEVA et al., 2008).

### **3 Artigos**

#### **3.1 Artigo 1**

##### **Atividade da Paraoxanase 1 em pacientes oncológicos caninos submetidos a terapia com fármacos antineoplásicos**

Gustavo Soares Forlani; Thomas Normanton Guim; Paula Fonseca; Samuel Rodrigues Félix; Anelize de Oliveira Campello Félix; Márcia de Oliveira Nobre

Submetido à revista Ciência Rural

## Atividade da Paraoxanase 1 em pacientes oncológicos caninos submetidos a terapia com fármacos antineoplásicos

Paraoxanase 1 activity in oncology canine patients undergoing therapy with anticancer drugs

### Resumo:

Os neoplasmas representam um dos maiores desafios da clínica médica de pequenos animais. A administração de fármacos antineoplásicos é uma das principais diretrizes terapêuticas para esses pacientes, embora o seu uso seja imprescindível, essas drogas apresentam efeitos colaterais importantes, tais como o estresse oxidativo. O organismo possui mecanismos de defesa contra esses efeitos, entre os quais podemos destacar a Paraoxanase 1 (PON1). Foram selecionados oito cães que foram segregados em dois grupos sendo o G1 constituído por quatro pacientes oncológicos caninos e o G2 constituído por quatro pacientes hígidos com gênero e idade equivalentes aos animais do G1. Objetivando mensurar a atividade da PON1 nesses pacientes, foram realizadas coletas sanguíneas no momento que antecedeu a aplicação dos agentes antineoplásicos no G1 (dia 0) e sete dias após a aplicação (Dia 7). Foi observado que os pacientes oncológicos apresentavam menor atividade da PON1 ( $p < 0,05$ ) do que os animais do G2, fator que foi significativamente acentuado após administração dos antineoplásicos ( $p < 0,05$ ). Nas condições deste estudo observou-se que a PON1 encontra-se diminuída em pacientes oncológicos, sendo ainda menor após a administração de agentes antineoplásicos.

Palavra-chave: estresse oxidativo; oncologia veterinária; PON1; quimioterapia

**Abstract:**

Cancer is one of the greatest challenges posed for small animal practice. One of the main ways to treat these disorders is the administration of anticancer agents, although their use is essential, these drugs have significant side effects, such as oxidative stress. The body has defense mechanisms against these effects, among which we highlight the paraoxanase 1 (PON1). Eight dogs were selected and divided into two groups: G1, made up of four cancer patients, and G2 made up of four healthy animals, paired by gender and age. In order to measure PON1 activity in these patients, blood samples were taken prior to the administration of antineoplastic agents in G1 (day 0) and seven days after application (Day 7). It was observed that cancer patients had lower activity of the PON 1 ( $p < 0.05$ ) than animals in G2, a factor that was significantly enhanced after administration of the antineoplastic treatment ( $p < 0.05$ ). In our study it was observed that the paraoxanase 1 is decreased in cancer patients, further undermined after administration of antineoplastic agents.

**Keyword:** chemotherapy; oxidative stress; PON 1; veterinary oncology

Os neoplasmas malignos estão entre as afecções de maior impacto na medicina veterinária. O índice de animais com câncer cresce a cada ano e estima-se que seja a causa do óbito de 16% da população canina (MICHELL et al., 1999). No Brasil, os neoplasmas de maior prevalência são os mamárias, os mastocitomas e os que afetam o sistema urogenital (DE NARDI et al., 2002). Esses índices são justificados devido às fêmeas dessa espécie apresentarem quatro pares de mamas e pela esterilização não ocorrer ou ser tardia, sendo a última válida também para a alta casuística de cães com tumor venéreo transmissível (TVT). Enquanto os altos índices de mastocitoma se explicam pela frequência de mutações no ponto do gene c-kit, que codifica o domínio justamembrana do receptor tirosina-quinase do *stem cell factor* (WEBSTER et al., 2006). Outro fator que está diretamente ligado a oncogênese é o estresse oxidativo (EO), devido ao mesmo ser responsável pelo envelhecimento celular,

propicia falhas na multiplicação celular e conseqüentemente favorece a carcinogênese (KLAUNING et al., 2010). O EO pode ser definido como um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e ação dos mecanismos antioxidantes do organismo. Entre esses mecanismos destaca-se a Paraoxanase 1 (PON1), essa enzima é produzida no fígado tendo como principal função biológica neutralizar as espécies reativas de oxigênio, reduzindo assim a peroxidação lipídica (FANG et al., 2012).

As principais diretrizes terapêuticas utilizadas nos neoplasmas supracitadas são a exérese cirúrgica, administração de fármacos antineoplásicos ou a realização de terapias multimodais, ou seja, associação da técnica cirúrgica apropriada com o uso de fármacos antineoplásicos de eleição para o caso (WEBSTER et al., 2006; CASSALI et al., 2014). A utilização de agentes antineoplásicos como a vimblastina é indicada para diversos neoplasmas, sendo considerado o protocolo padrão para o tratamento de mastocitomas de grau dois ou superior (WEBSTER et al., 2006). Seu uso está relacionado com menor índice de metástases e recidivas e conseqüentemente aumento de sobrevida. Outro alcaloide de interesse na oncologia veterinária é a vincristina, fármaco de eleição para o tratamento do TVT, podendo promover a remissão parcial e até mesmo completa desse neoplasma, que embora benigno, pode apresentar características malignas tais como desenvolvimentos de metástases (SANTOS et al., 2008; FERNANDES et al., 2013). Todavia há agentes mais indicados para o tratamento de carcinomas mamários, como a carboplatina, fármaco da segunda geração do grupo dos platinados, sendo também amplamente empregado no tratamento de tumores de células de transição da bexiga.

Embora os agentes antineoplásicos sejam imprescindíveis para o tratamento do câncer, em maior ou menor grau, todos apresentam efeitos colaterais indesejados, entre os quais se destaca a liberação excessiva de radicais livres inerentes à sua ação citotóxica (HUSAIN et

al., 2001; CONKLIN et al., 2004). Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar o impacto de diferentes protocolos quimioterápicos sobre a atividade da Paraoxanase 1 em cães.

Os cães participantes nesse estudo foram divididos em dois grupos (G1 e G2), sendo o critério de inclusão para o G1 o paciente apresentar o diagnóstico de neoplasma pelo método de citologia aspirativa por agulha fina ou por laudo histopatológico após biopsia incisional. Também foi determinado que a diretriz terapêutica apropriada basear-se exclusivamente no emprego de protocolos com quimioterápicos (n=4). O diagnóstico e respectivo tratamento desses pacientes foi: mastocitoma grau dois, mastocitoma grau três (ambos tratados com vimblastina associada à prednisona), tumor venéreo transmissível (vincristina), tumor de células de transição da bexiga (carboplatina). Enquanto para inclusão no G2 o cão deveria ser clinicamente hígido e apresentar gênero e faixa etária análoga aos cães participantes do estudo. Foram colhidas amostras sanguíneas de todos os cães do G1 por venopunção jugular no dia da administração do fármaco (dia 0) e sete dias após a administração (dia 7), já nos animais hígidos a coleta foi realizada uma única vez haja vista que os mesmos não receberam nenhum tratamento. As amostras foram colhidas em tubo sem EDTA e centrifugadas a 3500 rpm por dez minutos sendo posteriormente obtido o soro que permaneceu congelado até o momento da análise.

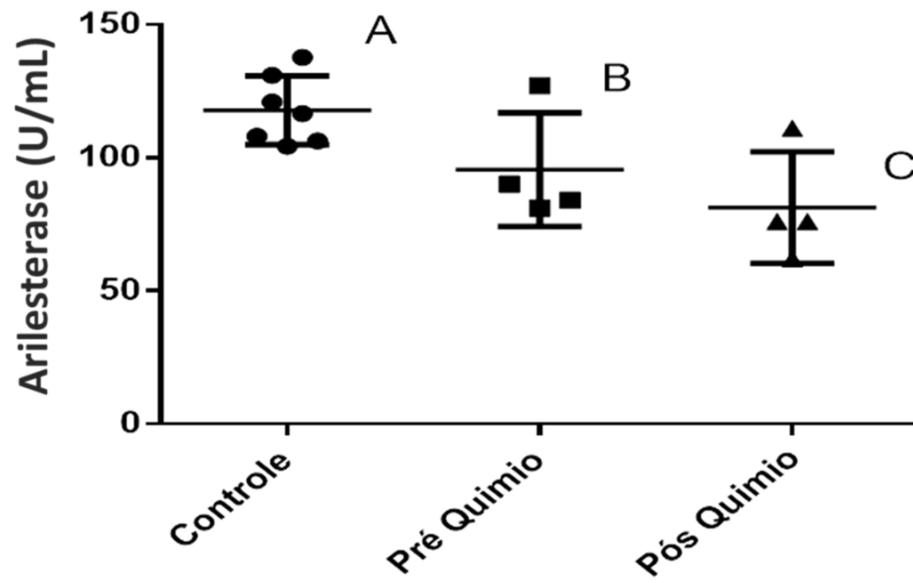
A atividade da PON1 foi mensurada nos dias zero e sete através da técnica do fenilacetato (Sigma – Aldrich). A avaliação ocorreu a partir da taxa de formação de fenol monitorada através da absorbância a 270 nm e 25 °C. O reagente de trabalho utilizado foi composto por 100 ml de Tampão 20 mM Tris/HCl pH 8.0, contendo 1 mM CaCl<sub>2</sub> e 50 uL de fenilacetato como substrato. As amostras foram diluídas na proporção de um para três em Tampão 20 mM Tris/HCl (10 uL de amostra e 20 uL de Tampão) e foi adicionado 3.3 uL desta diluição em 500 uL da solução de trabalho. A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo, na faixa de 270 nm com 20 segundos de retenção e um minuto

para leitura. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância com comparação das médias pelo teste Tukey. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

Os pacientes oncológicos (G1) apresentaram menores índices de atividade da PON1 ( $p < 0,05$ ) do que os animais hígidos (G2), esse resultado vai ao encontro com os obtidos por FELIX (2014) que demonstrou que os pacientes oncológicos caninos apresentam menor atividade dessa enzima quando comparado a cães hígidos, corroborando assim com a função dessa enzima como marcador do balanço oxidativo em pacientes oncológicos. Esse resultado também é partilhado em humanos (FANG et al., 2012) tendo seu efeito creditado ao aumento dos níveis séricos de radicais livres (BALCI et al., 2012). Outro resultado de interesse foi a redução da atividade PON1 ( $p < 0,05$ ) após o início da quimioterapia (Figura 1). Esse acompanhamento é inédito em cães, e demonstrou a influência de fármacos antineoplásicos no balanço oxidativo dessa espécie. Essa diminuição da atividade ser observada em diferentes tipos de neoplasma tratados com agentes antineoplásicos distintos demonstra que esses agentes causam EO exacerbado. Sendo assim, uma alternativa que pode apresentar benefício para os pacientes que necessitam desses agentes é a associação de compostos antioxidantes ao protocolo terapêutico. Haja vista que os resultados obtidos nesse estudo corroboram com o que é descrito na literatura, demonstrando que pacientes oncológicos apresentam redução de mecanismos antioxidantes. Esse processo tende a se agrava com a administração de fármacos antineoplásicos tanto devido sua ação citotóxica como pela sua influência direta sobre mecanismos antioxidantes (CONKLIN, 2004). Desta forma recomenda-se a mensuração da PON 1 como marcador do balanço oxidativo em cães com câncer, assim como, a monitoração da sua atividade em pacientes submetidos a terapia com agentes antineoplásicos. Além disso, sugere-se a continuação dos estudos visando determinar o valor prognóstico da PON 1 em pacientes caninos com câncer.

**Agradecimentos**

Agradecemos à CAPES e ao CNPq (Processo 305072/2012-9) pelo apoio financeiro aos pesquisadores e ao Laboratório de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas pela infraestrutura e apoio técnico.



**Figura 1.** Variação da atividade média da enzima PON1 nos cães do grupo controle, e dos pacientes oncológicos antes da quimioterapia (Pré Químio) e sete dias após a terapia (Pós Químio). Letras diferentes significam  $p < 0,05$ .

BALCI, H.; GENÇ, H.; PAPILA, C.; CAN, G.; PAPILA, B.; YANARDAG, H.; UZUN, H. Serum Lipid Hydroperoxide Levels and Paraoxonase Activity in Patients With Lung, Breast, and Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. v. 26, n. 3, p. 155–160, 2012

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAÚJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. V. F.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; NETO, R. T. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, Jaboticabal, v. 7, n. 2, p. 38-69, 2014.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integrative Cancer Therapies*, v. 3, n. 4, p. 294–300, 2004

DE NARDI, A. D.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasmas e modalidades de tratamentos em cães da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002

FANG, D. H.; FAN, C. H.; JI, Q.; QI, B. X.; LI, J.; WANG, L. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. *Molecular Biology Reproduction*, Holanda, v. 39, n. 6, p. 6801–6809, 2012.

FERNANDES, C. P. M.; GASPAR, L. F. J.; MEINERZ, A. R. M.; GRECCO, F. B.; NOBRE, M. O.; CLEFF, MARLETE, B. Tumor venéreo transmissível canino com metástase encefálica. *Semina, Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, p. 3929-3933, 2013.

FELIX, Anelize de Oliveira Campello. Avaliação de balanço oxidativo em cães com neoplasmas mamárias e teste do óleo resina de copaíba como terapia adjuvante em ratos. 2014. 53 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014. Disponível em: <<http://wp.ufpel.edu.br/ppgveterinaria/files/2014/07/Anelize-de-Oliveira-Campello-Felix.pdf>>. Acesso em: Jan. 16, 2016.

HUSAIN, K.; WHITWORTH, C.; SOMANI, S. M.; RYBAK, L. P. Carboplatin-induced oxidative stress in rat cochlea. *Hearing research*. v. 159, n (1-2), p.14-22, 2001.

KLAUNING, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicologic Pathology*, v. 38, p. 96-109, 2010.

MICHELL, A. R. Longevity of British Breeds of dog and its relationships with-sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Record**, v.145, n.22, p.625-629, 1999.

SANTOS, D. E.; SILVA, D. T.; TOLEDO-PINTO, E. A.; LOT, R. F. E. Tumor venéreo transmissível (TVT): Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, v. 6, n. 10, 2008.

WEBSTER, J.D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; RESAU, J. H.; KIUPEL, M. The role of c-kit in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasma*, v. 8, n. 2, p. 104-111, 2006.

### 3.2 Artigo 2

**Efeitos do *Triticum aestivum* sobre os danos causados pela terapia antineoplásica com carboplatina.**

Gustavo Soares Forlani; Luciele Varaschini Teixeira; Laura Michelin; Samuel Rodrigues Félix; Carmen Lúcia Garcez Ribeiro; Anelize de Oliveira Campello Félix; Márcia de Oliveira Nobre

Formatado segundo as normas da revista Semina Ciências Veterinárias

Efeitos do *Triticum aestivum* sobre os danos causados pela terapia antineoplásica com carboplatina.

**Resumo:**

Os neoplasmas representam uma das afecções de maior importância na medicina humana e veterinária. Entre as diretrizes terapêuticas mais utilizadas está a administração de agentes antineoplásicos sistêmicos como a carboplatina. Esse fármaco é eficaz no tratamento de diversos carcinomas, entretanto possui efeitos colaterais importantes como a mielossupressão e a liberação excessiva de radicais livres. Objetivou-se avaliar a utilização dos extratos aquosos de trigo como adjuvante a terapia antineoplásica com carboplatina. No estudo foram utilizadas 32 ratas, as quais foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos: G1 – controle negativo; G2 - controle tratado com solução fisiológica; G3 - tratado com extrato aquoso de trigo na concentração de 100 mg/kg; G4 - tratado com extrato aquoso de trigo na concentração de 400 mg/kg. Administrou-se 300 mg/m<sup>2</sup> de carboplatina (1ml) por via intraperitoneal no dia 0 nos grupos G2, G3, e G4, enquanto no G1 foi administrado 1 mL de solução fisiológica pela mesma via. Os animais foram tratados diariamente durante 21 dias por gavagem orogástrica de acordo com seu respectivo grupo experimental. Foi coletado sangue dos animais nos dias três, sete e 21, para realização de hemograma, testes bioquímicos e mensurar a atividade da Paraoxanase 1 (PON1). No dia 21 foi realizada a eutanásia dos animais e coletados aspirados do canal medular e amostras teciduais de rim e fígado. Foram observados resultados promissores com relação ao balanço oxidativo no G3, G4, pois ambos apresentaram maior atividade da PON1 do que o G2 (p<0,05). Além disso, foi constatado que os mesmos grupos apresentaram contagem de leucócitos totais superiores ao G2 durante todo o período experimental, com G4 diferindo significativamente do G2 (P<0,05) no dia 21. Os mielogramas dos animais do G3 e G4 apresentaram valores análogos ao G1, sendo que o G3 apresentou menor contagem de promielócitos e maior de células eritroides e rubroblastos que o G2 (p<0,05). Os resultados dos bioquímicos hepáticos e renais assim como as amostras histológicas de rim e fígado encontravam-se dentro dos parâmetros esperados para espécie. Nas condições experimentais deste estudo os extratos aquosos de trigo mostraram-se seguros nas doses utilizadas e úteis no tratamento da mielossupressão e liberação excessiva de radicais livres induzidas pelo fármaco carboplatina.

**Palavras-chave:** Fitoquímico; Quimioterapia; Paraoxanase 1; Mielograma;

**Abstract:**

Cancer is one of the most important diseases in human and veterinary medicine. Among the most common therapeutic guidelines is the administration of systemic anticancer agents such as carboplatin. This drug is effective in treating many carcinomas, but has major side effects such as myelosuppression and excessive release of free radicals. This study was designed to assess the use of aqueous wheat extracts as adjuvants in antineoplastic therapy with carboplatin. The study used 32 rats, which were randomly assigned to four groups: G1 - negative control; G2 - control treated with saline solution; G3 - treated with wheat aqueous extract at a concentration of 100 mg / kg; G4 - treated with wheat aqueous extract at a concentration of 400 mg / kg. Three hundred mg/m<sup>2</sup> of carboplatin was administered intraperitoneally on day 0 in G2, G3, and G4, while the G1 received 1 mL of saline solution by the same route. The animals were treated daily for 21 days by orogastric gavage according to their respective experimental group. Blood was collected from the animals on days three, 7,

and 21, for CBC, biochemical, and paraoxanase 1 (PON1) activity measuring. On day 21 the animals were euthanized and aspirates were collected from the spinal canal, as well as samples of kidney and liver tissue. Promising results were observed with respect to the oxidative balance in G3 and G4, as both showed better PON1 activity compared to G2 ( $p < 0.05$ ). Furthermore, it was found that these groups had higher counts of total leukocytes than G2 throughout the experimental period, and G4 was significantly different ( $P < 0.05$ ) on day 21. The animals G3 and G4 had myelogram values similar to G1, and G3 showed lower promyelocytes and greater rubroblastos erythroid cells compared to G2 ( $p < 0.05$ ). The biochemical and histological results were within expected parameters for the species. Under the experimental conditions of this study, aqueous extracts of wheat proved to be safe at the doses used and useful in the treatment of myelosuppression and excessive release of free radicals induced by the drug carboplatin.

**Key-words:** Chemotherapy; Paraoxanase 1; Myelogram; Phytochemical

## Introdução

Os neoplasmas malignos estão entre as afecções de maior importância para a saúde humana e animal. Mesmo com grandes investimentos em pesquisa e modalidades terapêuticas; em 2012, foram estimados 14,1 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes humanas em decorrência do câncer no mundo (FERLAY et al., 2015). Na medicina veterinária, embora não haja um estudo global sobre a casuística de pacientes com câncer, a Associação Americana dos Médicos Veterinários estima que dos 74 milhões de cães e dos 90 milhões de gatos que existem nos EUA, ao menos quatro milhões de cada espécie poderão desenvolver algum tipo de processo neoplásico a cada ano (WITHROW, 2007).

Os principais recursos utilizados no tratamento para essas afecções são a exérese cirúrgica, radioterapia, eletroquimioterapia, quimioterapia convencional e metronômica. A quimioterapia convencional é o método mais utilizado para o tratamento de neoplasmas hematopoiéticas, massas neoplásicas de ressecção inviável e para prevenção de recidivas ou metástases nos casos onde a exérese cirúrgica é inviável (BILLER, 2014; CASSALI et al., 2014).

A carboplatina [cis-diammine (1,1-cyclobutanedicarboxylate) platinum (II)] é um fármaco antineoplásico do grupo das platinas indicado para o tratamento de neoplasmas mamárias, epiteliais e outros carcinomas. Seu emprego deve-se a sua alta eficácia antineoplásica e efeitos colaterais inferiores quando comparados a outros agentes. Mesmo apresentando menos toxicidade, a carboplatina ainda apresenta efeitos indesejados marcantes, entre os quais se destacam a mielossupressão e a expressiva liberação de radicais livres (HUSAIN et al., 2001; WHEATE et al., 2010).

Visando manter o balanço oxidativo, o organismo possui mecanismos antioxidantes entre os quais se destaca a Paraoxanase 1 (PON1). A PON1 é uma enzima antioxidante produzida pelos hepatócitos cuja função é neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROS) reduzindo assim a peroxidação lipídica (FANG et al., 2012). Embora o organismo possua esses mecanismos antioxidantes, eles nem sempre são suficientes para conter a produção de radicais livres, quando essa situação ocorre a denominamos estresse oxidativo (EO). O EO é o principal promotor do envelhecimento celular, levando a alterações deletérias em diversos tecidos e propiciando

assim o aparecimento de doenças como Alzheimer, aterosclerose e o câncer (BARBOSA et al., 2010; KLAUNING et al., 2010; FANG et al., 2012).

Como recurso para atenuação dos efeitos indesejados dos quimioterápicos encontram-se os fitoterápicos. Entre os quais se destaca o *Triticum aestivum* devido sua composição ser rica em compostos fenólicos e flavonoides. Esses compostos possuem potencial frente a distúrbios hematopoiéticos (SINGH et al., 2011; KHAN et al., 2015) e neoplásicos (MUJORIYA; BODLA, 2011; DAS et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial mieloprotetor e antioxidante do extrato aquoso de trigo em modelo murino submetidos à quimioterapia com carboplatina.

## **Materiais e Métodos**

### *Obtenção dos extratos –*

As amostras do trigo foram colhidas na área rural do município de Jaguarão no estado do Rio Grande do Sul. Sendo primeiramente feito exsiccata das amostras e enviadas ao Herbário da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) para que fossem identificadas e catalogadas. Posteriormente o restante do material foi seco, triturado e encaminhado ao Laboratório de Oleoquímica e Biodiesel do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPel, para a extração dos produtos através da técnica de ultrassom por esgotamento. Imediatamente após a obtenção dos extratos, os mesmos foram submetidos a congelamento rápido em ultrafreezer e após 24 horas realizou-se a liofilização, quantificação e alíquotagem para uso diário.

### *Animais e protocolos experimentais –*

O experimento recebeu parecer favorável da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEAA - 10447). Foram utilizados 32 *Rattus norvegicus* Wistar, fêmeas, com 80 dias e peso aproximado de 212g, provenientes do Biotério Central da UFPel. Os animais foram mantidos em condições recomendadas; com controle de temperatura (21 graus Celsius  $\pm$  2 °C), manutenção de ciclo diário com 12 horas de claro e 12 horas de escuro, recebendo ração Nuvilab cr 1®<sup>1</sup> e água filtrada *ad libitum*. Após um período de adaptação de 15 dias as 32 ratas foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos, conforme descrito na Tabela 1, brevemente: G1; G2 tratados com solução fisiológica G3 - tratados com extrato aquoso de trigo na concentração de 100 mg/kg; e G4 - tratado com extrato aquoso de trigo na concentração de 400 mg/kg. As doses foram estipuladas baseada em estudos prévios em modelo murino que avaliaram o potencial antioxidante (MOHAN et al.; 2013) e imunoprotetor (KHAN et al.; 2015) do extrato etanólico de trigo.

Após o estabelecimento dos grupos, realizou-se o protocolo descrito por CASSALI et al. (2014) modificado utilizando carboplatina 300 mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal no dia 0 nos grupos G2, G3 e G4, enquanto no G1 foi administrado 1mL de solução fisiológica pela mesma via. Os animais foram tratados diariamente durante 21 dias por gavagem orogástrica (0,5 ml) de acordo com seu respectivo grupo experimental. Nos dias três e sete, foram coletadas amostras sanguíneas por punção do plexo retrobulbar com auxílio de colírio anestésico e pipetas do tipo Pasteur e no dia 21 por punção cardíaca. Ao final dos 21 dias de tratamento foi realizada a eutanásia dos animais por sobredose anestésica com Isoflurano, seguindo as recomendações do Conselho de Ética em experimentação animal. Após a realização da eutanásia as epífises

---

<sup>1</sup> Ração comercial para ratos Wistar. Nuvilab cr 1®.

craniais fêmures direitos foram seccionadas em bisel e a medula óssea aspirada para a confecção dos esfregaços que foram corados pelo método do panótico rápido. O fígado e o rim direito foram armazenados em formalina 10% e enviados ao Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da UFPel, onde foram incluídas em parafina e submetidas a cortes histológicos de 5µm e coradas com eosina-hematoxilina.

#### *Parâmetros analisados –*

O hemograma foi realizado nos dias três, sete e 21 através do analisador hematológico PocH-100iV Diff<sup>®2</sup> no qual foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do sangue (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas. Enquanto as análises bioquímicas foram realizadas em amostras séricas usando um analisador semiautomático para química clínica (Mindray BA-88<sup>®3</sup>). O soro foi obtido por centrifugação do sangue em microtubos, a 3500 rpm por cinco minutos. Kits de diagnóstico padronizados (Labtest<sup>®</sup>) foram utilizados para as avaliações espectrofotométricas dos seguintes parâmetros bioquímicos: Fosfatase Alcalina (FA), Alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina.

O mielograma foi avaliado através dos esfregaços dos aspirados do canal medular. As lâminas foram coradas com panótico rápido e analisadas sob objetiva de imersão, sendo determinadas a porcentagem dos rubroblasto, prorubrócito, rubrócito, metarubrócito, mieloblasto, promielócito, metamielócito, mielócito, bastonete, eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e monócitos em um total de 500 células, foram considerados os aspectos referentes ao diâmetro celular, bem como a morfologia nuclear e a citoplástica de acordo com CASTRO et al. (2011).

A atividade da PON1 foi mensurada através da técnica do fenilacetato (Sigma – Aldrich). A avaliação ocorreu a partir da taxa de formação de fenol monitorada através da absorbância a 270 nm e 25 °C. O reagente de trabalho utilizado foi composto por 100 ml de Tampão 20 mM Tris/HCl pH 8.0, contendo 1 mM CaCl<sub>2</sub> e 50 µL de fenilacetato como substrato. As amostras foram diluídas na proporção de um para três em Tampão 20 mM Tris/HCl (10 µL de amostra e 20 µL de Tampão) e foi adicionado 3,3 µL desta diluição em 500 µL da solução de trabalho. A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo, na faixa de 270 nm com 20 segundos de retenção e um minuto para leitura.

Os cortes histológicos provenientes do rim direito e do fígado foram incluídas em parafina fina e submetidas a cortes histológicos de 5µm e avaliadas em microscópio óptico (400x). Nesses cortes foram investigadas a presença ou ausência de lesões inflamatórias, proliferativas e degenerativas.

#### *Análise estatística*

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância com comparação das médias pelo teste Tukey. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

<sup>2</sup> Analisador hematológico. PocH-100iV Diff<sup>®</sup>. São Paulo, Brasil.

<sup>3</sup> Analisador químico clínico Mindray BA-88 A<sup>®</sup> Perdizes, Brasil.

### *Hemograma e bioquímica sérica –*

Os parâmetros hematológicos mantiveram-se estáveis durante todo o experimento no G1, enquanto os grupos experimentais tratados com extrato aquoso de trigo (G3 e G4) apresentaram maiores níveis de leucócitos totais e eritrócitos quando comparado aos animais do G2, sendo significativamente superior no dia 21 ( $p < 0,05$ ). Foi observada também uma importante trombocitopenia em todos os grupos em que a carboplatina foi administrada, não havendo diferença entre eles. Demais parâmetros hematológicos podem ser conferidos na Tabela 2.

### *Mielograma*

No mielograma, os animais do G2 apresentaram queda significativa do número total de células eritróides, rubriblastos e promielócitos, quando comparados aos animais do G1. Os animais tratados com extrato aquoso de trigo (G3 e G4) obtiveram níveis similares aos controles na maioria dos parâmetros avaliados (Tabela 3). Entretanto os animais do G3 apresentaram números de promielócitos inferiores ao G2 e similares ao G1. Dados completos referentes ao mielograma podem ser vistos na Tabela 3.

### *Atividade da PON1 –*

Os animais que receberam carboplatina, mas foram tratados com placebo (salina 0,9%) (G2) tiveram uma significativa queda na atividade da PON1, quando comparados aos animais que não receberam carboplatina (G1) ( $p < 0,05$ ). Os animais tratados com extrato aquoso de trigo (G3 e G4) não apresentaram redução na atividade dessa enzima (Figura 1).

### *Bioquímicos e histopatologia*

As análises bioquímicas realizadas, FA, ALT, ureia e creatinina não diferiram entre os grupos, mantendo-se dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie. Da mesma forma as análises histopatológicas não apresentaram alterações significativas, estando compatíveis com os padrões fisiológicos adequados para a espécie.

## **Discussão**

Este estudo apresenta, de forma inédita, o extrato aquoso de trigo como um adjuvante no tratamento quimioterápico, capaz de diminuir os efeitos colaterais mais frequentes da carboplatina: a mielosupressão e o estresse oxidativo (HUSAIN et al., 2001; WHEATE et al., 2010). A manutenção da atividade da PON1, a qual está relacionada à neutralização dos radicais livres, pode ser observada em ambos os grupos tratados com trigo (100mg/kg e 400 mg/kg). A preservação da atividade fisiológica demonstra efeito antioxidante desse extrato, possivelmente pelo mesmo ser rico em compostos fenólicos (ácido p-cumarínico, ácido carnósico, apigenina, quercetina) e flavonóide (ácido caempferol); haja vista que os compostos supracitados já se mostraram antioxidantes (SHAN et al., 2005; WOJDYLO et al., 2007; MASUOKA et al., 2012). O efeito antioxidante do trigo também já foi relatado *in vitro* (DAS et al., 2015) e *in vivo* (MOHAN et al., 2013), entretanto a sua capacidade de manter e aumentar a atividade da PON1 é inédita.

A ação mieloprotetora do extrato foi verificada pela análise do hemograma que revelou que animais do G3 e G4 apresentaram leucometria superior aos animais do G2 durante todo o período experimental, sendo o G4 significativamente superior aos demais grupos no dia 21 ( $p < 0,05$ ). Além disso, no mielograma observou-se que o G4 apresentou números totais de células eritróides, promielócitos e neutrófilos segmentados próximos aos valores dos animais que não foram submetidos à aplicação da carboplatina, diferentemente dos animais do grupo G2 que apresentaram valores significativamente inferiores ao grupo G1. Esses resultados corroboram para o potencial adjuvante do extrato aquoso de trigo na terapia antineoplásica, afinal, a ação mieloprotetora é extremamente benéfica ao paciente oncológico. Haja vista que a queda do número total de leucócitos e seus precursores é uma grave complicação, devido sua implicação direta em imunossupressão, comprometendo assim a continuidade do tratamento antineoplásico e propiciando o aparecimento de infecções secundárias, que podem ser fatais nesses pacientes (HAHN-AST et al., 2010; WUKETICH et al., 2012). Todavia é importante ressaltar que nem sempre as alterações observadas no mielograma são acompanhadas no hemograma (ALMEIDA et al., 2009), sendo assim, é fundamental que ambos os exames sejam interpretados juntos o que, nesse estudo, evidencia ainda mais o efeito mieloprotetor do extrato, haja visto que houve melhora tanto nos parâmetros do mielograma, quanto do leucograma.

A resposta favorável ao balanço oxidativo na dose de 100 mg/kg também foi obtida por MOHAN e colaboradores (2013), entretanto no seu estudo o extrato utilizado foi etanólico, diferindo do presente experimento que obteve resultados promissores utilizando o extrato aquoso. O mesmo pode ser dito com relação ao efeito anti-leucopenico do extrato, que foi apresentado por KHAN e colaboradores (2015), demonstrando que o extrato etanólico de trigo na dose de 400 mg/kg foi benéfico para animais mielossuprimidos, aumentando o número total de leucócitos e promovendo a quimiotaxia de neutrófilos no encontro de patógenos. Sendo assim, nossos resultados demonstram que o extrato aquoso de trigo nas concentrações de 100 e 400 mg/kg apresenta eficácia similar ao etanólico, sugerindo que a extração com solvente atóxico (água) conserva as propriedades terapêuticas do extrato.

### **Conclusão**

Conclui-se que o extrato aquoso de trigo é eficaz na redução do impacto mielossupressor e do estresse oxidativo causado pela carboplatina.

### **Agradecimentos**

Agradecemos à CAPES e ao CNPq (Processo 305072/2012-9) pelo apoio financeiro aos pesquisadores. A empresa Labtest® por ceder os testes bioquímicos. Ao Laboratório de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas pela infraestrutura e apoio técnico. Ao Biotério Central da UFPel pela estrutura e apoio da equipe.

**Tabela 1.** Protocolo de indução e tratamento dos diferentes grupos experimentais.

<b>Grupo</b>	<b>Indução dos efeitos da terapia no dia zero</b>	<b>Tratamento diário (21 dias)</b>
G1	NaCl 0,9%	NaCl 0,9%
G2	Carboplatina 300 mg/m <sup>2</sup>	NaCl 0,9%
G3	Carboplatina 300 mg/m <sup>2</sup>	E.A. <i>T. aestivum</i> 100mg.kg <sup>-1</sup>
G4	Carboplatina 300 mg/m <sup>2</sup>	E.A. <i>T. aestivum</i> 400mg.kg <sup>-1</sup>

**Tabela 2.** Média dos valores dos hemogramas de ratos tratados com extrato aquoso de trigo (G3 e G4) após indução com carboplatina comparados com os grupos controles (G1 e G2).

			Leuc. $\mu\text{l}$	Eosi $\mu\text{l}$	Mon $\mu\text{l}$	Linfó $\mu\text{l}$	Bast $\mu\text{l}$	Seg $\mu\text{l}$
Leucometria	Dia 3	G1	5487.5 <sup>a</sup>	12.3 <sup>b</sup>	27.8 <sup>b</sup>	4798.2 <sup>a</sup>	0.0	649.0 <sup>a</sup>
		G2	3737.5 <sup>b</sup>	11.8 <sup>b</sup>	54.8 <sup>b</sup>	2656.6 <sup>b</sup>	0.0	289.5 <sup>b</sup>
		G3	4725.0 <sup>b</sup>	12.6 <sup>b</sup>	52.3 <sup>b</sup>	4049.8 <sup>a</sup>	0.0	610.1 <sup>b</sup>
		G4	4750.0 <sup>b</sup>	10.0 <sup>b</sup>	74.1 <sup>b</sup>	4180.8 <sup>a</sup>	0.0	485.0 <sup>b</sup>
	Dia 7	G1	5137.5 <sup>b</sup>	53.2 <sup>a</sup>	34.3 <sup>b</sup>	3609.3 <sup>b</sup>	0.0	1328.0 <sup>b</sup>
		G2	4375.0 <sup>b</sup>	6.0 <sup>b</sup>	5.6 <sup>b</sup>	3797.1 <sup>b</sup>	0.0	566.2 <sup>b</sup>
		G3	4575.0 <sup>b</sup>	35.6 <sup>b</sup>	26.5 <sup>b</sup>	3703.6 <sup>b</sup>	0.0	809.1 <sup>b</sup>
		G4	4483.3 <sup>b</sup>	34.5 <sup>b</sup>	23.8 <sup>b</sup>	3359.5 <sup>b</sup>	0.0	1065.5 <sup>a</sup>
	Dia 21	G1	5350.0 <sup>b</sup>	44.2 <sup>b</sup>	35.1 <sup>b</sup>	4645.2 <sup>b</sup>	0.0	625.3 <sup>b</sup>
		G2	4262.5 <sup>b</sup>	46.6 <sup>b</sup>	33.0 <sup>b</sup>	3663.8 <sup>b</sup>	0.0	894.0 <sup>b</sup>
		G3	5328.5 <sup>b</sup>	48.5 <sup>b</sup>	25.2 <sup>b</sup>	4109.7 <sup>b</sup>	0.0	1145.0 <sup>b</sup>
		G4	6420.0 <sup>a</sup>	80.1 <sup>b</sup>	22.3 <sup>b</sup>	5409.0 <sup>a</sup>	0.0	1188.6 <sup>b</sup>
		PCV %	Eritrócito $\times 10^6/\mu\text{l}$	HG %	Plaquetas mil/mm <sup>3</sup>	VCM $\mu^3$	CHCM%	
Hematimetria	Dia 3	G1	47.6 <sup>b</sup>	8.6 <sup>b</sup>	16.0 <sup>b</sup>	1010.0 <sup>b</sup>	55.19 <sup>b</sup>	33.7 <sup>b</sup>
		G2	46.4 <sup>b</sup>	8.3 <sup>b</sup>	15.4 <sup>b</sup>	987.2 <sup>b</sup>	54.61 <sup>b</sup>	33.8 <sup>b</sup>
		G3	48.2 <sup>b</sup>	8.6 <sup>b</sup>	16.0 <sup>b</sup>	982.8 <sup>b</sup>	55.66 <sup>b</sup>	33.3 <sup>a</sup>
		G4	46.5 <sup>b</sup>	8.4 <sup>b</sup>	36.6 <sup>b</sup>	1047.3 <sup>b</sup>	54.83 <sup>b</sup>	33.0 <sup>a</sup>
	Dia 7	G1	46.6 <sup>b</sup>	8.4 <sup>a</sup>	15.7 <sup>a</sup>	1053.8 <sup>a</sup>	55.54 <sup>b</sup>	33.7 <sup>b</sup>
		G2	43.4 <sup>b</sup>	7.6 <sup>b</sup>	14.5 <sup>b</sup>	649.2 <sup>b</sup>	56.35 <sup>b</sup>	33.7 <sup>b</sup>
		G3	43.7 <sup>b</sup>	7.8 <sup>b</sup>	14.7 <sup>b</sup>	667.7 <sup>b</sup>	55.94 <sup>b</sup>	33.7 <sup>b</sup>
		G4	43.0 <sup>b</sup>	7.8 <sup>b</sup>	14.4 <sup>b</sup>	566.6 <sup>b</sup>	54.70 <sup>b</sup>	33.6 <sup>b</sup>
	Dia 21	G1	45.6 <sup>b</sup>	8.2 <sup>a</sup>	15.4 <sup>b</sup>	944.6 <sup>b</sup>	55.36 <sup>b</sup>	33.8 <sup>b</sup>
		G2	44.4 <sup>b</sup>	7.8 <sup>b</sup>	14.9 <sup>b</sup>	1000.1 <sup>b</sup>	56.84 <sup>b</sup>	33.6 <sup>b</sup>
		G3	46.1 <sup>b</sup>	8.1 <sup>b</sup>	15.4 <sup>b</sup>	927.2 <sup>b</sup>	56.76 <sup>b</sup>	33.5 <sup>b</sup>
		G4	45.0 <sup>b</sup>	8.0 <sup>b</sup>	15.1 <sup>b</sup>	1100.3 <sup>b</sup>	56.15 <sup>b</sup>	33.6 <sup>b</sup>

Tratamento: G1 – Salina 0,9%, sem aplicação de carboplatina; G2 – Salina 0,9%; G3 – *T. aestivum* 100 mg.Kg<sup>-1</sup>; G4 – *T. aestivum* 400 mg.Kg<sup>-1</sup>

<sup>a</sup> Representa valor estatisticamente diferente do grupo induzido e tratado com Salina 0,9% (G2) (P<0.05)

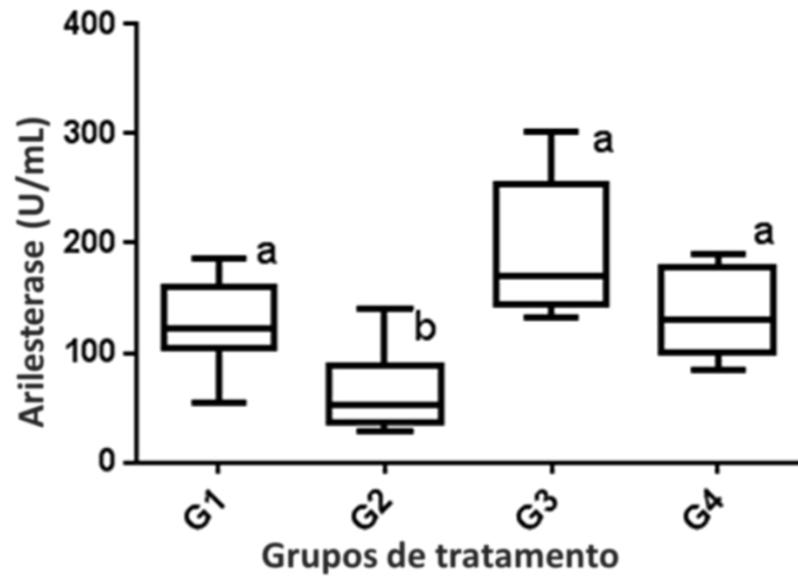
Leuc. – Leucocitos totais; Eosi – Eosinófilos; Mon – Monocitos; Linfó – Linfócitos; Bast – Bastonetes; Seg – Segmentados; PCV – Hematócrito; Erit – Eritrócitos; HG – hemoglobina; VCM – Volume corpuscular médio; CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

**Tabela 3.** Mielograma (médias) de ratos sem indução (G1), indução sem tratamento (G2) indução e tratados com extrato aquoso de *T. aestivum* (G3 e G4) no 21º dia após administração de protocolo quimioterápico com dose única de carboplatina intraperitoneal.

	G1	G2	G3	G4
Série Granulocítica. Valores absolutos.				
Células Totais	224.86	287.75	240.14	246.33
Relativos (%)				
Promielócitos	1.29 <sup>a</sup>	2.85 <sup>b</sup>	0.97 <sup>a</sup>	1.7 <sup>ab</sup>
Mielócitos	9.57	9.25	8.54	7.87
MetaMielócitos	7.34	6.85	7.79	7.43
Bastonetes	10.29	9.9	10.6	9.67
Segmentados	14.77 <sup>b</sup>	26.6 <sup>a</sup>	18.31 <sup>ab</sup>	18.62 <sup>ab</sup>
Eosinófilos	1	1.25	1.23	2.33
Basófilos	0.14 <sup>b</sup>	0.2 <sup>ab</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.5 <sup>a</sup>
Monócitos	0.37	0.6	0.36	0.37
Linfócitos	6.3	6.28	4.33	4.92
Plasmócitos	0.33	0.18	0.1	0.45
Megacariócitos*	5-10	2-10	0-10	0-6
Série Eritróide. Valores absolutos				
Células Totais	240.43 <sup>a</sup>	177 <sup>b</sup>	236 <sup>ab</sup>	235.17 <sup>ab</sup>
Relativo (%)				
Rubriblastos	0.54 <sup>ab</sup>	0.75 <sup>b</sup>	0.36 <sup>ab</sup>	1.1 <sup>a</sup>
ProRubricito	2.03	3.4	1.76	3.2
Rubricito	10.6	8.05	10.06	13.5
MetaRubricito	34.89	23.2	35.03	27.72
Razão Série Granulocítica / Eritróide				
	0.98 <sup>b</sup>	1.73 <sup>a</sup>	1.07 <sup>ab</sup>	1.08 <sup>ab</sup>

Tratamento: G1 – Salina 0,9%, sem aplicação de carboplatina; G2 – Salina 0,9%; G3 – *T. aestivum* 100 mg.Kg<sup>-1</sup>; G4 - *T. aestivum* 400 mg.Kg<sup>-1</sup>

<sup>ab</sup> Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes na linha (p<0.05)  
Ausência de letras significa valores estatisticamente iguais na linha (p>0,05)



**Figura 1.** Atividade da enzima PON1 nos grupos: G1 - sem indução; G2 induzidos com carboplatina e tratados com Salina 0,9%; G3 – induzidos com carboplatina e tratados com *T. aestivum* 100 mg.Kg-1; G4 – induzidos com carboplatina e tratados com - *T. aestivum* 400 mg.Kg-1 Barras representam a mediana, as caixas representam o desvio padrão com os valores máximos e mínimos. Letras diferentes representam valores estatisticamente.

## Referências bibliográficas

- ALMEIDA, R. K.; VASCONCELOS, A. C.; CARNEIRO, R. A.; PAES, P. R. O.; MORO, L. Alterações citológicas do sangue periférico e da medula óssea de cães com cinomose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.61, n.6, p.1255-1260, 2009.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BILLER, B. Metronomic Chemotherapy in Veterinary Patients with Cancer. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v.44, n.5, p.817-829, 2014.
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAÚJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. V. F.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; NETO, R. T. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, Jaboticabal, v.7, n.2, p.38-69, 2014.
- CASTRO, R. D.; SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; BOELONI, J. N.; NUNES, P. P.; SILVA, G. R.; MELO, M. M.; PAES, P. R. O.; SERAKIDES, R. Mielograma de ratas com disfunção tireoidiana. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.63, n.5, p.1246-1250, 2011.
- DAS, P.; MANDAL, S.; GANGOPADHYAY, S.; DAS, K.; MITRA, A. G.; DASGUPTA, S.; MUKHOPADHYAY, S.; MUKHOPADHYAY, A. Antioxidative and anticarcinogenic activities of methylpheophorbide a, isolated from wheat grass (*Triticum aestivum* Linn.). *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, London, v.18, n.1-4, p.474-477, 2015.
- FANG, D. H.; FAN, C. H.; JI, Q.; QI, B. X.; LI, J.; WANG, L. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. *Molecular Biology Reproduction*, Holanda, v.39, n.6, p.6801-6809, 2012.
- FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. I.; DIKSHIT, R.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, D. F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, Germany, v.136, n.5, p.E359-E386, 2015.
- HAHN-AST, C.; GLASMACHER, A.; MUCKTER, S.; SCHMITZ, A.; KRAEMER, A.; MARKLEIN, G.; BROSSART, P.; TOAL, V. L. Overall survival and fungal infection-related mortality in patients with invasive fungal infection and neutropenia after myelosuppressive chemotherapy in a tertiary care center from 1995 to 2006. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, v.65, n.4, p.761-768, 2010.
- HUSAIN, K.; WHITWORTH, C.; SOMANI, S. M.; RYBAK, L. P. Carboplatin-induced oxidative stress in rat cochlea. *Hearing research*, v.159, n(1-2), p.14-22, 2001.
- KHAN, N.; GANESHPURKAR, A.; DUBEY, N.; BANSAL, D. Immunoprophylactic potential of wheat grass extract on benzene induced leukemia: An *in vivo* study on murine model. *Indian Journal of Pharmacology*, India, v.47, n.4, p.394-397, 2015.
- KLAUNING, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A.; Oxidative stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicology Pathology*, v.38, p.96-109, 2010.
- MASUOKA, N.; MATSUDA, M.; KUBO, I. Characterization of the antioxidant activity of flavonoids. *Food Chemistry*, Barking, v.131, n.2, p.541-545, 2012.

MOHAN, Y.; JESUTHANKARAJ, G. N.; THANGAYELU, N. R. Antidiabetic and Antioxidant Properties of *Triticum aestivum* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Advances in Pharmacological Sciences*, Cairo, Article ID716073, p.9, 2013.

MUJORIYA, R.; BODLA, R. B. A study on wheat grass and its Nutritional value. *Food Science and Quality Management*, Gaziabad, India, n.2, v.2, p.1-8, 2011.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, v.53, n.20, p.7749-7759, 2005.

SINGH, J.; SETHI, J.; YADAV, M.; SOOD, S.; GUPTA, V. Effect of *Triticum aestivum* juice on wound healing in rats. *International Journal of Natural Product Science*, San Marcos, EUA, v.1, n.1, p.15-20, 2011.

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Journal for Inorganic, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*, London, v.39, n.35, p.8113-8127, 2010.

WITHROW, S. J. Why Worry About Cancer in Pets? In: VAIL, D. M. WITHROW, S. J. *Withrow and Macewen's small animal clinical oncology*. 4 ed., p.15-17, 2007.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, Barking, v.105, n.3, p.940-949, 2007.

WUKETICH, S.; HIENZ, S. A.; MAROSI, C. Prevalence of clinically relevant oral mucositis in outpatients receiving myelosuppressive chemotherapy for solid tumors. *Supportive Care in Cancer*, Dinamarca, v. 20, n.1, p.175-183, 2012.

### 3.3 Artigo 3

**Ação do extrato aquoso de *Hibiscus rosa-sinensis* sobre a atividade da enzima Paraoxanase 1 e parâmetros hematopoiéticos, renais e hepáticos de ratas tratadas com carboplatina.**

Gustavo Soares Forlani; Luciele Varaschini Teixeira; Mariana Teixeira Tillmann; Samuel Rodrigues Félix; Laura Michelon; Rodrigo Franco Bastos; Carmen Lúcia Garcez Ribeiro; Anelize de Oliveira Campello Félix; Márcia de Oliveira Nobre

Formatado segundo as normas da revista Ciência Rural

Ação do extrato aquoso de *Hibiscus rosa-sinensis* sobre a atividade da enzima Paraoxanase 1 e parâmetros hematopoiéticos, renais e hepáticos de ratas tratadas com carboplatina.

## Resumo

Este estudo avaliou o extrato aquoso de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* (HRS) na atenuação dos efeitos colaterais do tratamento antineoplásico com carboplatina. Trinta e duas foram distribuídas em quatro grupos, conforme tratamento: G1 – controle negativo, induzido e tratado com solução fisiológica; G2 – controle positivo induzido com carboplatina e tratado com solução fisiológica; G3 - induzido com carboplatina e tratado com extrato aquoso de HRS na concentração de 125 mg/kg; e G4 - induzido com carboplatina e tratado com extrato aquoso de HRS na concentração de 250 mg/kg. Administrou-se 300 mg/m<sup>2</sup> de carboplatina por via intraperitoneal no dia zero nos grupos G2, G3, e G4. Os animais foram tratados diariamente durante 21 dias por gavagem orogástrica. Foi avaliado o mielograma, hemograma, parâmetros bioquímicos e histopatológicos, além do balanço oxidativo através da mensuração da atividade da enzima PON1. Efeitos de interesse dos extratos incluem maior atividade da PON1 nos animais tratados (G3 e G4) comparados aos do G2 ( $p < 0,05$ ); menor queda na contagem de leucócitos nos dias três e 21 ( $p < 0,05$ ); e números totais de células eritróides, promielócitos e neutrófilos segmentados similares aos animais que não foram submetidos à aplicação da carboplatina. Os resultados das análises bioquímicas e histopatológicas encontravam-se dentro dos parâmetros esperados para espécie em todos os grupos. Nas condições deste estudo, o extrato aquoso de *Hibiscus rosa-sinensis* mostrou-se seguro nas concentrações utilizadas e capaz de minimizar os efeitos colaterais do tratamento com carboplatina, como a mielossupressão e circulação excessiva de radicais livres.

**Palavra-chave:** antocianinas; estresse oxidativo; fitoquímicos; mielograma; PON1

**Abstract**

This study assessed the use of an aqueous extract of *Hibiscus rosa-sinensis* (HRS) flowers on the reduction of deleterious side effects of carboplatin antitumor treatment. Thirty-two female wistar rats were treated according to the allocated group: G1 – Negative control, treated and induced with saline; G2 – positive control, treated with saline and induced with Carboplatin; G3 – Treated with HRS extract at 125 mg/Kg; and G4 – Treated with HRS extract at 250 mg/Kg. Induction of groups G2, G3, and G4 was carried out with a single dose of intraperitoneal carboplatin at 300 mg/m<sup>2</sup>. The animals were treated daily, for 21 days, through orogastric gavage. Mielogram, hemogram, oxidative balance (through PON1 activity), biochemical, and histopathological parameters were assessed. Animals treated with HRS extract (G3 and G4) had higher PON1 activity compared to G2 (P<0.05); higher leucocyte count (P<0.05); and erythrocyte, promyelocyte, and neutrophil counts similar to un-induced animals (G1). Biochemical and histopathological parameters were within normal levels for animals in all groups. In the conditions of this study, *Hibiscus rosa-sinensis* aqueous extract was safe to use, and reduced deleterious side effects associated with the use of Carboplatin, especially myelosuppression and excessive circulation of free radicals.

Key-words: phytochemical; oxidative stress; antocianins; mielogram; PON1

Os neoplasmas malignos (câncer) são doenças de grande impacto na medicina humana e veterinária. Embora não haja um dado global sobre a casuística de pacientes veterinários com câncer, um estudo epidemiológico realizado no reino unido demonstrou que de 100.000 cães atendidos, 1437 apresentaram algum tipo de neoplasma (DOBSON et al., 2002), enquanto MICHELL (1999) constatou que o câncer foi responsável por 16% dos óbitos no período avaliado em seu estudo.

Dada a sua relevância, a medicina desenvolveu diversos recursos para debelar o câncer, sendo a exérese tumoral e/ou administração de fármacos antineoplásicos sistêmicos os métodos mais utilizados (CASSALI et al., 2014). Entre esses fármacos destaca-se a carboplatina [cis-diammine (1,1-cyclobutanedicarboxylate) platinum (II)], um platinado de segunda geração indicado para o tratamento de diversos carcinomas, obtendo resultados particularmente positivos em carcinomas mamários, epiteliais e urogenitais. A frequência do seu uso está relacionada tanto com sua ótima resposta terapêutica como também aos seus efeitos colaterais inferiores quando comparados a outros agentes. Todavia a carboplatina ainda apresenta efeitos deletérios como a mielossupressão, ototoxicidade e a expressiva liberação de radicais livres (HUSAIN et al., 2001; WHEATE et al., 2010).

Visando balancear a proporção desses radicais, o organismo possui mecanismos antioxidantes tais como a Paraoxanase 1 (PON1). A PON1 é uma enzima antioxidante produzida no fígado cuja função biológica é neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROS) reduzindo assim a peroxidação lipídica (FANG et al., 2012). Além dos mecanismos endógenos, há compostos naturais que podem ser utilizados no controle da liberação de radicais livres, tais como o *Hibiscus rosa-sinenses* (HRS), planta da família das *Malvaceas* rica no fitoquímico Antocianina, um poderoso antioxidante (OZKOL et al., 2015; AFSHARI et al., 2015).

Embora os mamíferos contem com mecanismos antioxidantes endógenos e exógenos, os mesmos podem não ser suficientes para neutralizar episódios onde ocorrem maciças liberações de radicais livres, quando isso ocorre denominamos essa situação de estresse oxidativo (EO). O EO é principal causador do envelhecimento celular, propiciando assim falhas na multiplicação celular e conseqüentemente a carcinogênese (KLAUNING et al., 2010).

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial mieloprotetor do extrato aquoso de *Hibiscus rosa-sinenses* na concentração de 125 mg/kg e 250 mg/kg e a sua eficácia na manutenção do balanço oxidativo em modelo murino submetido a quimioterapia com carboplatina.

O experimento recebeu parecer favorável da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPel (CEEAA - 10447). Foram utilizadas 32 ratas Wistar adultas com 80 dias de idade e peso médio de 227 gramas. As ratas foram alojadas em caixas plásticas e receberam ração comercial Nuvilab cr 1®<sup>4</sup> e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram mantidos em regime de 12 horas de claro/escuro, com temperatura de 21 graus Célsius. Após um período de adaptação de 15 dias as mesmas foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos: G1 - controle negativo tratado com solução fisiológica; G2 - controle positivo tratado com solução fisiológica; G3 - tratado com extrato aquoso de HRS na concentração de 125mg/kg G4 - tratado com extrato aquoso de HRS na concentração de 250mg/kg.

Iniciou-se realizando o protocolo modificado descrito por CASSALI e colaboradores (2014) utilizando carboplatina 300mg/m<sup>2</sup> por via intraperitoneal no dia zero nos animais dos grupos G2, G3 e G4, enquanto nos animais do G1 foi administrado 1ml de solução fisiológica pela mesma via. Os animais foram tratados diariamente durante 21 dias por gavagem orogástrica (0,5ml) de acordo com seu respectivo grupo experimental. Para a realização de

---

<sup>4</sup> Ração para ratos Wistar. Nuvilab cr 1®. Curitiba, Paraná, Brasil.

análises sanguíneas, foram coletadas amostras de sangue nos dias três, sete e 21 por capilaridade através da punção do plexo retrobulbar com auxílio de colírio anestésico e pipetas tipo Pasteur. Findado 21 dias de tratamento, foi realizada a eutanásia dos animais por sobredose anestésica com Isoflurano, seguindo as recomendações do Conselho de Ética em Experimentação Animal. Após a realização da eutanásia as epífises craniais dos fêmures direitos foram seccionadas em bisel e a medula óssea aspirada para a confecção dos esfregaços que foram corados pelo método do panótico rápido e avaliados de acordo com CASTRO e colaboradores (2011). O fígado e o rim direito foram armazenados em formalina 10% e enviados ao setor de patologia veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) onde foram incluídas em parafina e submetidas a cortes histológicos de 5µm, coradas com eosina-hematoxilina e investigadas em a presença ou ausência de lesões inflamatórias, proliferativas e degenerativas em microscópio óptico (400x).

A análise do hemograma foi realizada nos dias três, sete e 21 no analisador hematológico PocH-100iV Diff®<sup>5</sup> onde foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem de células vermelhas do sangue (RBC), hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM), contagem de células brancas do sangue (WBC), neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e plaquetas. Enquanto as análises bioquímicas (Fosfatase alcalina, Creatinina, Ureia e Alanina aminotransferase) foram realizadas em amostras séricas usando um analisador semi automático para química clínica (Mindray BA-88®<sup>6</sup>).

A atividade da PON1 foi mensurada no dia três através da técnica do fenilacetato (Sigma – Aldrich). A avaliação ocorreu a partir da taxa de formação de fenol monitorada através da absorbância a 270 nm e 25 °C. O reagente de trabalho utilizado foi composto por 100 ml de Tampão 20 mM Tris/HCl pH 8.0, contendo 1 mM CaCl<sub>2</sub> e 50 µL de fenilacetato

---

<sup>5</sup> Analisador hematológico PocH-100iV Diff ® São Paulo, SP

<sup>6</sup> Analisador químico clínico Mindray BA-88 A ® Perdizes, SP

como substrato. As amostras foram diluídas na proporção de um para três em Tampão 20 mM Tris/HCl (10 uL de amostra e 20 uL de Tampão) e foi adicionado 3.3 uL desta diluição em 500 uL da solução de trabalho. A leitura foi realizada em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo, na faixa de 270 nm com 20 segundos de retenção e um minuto para leitura. Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância com comparação das médias pelo teste Tukey. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

A indução da mielossupressão pela carboplatina foi constatada tanto pela significativa redução de leucócitos totais no hemograma (Fig. 1) como pela queda do número total de células eritróides, rubriblastos e promielócitos demonstradas nos mielogramas do G2 quando comparadas ao G1 (Tab. 1). Da mesma forma foi demonstrado um efeito significativamente superior na neutralização de radicais livres pela maior atividade da enzima PON1 no G1 quando comparado ao G2, grupo induzido com carboplatina (Fig. 2).

Em ambas as concentrações dos extratos, constatou-se balanço oxidativo equivalente ao fisiológico (G1), através da maior atividade da PON1 nos animais dos grupos G3 e G4 quando comparados aos animais do grupo dois ( $p < 0,05$ ) (Fig 1). A atividade antioxidante do HRS pode ser justificada pela presença no extrato de compostos antioxidantes como as antocianinas. Esse potencial já foi demonstrado *in vitro* (AFSHARI et al., 2015) e *in vivo* (SANKARAN; VADIVEL, 2011) utilizando extrato etanólico de HRS, entretanto nossos resultados são inéditos quando se refere a utilização do extrato aquoso como promotor da atividade da PON1.

O efeito mieloprotetor do extrato foi verificado pela análise do hemograma que revelou que os animais do G3 e do G4 apresentaram contagem de leucócitos totais superior à dos animais do G2 durante todo o período experimental; sendo significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) nos dias três e 21 para os animais do G4 e no dia 21 para animais do G3 (Fig. 2). Além disso, no mielograma se observou que os animais do G3 e do G4 apresentaram números

totais de células eritróides, promielócitos e neutrófilos segmentados similares aos animais que não foram submetidos à aplicação da carboplatina. Enquanto os animais do grupo G2 apresentaram valores significativamente inferiores ao grupo G1 no número total de células eritróides e superiores de neutrófilos segmentados e promielócitos ( $p < 0,05$ ) (Tab. 1). Sugerindo que a medula óssea do G2 necessitou aumentar a produção da série granulócítica para compensar os efeitos gerados pela carboplatina, diferentemente dos grupos tratados com extrato aquoso de HRS que por não sofrerem impacto expressivo na contagem de leucócitos totais durante o período experimental não precisou recuperar a leucopoese.

As análises bioquímicas realizadas (ALT, FA, Creatinina e Ureia), assim como as análises histológicas do rim e do fígado, não apresentaram alteração entre os grupos, estando dentro dos parâmetros fisiológicos da espécie, sugerindo baixa ou nenhuma toxicidade dos extratos aquosos nas concentrações testadas.

Conclui-se que o extrato aquoso de HRS representa um eficaz recurso para redução do impacto mielossupressor da carboplatina e colabora para a manutenção do balanço oxidativo.

### **Agradecimentos**

Agradecemos à CAPES e ao CNPq (Processo 305072/2012-9) pelo apoio financeiro aos pesquisadores. A empresa Labtest® por ceder os testes bioquímicos. Ao Laboratório de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas pela infraestrutura e apoio técnico e ao Biotério Central da UFPel pela estrutura e apoio da equipe.

## REFERÊNCIAS

- AFSHARI, K.; SAMAVATI, V.; SHAHIDI, A. Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.74, p.558-567, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25150112>>. Acesso em: Nov. 1, 2015. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.07.023.
- CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAÚJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. V. F.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; NETO, R. T. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v.7, n.2, p.38-69, 2014. Disponível em: <[http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/07/DOWLOAD-FULL-ARTICLE-1-20881\\_2014\\_7\\_31\\_6\\_23.pdf](http://bjvp.org.br/wp-content/uploads/2015/07/DOWLOAD-FULL-ARTICLE-1-20881_2014_7_31_6_23.pdf)>. Acesso em: jan. 10, 2016.
- CASTRO, R. D.; SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; BOELONI, J. N.; NUNES, P. P.; SILVA, G. R.; MELO, M. M.; PAES, P. R. O.; SERAKIDES, R. Mielograma de ratas com disfunção tireoidiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, p.1246-1250, 2011. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi->

bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nex  
tAction=lnk&exprSearch=605855&indexSearch=ID>. Acesso em: jan. 10, 2016.

DOBSON, J. M.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGERS, K.; WOOD, J. L. Canine neoplasma in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **The Journal of the Small Animal Practice**, v.46, n.6, p.240-246, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x/abstract>>. Acesso em: jan. 10, 2016. doi: 10.1111/j.1748-5827.2002.tb00066.x.

FANG, D. H.; FAN, C. H.; JI, Q.; QI, B. X.; LI, J.; WANG, L. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. **Molecular Biology Reproduction**, v.39, n.6, p.6801–6809, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11033-012-1505-3>>. Acesso em: jan. 10, 2016. doi: 10.1007/s11033-012.1505-3.

HUSAIN, K.; WHITWORTH, C.; SOMANI, S. M.; RYBAK, L. P. Carboplatin-induced oxidative stress in rat cochlea. **Hearing research**, v.159, n(1-2), p.14-22, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378595501003069>>. Acesso em: jan. 10, 2016. doi: 10.1016/S0378-5955(01)00306-9.

KLAUNING, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 38, n.1, p. 96-109, 2010. Disponível em: <<http://tpx.sagepub.com/content/38/1/96.short>>. Acesso em: jan. 10, 2016. doi: 10.1177/0192623309356453.

MICHELL, A. R. Longevity of British Breeds of dog and its relationships with-sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Record**, v.145, n.22, p.625-629, 1999. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/10619607>>. Acesso em: jan. 10, 2016. doi: 10.1136/vr.145.22.625.

OZKOL, H. U.; KOYUNCU, I.; TULUCE, Y.; DILSIZ, N.; OZKOL, H. Anthocyanin-rich extract from *Hibiscus sabdariffa calyx* counteracts UVC-caused impairments in rats. **Pharmaceutical biology**, v.53, n.10, p.1435-1441, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/13880209.2014.980586>>. Acesso em: jan. 10, 2016. doi: 10.3109/13880209.2014.980586.

SANKARAN, M.; VADIVEL, A. Antioxidant and Antidiabetic Effect of *Hibiscus rosasinensis* Flower Extract on Streptozotocin Induced Experimental Rats-a Dose Response Study. **Notulae Scientia Biologicae**, v.3, n.4, p.13-21, 2011. Disponível em: <<http://search.proquest.com/openview/7c620ecb872a11a8adef8dd9f1edd94e/1?pq-origsite=gscholar>>. Acesso em: jan. 10, 2016.

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. **Journal for Inorganic, Organometallic and Bioinorganic Chemistry**, v.39, n.35, p.8113-8127, 2010. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2010/dt/c0dt00292e#!divAbstract>>. Acesso em: jan. 10, 2016. doi: 10.1039/C0DT00292E.

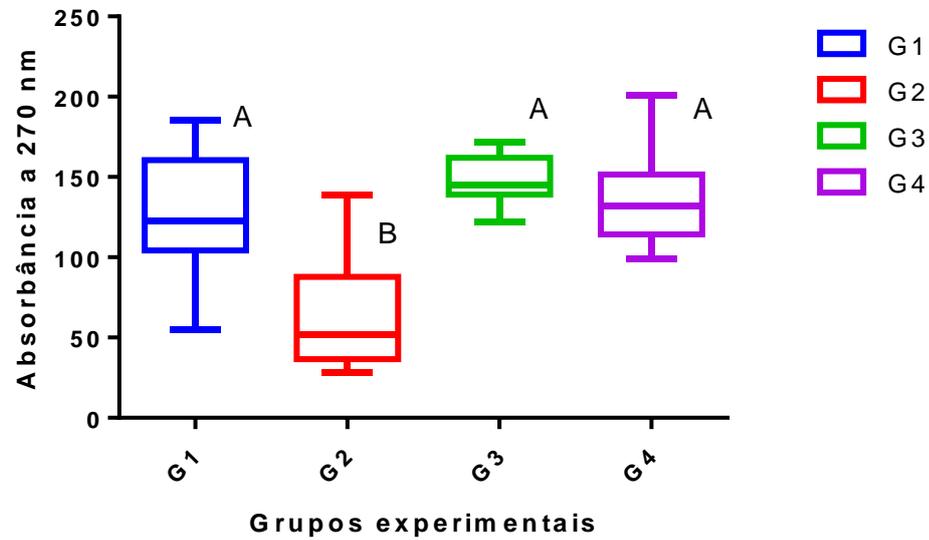


Figura 1 - Atividade da enzima PON1 nos grupos: G1 – Salina 0,9%, sem aplicação de carboplatina; G2 – Salina 0,9%; G3 – extrato aquoso de HRS 125mg.Kg; G4 - extrato aquoso de HRS 250mg.Kg. Barras representam o valor médio e letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ( $p < 0.05$ ).

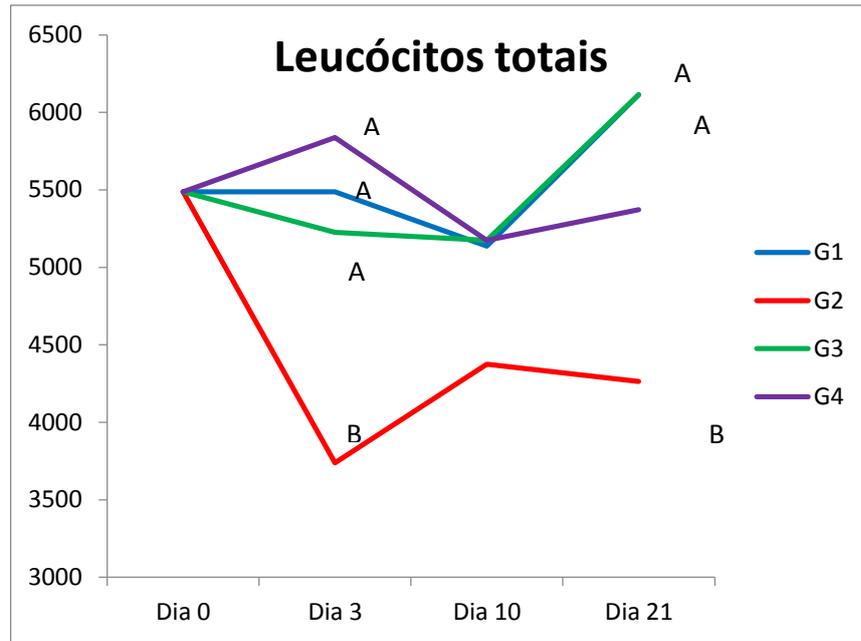


Figura 2 - Variação do número de leucócitos totais nos dias zero, três, dez e 21: G1 – Salina 0,9%, sem aplicação de carboplatina; G2 – Salina 0,9%; G3 – extrato aquoso de HRS 125mg.Kg; G4 - extrato aquoso de HRS 250mg.Kg. <sup>1</sup>Letras diferentes representam valores estatisticamente distintos ( $p < 0.05$ ).

Tabela 1 - Mielograma (médias) de ratas tratadas (G3 e G4) ou não (G1 e G2) com extrato aquoso de HRS 21 dias após protocolo quimioterápico com dose única de carboplatina intraperitoneal (G2, G3, G4).

	G1	G2	G3	G4
Série granulocítica				
N# Células	224.86	287.75	257.4	248.2
Promielócitos	1.29 <sup>b</sup>	2.85 <sup>a</sup>	1.28 <sup>b</sup>	1.24 <sup>b</sup>
Mielócitos	9.57 <sup>b</sup>	9.25 <sup>b</sup>	11.84 <sup>ab</sup>	11.2 <sup>a</sup>
MetaMielócitos	7.34	6.85	8.64	7.56
Bastonetes	10.29	9.9	11.12	10.56
Segmentados	14.77 <sup>b</sup>	26.6 <sup>a</sup>	16.8 <sup>b</sup>	13.52 <sup>b</sup>
Eosinofilos	1	1.25	0.68	0.84
Basofilos	0.14	0.2	0.12	0.08
Monocitos	0.37	0.6	0.36	0.28
Linfocitos	6.3	6.28	4.6	6.74
Plasmocitos	0.33	0.18	0.52	0.14
Megacariocitos*	5-10	2-10	2-10	2-12
Série eritróide				
N# Células	240.43 <sup>a</sup>	177 <sup>b</sup>	220 <sup>ab</sup>	216 <sup>ab</sup>
Rubriblastos	0.54 <sup>ab</sup>	0.75 <sup>b</sup>	0.48 <sup>ab</sup>	0.56 <sup>ab</sup>
ProRubricito	2.03	3.4	1.6	1.2
Rubricito	10.6	8.05	10.92	8.2
MetaRubricito	34.89	23.2	31	33.24
Razão série granulocítica / eritróide				
	0.98 <sup>b</sup>	1.73 <sup>a</sup>	1.23 <sup>ab</sup>	1.25 <sup>ab</sup>

Tratamentos: G1 – Salina 0,9%, sem aplicação de carboplatina; G2 – Salina 0,9% e aplicação de carboplatina; G3 – extrato aquoso de HRS 125mg.Kg<sup>-1</sup> e aplicação de carboplatina; G4 - extrato aquoso de HRS 250mg.Kg<sup>-1</sup> e aplicação de carboplatina. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes na linha (p<0.05).

Ausência de letras representam valores estatisticamente iguais na linha (p<0.05).

#### 4 Considerações Finais

Os resultados desse estudo determinaram as seguintes conclusões:

- A atividade da PON1 em pacientes oncológicos caninos é menor do que em cães hígidos, sendo essa atividade ainda menor durante a administração de fármacos antineoplásicos.
- O extrato aquoso de *Triticum aestivum* na concentração de 100 mg/kg e 400 mg/kg e o extrato aquoso de *Hibiscus rosa-sinensis* na concentração de 125 mg/kg e 250 mg/kg melhoram a leucopoesse de ratas submetidas a protocolo quimioterápico com carboplatina. Demonstrando seu efeito atenuante a mielossupressão causada pelo fármaco.
- A administração do extrato aquoso de *Triticum aestivum* na dose de 100 mg/kg e 400 mg/kg e o extrato aquoso de *Hibiscus rosa-sinensis* na concentração de 125 mg/kg e 250 mg/kg aumentaram a atividade da PON1 dos animais tratados. Desta maneira, fica nítido sua ação como reguladora do balanço oxidativo em modelo murino.
- Nenhuma das concentrações dos extratos promoveu alterações nos níveis séricos de creatinina, ureia, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina dos animais experimentais. Sendo assim pode-se concluir que as mesmas apresentam pouco ou nenhum potencial nocivo a esses órgãos.

Nesse estudo demos os primeiros passos na busca pela obtenção de novos recursos terapêuticos para paciente submetidos à terapia antineoplásica. É conhecida a crescente incidência de câncer na população humana e animal, sendo assim, novas maneiras de debelar esse conjunto de afecções devem exploradas. Em um país de proporções continentais e flora abundante como o Brasil, possuímos uma rica variedade de plantas com potencial terapêutico, sejam elas nativas ou adaptadas ao nosso clima. A aplicação clínica desses extratos ainda carece de mais estudos, especificamente em modelo experimental com câncer induzido, haja vista que a resposta desses extratos pode ser diferente nesses pacientes. Além disso, é pertinente avaliar a ação dos extratos frente às neoplasmas, tendo em vista que a literatura já demonstrou o potencial antitumoral de outros extratos vegetais. Desta

maneira chegaremos mais próximos da implementação de uma formulação contendo esses extratos e que os mesmos se tornem uma importante ferramenta terapêutica empregada como adjuvante a terapia antineoplásica em cães.

## Referências

AFSHARI, K.; SAMAVATI, V.; SHAHIDI, A. Ultrasonic-assisted extraction and in-vitro antioxidant activity of polysaccharide from *Hibiscus* leaf. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.74, p.558-567, 2015.

ALMEIDA, R. K.; VASCONCELOS, A. C.; CARNEIRO, R. A.; PAES, P. R. O.; MORO, L. Alterações citológicas do sangue periférico e da medula óssea de cães com cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.6, p.1255-1260, 2009.

ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin- induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.95, n.6, p.137-143, 1998.

BALCI, H.; GENÇ, H.; PAPILA, C.; CAN, G.; PAPILA, B.; YANARDAG, H.; UZUN, H. Serum Lipid Hydroperoxide Levels and Paraoxonase Activity in Patients With Lung, Breast, and Colorectal Cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, n.26, p.155–160, 2012.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BAUER, F. P., WESTHOFEN, M., KEHRL, W. The ototoxicity of the cytostatic drug carboplatin in patients with head-neck tumors. **Laryngorhinootologie**, v.71, p.412-415, 1992.

BAILEY, D.; ERB, H.; WILLIAMS, L.; RUSLANDER, D.; HAUCK, M. Carboplatin and doxorubicin combination chemotherapy for the treatment of appendicular osteosarcoma in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.17, p.199-205, 2003.

BIANCHI M, L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.44, n.12, p.123-130, 1999.

BILLER, B. Metronomic Chemotherapy in Veterinary Patients with Cancer. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v.44, n.5, p.817-829, 2014.

BOS, I. J. ras Oncogenes in Human Cancer: A Review. **Cancer Research**, n.49, p.4682-4689, 1989.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E.; ESTRELA-LIMA, A.; DE NARDI, A. B.; GHEVER, C.; SOBRAL, R. A.; AMORIM, R. L.; OLIVEIRA, L. O.; SUEIRO, F. A. R.; BESERRA, H. E. O.; BERTAGNOLLI, A. C.; GAMBA, C. O.; DAMASCENO, K. A.; CAMPOS, C. B.; ARAÚJO, M. R.; CAMPOS, L. C.; MONTEIRO, L. N.; NUNES, F. C.; HORTA, R. S.; REIS, D. C.; LUVIZOTTO, M. C. R.; MAGALHÃES, G. M.; RAPOSO, J. B.; FERREIRA, A. M. R.; TANAKA, N. M.; GRANDI, F.; UBUKATA, R.; BATSCHINSKI, K.; TERRA, E. M.; SALVADOR, R. C. L.; JARK, P. C.; DELECRODI, J. E. R.; NASCIMENTO, N. A.; SILVA, D. N.; SILVA, L. P.; FERREIRA, K. C. R. S.; FREHSE, M. S.; SANTIS, G. W.; SILVA, E. O.; GUIM, T. N.; KERR, B.; CINTRA, P. P.; SILVA, F. B. F.; LEITE, J. S.; MELLO, M. V. F.; FERREIRA, M. L. G.; FUKUMASU, H.; SALGADO, B. S.; NETO, R. T. Consensus for the Diagnoses, Prognosis and Treatment of Canine mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Jaboticabal, v.7, n.2, p.38-69, 2014.

CASTRO, R. D.; SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; BOELONI, J. N.; NUNES, P. P.; SILVA, G. R.; MELO, M. M.; PAES, P. R. O.; SERAKIDES, R. Mielograma de ratas com disfunção tireoidiana. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.63, n.5, p.1246-1250, 2011.

CONKLIN, K. A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative Cancer Therapies**, n.3, p.294–300, 2004.

DAS, P.; MANDAL, S.; GANGOPADHYAY, S.; DAS, K.; MITRA, A. G.; DASGUPTA, S.; MUKHOPADHYAY, S.; MUKHOPADYAY, A. Antioxidative and anticarcinogenic activities of methylpneophorbide a, isolated from wheat grass (*Triticum aestivum* Linn). **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, London, v.18, n.1-4, p.474-477, 2015.

DE NARDI, A. D.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasmas e modalidades de tratamentos em cães da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

DOBSON, J. M.; SAMUEL, S.; MILSTEIN, H.; ROGERS, K.; WOOD, J. L. Canine neoplasma in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. **The Journal of the Small Animal Practice**, v.46, n.6, p.240-246, 2002.

GILLEM, J.; GIUFFRIDA, M.; KRICK, E. Efficacy and toxicity of carboplatin and cytarabine chemotherapy for dogs with relapsed or refractory lymphoma (2000–2013). **Veterinary and Comparative Oncology**, 2015.

FANG, D. H.; FAN, C. H.; JI, Q.; QI, B. X.; LI, J.; WANG, L. Differential effects of paraoxonase 1 (PON1) polymorphisms on cancer risk: evidence from 25 published studies. **Molecular Biology Reproduction**, Holanda, v.39, n.6, p.6801–6809, 2012.

FELIX, Anelize de Oliveira Campello. **Avaliação de balanço oxidativo em cães com neoplasmas mamárias e teste do óleo resina de copaíba como terapia adjuvante em ratos**. 2014. 53 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. I.; DIKSHIT, R.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, D. F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, Germany, v.136, n.5, p. E359-E386, 2015.

FERREIRA, P. A.; CAPELLA, S. O.; THEODORO, S. S.; FELIX, S. R.; PERES, W.; NOBRE, M. O. Serum lipid profile of spayed and non-spayed female dogs. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.2, p.262-267, 2015.

GOUSSEV, S. A.; RANDOLPH, J. F.; KATHRANI, A.; MCDONOUGH, S. P. Clinical characteristics of hepatocellular carcinoma in 19 cats from a single institution (1980-2013). **Journal American Animal Hospital Association**, n.33, v.6, 2015.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, n.2, p.312-322, 2006.

HAHN-AST, C.; GLASMACHER, A.; MUCKTER, S.; SCHMITZ, A.; KRAEMER, A.; MARKLEIN, G.; BROSSART, P.; TOAL, V. L. Overall survival and fungal infection-related mortality in patients with invasive fungal infection and neutropenia after myelosuppressive chemotherapy in a tertiary care centre from 1995 to 2006. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.65, n.4, p.761-768, 2010.

HANIGAN, M. H.; DEVARAJAN, P. Cisplatin nephrotoxicity: Molecular mechanisms. **Cancer Therapy**, v.1, p.47-61, 2003.

HUSAIN, K.; WHITWORTH, C.; SOMANI, S. M.; RYBAK, L. P. Carboplatin-induced oxidative stress in rat cochlea. **Hearing research**, v.159, n(1-2), p.14-22, 2001.

INCA INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. Disponível em:  
<<http://www2.inca.gov.br>. Acesso em: Jan. 11, 2016.

KASTURE, V. S.; CHOPDE, C. T.; DESHMUKH, V. K. Anticonvulsive activity of Albizzia lebeck, Hibiscus rosa sinensis and Butea monosperma in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, n.71, p.65–75, 2000.

KHAN, N.; GANESHPURKAR, A.; DUBEY, N.; BANSAL, D. Immunoprophylactic potential of wheat grass extract on benzene induced leukemia: An *in vivo* study on murine model. **Indian Journal of Pharmacology**, India, v.47, n.4, p.394-397, 2015.

KLAUNING, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v.38, p.96-109, 2010.

KNAPP, D. W.; HENRY, C. J.; WIDMER, W. R.; TAN, K. M.; MOORE, G. E.; RAMOS-VARA, J. A.; LUCROY, M. D.; GREENBER, C. B.; GREENE, S. N.; ABOO, A. H.; HANSON, P. D.; ALVA, R.; BONNEY, P. L. Randomized trial of cisplatin versus firocoxib versus cisplatin/firocoxib in dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, n.1, p.126-133, 2013.

KUMAR, V.; MADHI, F.; KHANNA, A. K.; SINGH, R.; CHANDER, R.; SAXENA, J. K.; MAHDI, A. A.; SINGH, R. K. Antidyslipidemic and Antioxidant Activities of Hibiscus rosa sinensis Root Extract in Alloxan Induced Diabetic Rats. **Indian Journal Clinical Biochemistry**, v.28, n.1, p.46–50, 2013.

LANE, A. E.; BLACK, M. L.; WYATT, K. M. Toxicity and efficacy of a novel doxorubicin and carboplatin chemotherapy protocol for the treatment of canine appendicular osteosarcoma following limb amputation. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v.90, n.3, p.69-74, 2012.

JI, J.; ZUO, P.; WANG, Y.L. Enhanced Antiproliferative Effect of Carboplatin in Cervical Cancer Cells Utilizing Folate-Grafted Polymeric Nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, Shanxi, v.10, p.453-464, 2015.

MARCONATO, L.; ROMANELLI, G.; STEFANELLO, D.; GIACOBONI, C.; BONFANTI, U.; BETTINI, G.; FINOTELLO, R.; VERGANTI, S.; VALENTI, P.; CIARAMELLA, L.; ZINI, E. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003-2008). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.235, n.8, p.967-972, 2009.

MASUOKA, N.; MATSUDA, M.; KUBO, I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. **Food Chemistry**, Barking, v.131, n.2, p.541-545, 2012.

MCKEE, M. D.; BONDARENKO, I.; GUCLU, S. K.; GORBUNOVA, V.; URBAN, L.; CLINGAN, P.; KMAK, K. L.; MAZIERES, J.; RAMALINGAM, S. S.; PEDERSEN, M.; DELUCA, A.; NICKNER, C.; QIN, Q.; GIRANDA, V. L. Veliparib (ABT-888) or placebo combined with carboplatin and paclitaxel in patients with previously untreated advanced/metastatic squamous (Sq) non-small cell lung cancer (NSCLC): A randomized phase 3 trial. **Journal of Clinical Oncology**, v.33, n.15, 2015.

MICHELL, A. R. Longevity of British Breeds of dog and its relationships with-sex, size, cardiovascular variables and disease. **Veterinary Record**, v.145, n.22, p.625-629, 1999.

MOHAN, Y.; JESUTHANKARAJ, G. N.; THANGAYELU, N. R. Antidiabetic and Antioxidant Properties of *Triticum aestivum* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Advances in Pharmacological Sciences**, Cairo, Article ID716073, 2013.

MONAGHAN, P., METCALFE, N. B., TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecology Letter**, v.12, n.3, p.75–92, 2009.

MUJORIYA, R.; BODLA, R. B. A study on wheat grass and its Nutritional value. **Food Science and Quality Management**, Gaziabad, India, v.2, 2011.

NISHIKAWA, M.; NAGATOMI, H.; CHANG, B. J.; SATO, E.; INOUE, M. Targeting superoxide dismutase to renal proximal tubule cells inhibits mitochondrial injury and renal dysfunction induced by cisplatin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.387, n.1, p.78-84, 2001.

OZKOL, H. U.; KOYUNCU, I.; TULUCE, Y.; DILSIZ, N.; OZKOL, H. Anthocyanin-rich extract from *Hibiscus sabdariffa calyx* counteracts UVC-caused impairments in rats. **Pharmaceutical biology**, v.53, n.10, p.1435-1441, 2015.

PANIS, C.; VICTORINO, V. J.; HERRERA, A. C. S. A.; FREITAS, L. F.; DE ROSSI, T.; CAMPOS, F. C.; COLADO SIMÃO, A.N.; BARBOSA, D. S.; PINGE-FILHO, P.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A. L. B. Differential oxidative status and immune characterization at the early and advanced stages of human breast cancer. **Breast Cancer Research Treatment**, v.133, n.3, p.881-888, 2012.

PEKAMWAR, S. S.; KALYANKAR, T. M.; JADHAV, A. C. *Hibiscus rosa-sinensis*: a review on ornamental plant. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.6, p.4719–4727, 2013.

ROHENKOHL, C. C; CARNIEL, A. P; COLPO, E. Consumo de antioxidantes durante tratamento quimioterápico. **ABCD, Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v.24, n.2, 2011.

SACHDEWA, A; KHEMANI, L. D. Effect of *Hibiscus rosa sinensis* Linn. ethanol flower extract on blood glucose and lipid profile in streptozotocin induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, n.89, p.61–66, 2003.

PUI, C.; EVAMS, W. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, v.354, n.2, p.166-178, 2006.

SANKARAN, M.; VADIVEL, A. Antioxidant and Antidiabetic Effect of *Hibiscus rosasinensis* Flower Extract on Streptozotocin Induced Experimental Rats-a Dose Response Study. **Notulae Scientia Biologicae**, v.3, n.4, p.13-21, 2011.

SANTOS, D. E.; SILVA, D. T.; TOLEDO-PINTO, E. A.; LOT, R. F. E. Tumor venéreo transmissível (TVT): Revisão de literatura. **Revista científica eletrônica de medicina veterinária**, v.6, n.10, 2008.

SANTOS, H. S.; SOUZA CRUZ, W. M. A Terapia Nutricional com Vitaminas Antioxidantes e o Tratamento Quimioterápico Oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.47, n.3, p. 303-308, 2001.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.227-236, 2004.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.20, p.7749-7759, 2005.

SINGH, J.; SETHI, J.; YADAV, M.; SOOD, S.; GUPTA, V. Effect of *Triticum aestivum* juice on wound healing in rats. **International Journal of Natural Product Science**, v.1, p.15-20, 2011.

SPARKES, A.; MURPHY, S.; MCCONNELL, F. Palliative intracavitary carboplatin therapy in a cat with suspected pleural mesothelioma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, n.7, n.5, p.313-316, 2005.

TAMZALI, Y.; BORDE, L.; ROLS, M. P.; GOLZIO, M.; LYAZRHI, F.; TEISSIE, J. Successful treatment of equine sarcoids with cisplatin electrochemotherapy: A retrospective study of 48 cases. **Equine Veterinary Journal**, v.44, n.2, p.214-220, 2011.

TILLMANN, M. T.; FELIX, A. O. C.; MUELLER, E. N.; FELIX, S. R.; ALVES, G. H.; RAMOS, T.; FREITAG, R. A.; GEVEHR-FERNANDES, C.; NOBRE, M. O. Use of *Triticum aestivum* in open wound healing: a clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.6, p.1757-1767, 2014.

OTIS, V.; SARRET, P.; GENDRON, L. Spinal activation of  $\delta$  opioid receptors alleviates cancer-related bone pain. **Neuroscience**, n.183, p.221-229, 2011.

VALLI, V. E.; KASS, P. H.; MYINT F. M.; SCOTT, F. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival. **Veterinary Pathology**, v.50, n.5, p.738-748, 2013.

VASUDEVA, N.; SHARMA, S. K. Post-Coital Antifertility Activity of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn. Roots. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.1, p.91-94, 2008.

WANG, P.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature reviews Drug Discovery**, London, v.4, n.4, p.307-320, 2005.

WEBSTER, J. D.; YUZBASIYAN-GURKAN, V.; KANEENE, J. B.; MILLER, R.; RESAU, J. H.; KIUPEL, M. The role of c-kit in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. **Neoplasma**, v.8, n.2, p.104-111, 2006.

WEISSE, C.; SOARES, N.; BEAL M. W.; STEFFEY, M. A.; DROBATZ, K. J.; HENRY, C. J. Survival times in dogs with right atrial hemangiosarcoma treated by means of surgical resection with or without adjuvant chemotherapy: 23 cases (1986-

2000). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.226, n.4, p.575-579, 2005.

WHEATE, N. J.; WALKER, S.; CRAIG, G. E.; OUN, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. Dalton Transactions. **Journal for Inorganic, Organometallic and Bioinorganic Chemistry**, v.39, n.35, p.8113-8127, 2010.

WITHROW, S. J. Why Worry About Cancer in Pets? In: VAIL, D. M.; WITHROW, S. J. **Withrow and Macewen's small animal clinical oncology**, 4<sup>a</sup> ed., p.15-17, 2007.

WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v.105, n.3, p.940-949, 2007.

WONG, P; K; YUSOF, S.; GHAZALI, H. M.; CHEN MAN, Y.B. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Butrion and Food Science**, v.32, p.68-73, 2002.

WOUDA, R. M.; BORREGO, J.; KEULER, N. S.; STEIN, T. Evaluation of adjuvante carboplatin chemotherapy in the management of surgically excised anal sac apocrine gland adenocarcinoma in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.14, n.1, p.67-80, 2013.

WUKETICH, S.; HIENZ, S. A.; MAROSI, C. Prevalence of clinically relevant oral mucositis in outpatients receiving myelosuppressive chemotherapy for solid tumors. **Supportive Care in Cancer**, v.20, n.1, p.175-183, 2011.

## **Anexos**



Pelotas, 17 de dezembro de 2014

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

*Faculdade de Veterinária*

Senhora Doutora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: **“Efeito de extratos vegetais como adjuvantes na terapia antineoplásica”**, processo nº23110.010447/2014-59, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 10447-2014).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEA*

Ciente em: 17/12/2014

Assinatura da Responsável: