



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LORIANE RODRIGUES DE LIMA COSTA GODINHO

**EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO ASSOCIADO OU NÃO
À SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA NA
HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA
EM CAMUNDONGOS**

Londrina
2022

LORIANE RODRIGUES DE LIMA COSTA GODINHO

**EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO ASSOCIADO OU NÃO
À SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA NA
HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Deminice

Londrina
2022

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca
Central da Universidade Estadual de Londrina**

Godinho, Loriane Rodrigues de Lima Costa .

Efeitos do exercício resistido associado ou não à suplementação de creatina na hepatotoxicidade induzida pela doxorubicina em camundongos / Loriane Rodrigues de Lima Costa Godinho. - Londrina, 2022.
49 f. : il.

Orientador: Rafael Deminice.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Quimioterapia - Tese. 2. Exercício resistido - Tese. 3. Creatina - Tese. 4. Toxicidade Hepática - Tese. I. Deminice, Rafael. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDU 612.39

LORIANE RODRIGUES DE LIMA COSTA GODINHO

**EFEITOS DO EXERCÍCIO RESISTIDO ASSOCIADO OU NÃO
À SUPLEMENTAÇÃO DE CREATINA NA
HEPATOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Rafael Deminice
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a Dr^a Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr Alceu Afonso Jordão Junior
Universidade de São Paulo - USP

Londrina, 1º de abril de 2022.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que me deu o grande privilégio de viver.

Ao meu esposo Leandro e minhas filhas Isabela e Mariana que foram meu suporte em todo o processo, obrigada por estarem sempre ao meu lado, sempre com orgulho e dedicação.

Aos meus pais, Genacil e Valdete, que sempre me apoiaram em meus estudos. Vocês são os grandes responsáveis por mais um objetivo alcançado na minha vida.

À minha rede de apoio, especialmente meu esposo, minha sogra Rociney e minha Mãe, que zelaram pelas minhas filhas para que pudesse estar presente de corpo e mente nas aulas, coleta de dados e escrita do trabalho. Aos meus irmãos Lílian e Leonardo que sempre me incentivaram e estiveram ao meu lado nas minhas escolhas. À minha terapeuta Priscila que me auxiliou com as diversidades encontradas durante o caminho.

Ao Professor Rafael Deminice, meu orientador, um exemplo de profissional. Ensinou-me com dedicação e sabedoria os passos da pesquisa, desde a parte prática à escrita, sempre paciente e otimista que tudo daria certo ao final. Aos parceiros do laboratório, Paola, Jonathan, Tatiane e Guilherme, pela ajuda e disposição nos experimentos e especialmente por me ensinarem cada passo da pesquisa experimental.

Aos professores que contribuíram para minha formação, especialmente ao Prof^o Dr Alceu e Prof^a Dr^a Rúbia que brilhantemente colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a tornar esse projeto uma realidade.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota d’água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)

GODINHO, Loriane Rodrigues de Lima Costa. **Efeitos do exercício resistido associado ou não à suplementação de creatina na hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina em camundongos**. 2022. 48 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A Doxorrubicina (DOX) é uma droga amplamente utilizada para o tratamento quimioterápico devido a sua potente ação antineoplásica. No entanto, seu efeito hepatotóxico é amplamente descrito na literatura. Contudo, a busca por intervenções que minimizem esses efeitos ainda é escassa. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do exercício resistido (ER), isoladamente e/ou associado à suplementação de creatina (Cr), na hepatotoxicidade induzida pela DOX em camundongos. Um total de 38 camundongos Swiss foram alocados aleatoriamente em um dos seguintes grupos: Controle / C (n = 7), Exercitado / Ex (n = 7), Doxorrubicina / Dox (n = 8), Doxorrubicina e exercitado / DoxEx (n = 8) e doxorrubicina, exercitado e suplementado com creatina / DoxExCr (n = 8). A DOX foi administrada (i.p.) com uma dose total de 12 mg/kg fracionada semanalmente. A suplementação de Cr foi realizada na dieta (2%) durante todo o período experimental. Foram realizadas sessões semanais de ER em escada, sendo duas sessões com 8 escaladas a 60% de 1RM e uma sessão de carga progressiva máxima até a falha voluntária (1RM), totalizando 16 sessões de exercício, os animais foram eutanasiados após 5 semanas. O tratamento com DOX causou hepatotoxicidade evidenciada por aumento de marcadores inflamatórios (TNF- α e IL-6), marcador de função hepática (AST), marcadores de estresse oxidativo (MDA e AOPP) enquanto o marcador de defesa antioxidante (GSH:GSSG) foi reduzido. Além disso, os animais tratados com DOX apresentaram fibrose hepática e alterações histopatológicas caracterizadas por degeneração celular, infiltrado de células inflamatórias intersticiais, zonas necróticas, alteração da organização tecidual, em comparação com o grupo controle. O ER protegeu parcialmente o fígado da hepatotoxicidade induzida pela DOX, e quando associado com Cr, foram capazes de atenuar os danos ao fígado. Nossos dados sugerem que a associação de ER e Cr protegeu contra hepatotoxicidade induzida por DOX ao atenuar inflamação, alterações histopatológicas, manutenção da função hepática, redução de marcadores de estresse oxidativo e fibrose hepática.

Palavras-chave: quimioterapia; toxicidade hepática; treinamento de força; suplemento alimentar; câncer.

GODINHO, Loriane Rodrigues de Lima Costa. **Effects of resistance exercise with or without creatine supplementation on doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice**. 2022. 48 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is a drug widely used for chemotherapy treatment due to its potent antineoplastic action. However, its hepatotoxic effect is widely described in the literature. However, the search for interventions that minimize these effects is still scarce. The aim of this study was to investigate the effects of resistance exercise (RE), alone and/or associated with creatine (Cr) supplementation, on DOX-induced hepatotoxicity in mice. A total of 38 Swiss mice were randomly allocated to one of the following groups: Control / C (n = 7), Exercised / Ex (n = 7), Doxorubicin / Dox (n = 8), Doxorubicin and exercised / DoxEx (n = 8) and doxorubicin, exercised and supplemented with creatine/DoxExCr (n = 8). DOX was administered (i.p.) with a total dose of 12 mg/kg divided weekly. Creatine supplementation was performed in the diet (2%) throughout the experimental period. Weekly sessions of RE on stairs were performed, with two sessions with 8 climbs at 60% of 1RM and a session of maximum progressive load until voluntary failure (1RM), totaling 16 exercise sessions, the animals were euthanized after 5 weeks. Treatment with DOX caused hepatotoxicity evidenced by increased inflammatory markers (TNF- α and IL-6), liver function marker (AST), oxidative stress markers (MDA and AOPP) while the antioxidant defense marker (GSH:GSSG) has been reduced. Furthermore, DOX-treated animals presented hepatic fibrosis and histopathological alterations characterized by cellular degeneration, infiltrate of interstitial inflammatory cells, necrotic zones, alteration of tissue organization, in comparison with the control group. ER partially protected the liver from DOX-induced hepatotoxicity, and when associated with Cr, they were able to attenuate liver damage. Our data suggest that the association of ER and Cr protected against DOX-induced hepatotoxicity by attenuating inflammation, histopathological changes, maintenance of liver function, reduction of oxidative stress markers and liver fibrosis.

Key words: chemotherapy; liver toxicity; strength training; food supplement; cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos de ação da DOX	15
Figura 2 – Biossíntese da Cr	17
Figura 3 – Delineamento Experimental	23
Figura 4 – Análise plasmática das transaminases hepáticas e biomarcadores inflamatórios hepáticos.....	32
Figura 5 – Avaliação do estresse oxidativo e marcadores de defesa antioxidante.....	33
Figura 6 – Avaliação histopatológica – coloração Picrosirius Red.....	34
Figura 7 – Avaliação histopatológica – coloração Hematoxilina e Eosina.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ganho de peso corporal, índice hepatossomático, ingestão alimentar e suplementação de creatina em camundongos.....	31
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Concentração de Cr nas principais fontes alimentares	17
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGAT	Arginina-glicina amidinotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AOPP	Produtos de proteína de oxidação avançada
AST	Aspartato aminotransferase
C	Controle
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética em experimentação animal
Ck	Creatina quinase
Cr	Creatina
Cyp	Citocromo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
DoxEx	Doxorrubicina exercitados
DoxExCr	Doxorrubicina exercitados e suplementados com creatina
EF	Exercício físico
ER	Exercício resistido
Ex	Exercitados
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
ERON's	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
FDA	Food and drug administration
Fe+2	Compostos ferrosos
Fe+3	Íon férrico
G	Gramas
GAA	Guanidinoacetato
GAMT	Guanidinoacetato metiltransferase
GLOBOCAN	Global cancer observatory
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
H&E	Hematoxilina e Eosina

H2O2	Peróxido de hidrogênio
Hcy	Homocisteína
HSP70	Proteína de choque térmico
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto nacional do câncer
i.p.	Intraperitoneal
kg	Quilograma
LDH	Desidrogenase hepática
MDA	Malondialdeído
Mg	Miligrama
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio
O2	Oxigênio
O2 –	Radicais superóxidos
OH-	Íons hidroxila
ONOO-	Peroxonitrito
PBS	Tampão fosfato salino
Pcr	Fosfocreatina
Ref	Referência
SAM	S-adenosilmetionina
SOD	Superóxido dismutase
SPSS	Statistical package for the social sciences
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOP2A	Topoisomerase ii
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
UEL	Universidade Estadual de Londrina
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	DOXORRUBICINA: AÇÃO E TOXICIDADE	14
1.2	EFEITOS ANTIOXIDANTES DA CR E SEU POSSÍVEL PAPEL HEPATOPROTETOR.....	16
1.3	EXERCÍCIO E SEU PAPEL NO METABOLISMO HEPÁTICO DURANTE O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO	18
2	OBJETIVO	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
3.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	21
3.3	PROTOCOLO DE ER.....	22
3.4	EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS.....	23
3.5	HISTOLOGIA	23
3.6	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	24
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	ARTIGO CIENTÍFICO	26
	ANEXOS	47
	ANEXO A – Comissão de ética no uso de animais	48

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de morte em todo o mundo, uma doença com prevalência crescente. De acordo com o *Global Cancer Observatory* (Globocan) (1) estima-se que 28,4 milhões de novos casos de câncer (incluindo câncer de pele não melanoma, exceto carcinoma basocelular) ocorrerão em 2040, aumento de 47% quando comparado com 2020. No Brasil não é diferente, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2) para cada ano do triênio 2020-2022 é de 625 mil novos casos.

As antraciclinas como a doxorrubicina (DOX), são amplamente utilizadas durante o tratamento do câncer devido ao seu potente efeito antineoplásico, utilizada contra tumores sólidos, linfomas e leucemias (3). Embora bastante eficaz, esta droga apresenta alta toxicidade em diversos tecidos saudáveis, conforme demonstrado em vários estudos em que a DOX apresenta potencial efeito catabólico (4) cardiotoxicidade (5) aumento do estresse oxidativo (6) e inflamação (7). Como consequência, tais efeitos adversos podem trazer prejuízos clínicos persistentes, como cardiopatias, hepatotoxicidade, disfunção muscular e outros que podem limitar seu uso clínico, visto que pode gerar complicações de difícil controle podendo conduzir ao óbito do indivíduo.

Entre os principais efeitos adversos causados pelo uso da DOX está a toxicidade hepática, decorrente do estresse oxidativo que é caracterizado pela produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (8)(9), redução do sistema de defesa antioxidante, aumento da peroxidação lipídica (10) e presença de processos inflamatórios com liberação excessiva de citocinas pró e anti-inflamatórias (11). Esse desequilíbrio entre as citocinas pode induzir a apoptose e necrose celular (12) o que pode ocasionar em lesão hepatocelular irreversível, e conseqüentemente interferir no tratamento antineoplásico, além aumentar o risco de mortalidade.

Considerando os aspectos discutidos acima, nos últimos anos a creatina (Cr) tem sido estudada por suas propriedades antioxidantes, demonstradas em diferentes situações, tais como: distrofia muscular, doenças artríticas, lesão medular, doença pulmonar obstrutiva crônica, esclerose lateral amiotrófica, lesão aguda, imobilização, insuficiência cardíaca, citopatias mitocondriais, doença de *Charcot-Marie-Tooth* (13). De fato, estudos têm demonstrado que a suplementação de Cr protege contra hepatotoxicidade induzida por dieta rica em lipídios (14) câncer (15) doença hepática gordurosa (16) entre outras. Da mesma forma, a prática regular de exercícios físicos está associada à saúde e diminuição da mortalidade geral. Recentemente, posições e consensos de entidades científicas e médicas (17)(18) têm sugerido que o exercício físico, incluindo o exercício de força, deve ser utilizado como parte do tratamento oncológico, inclusive durante o tratamento adjuvante e/ou

neoadjuvante. Entretanto, os efeitos e consequências da prática de exercício durante o tratamento quimioterápico, bem como seu possível papel hepatoprotetor são desconhecidos.

Assim, com a falta de tratamentos ou procedimentos eficazes para amenizar ou diminuir a toxicidade hepática induzida pelo tratamento com DOX, a suplementação com Cr e o exercício físico surgem como alternativas baratas e de fácil aplicação. Isto é relevante dado que a proteção contra a toxicidade hepática pode aumentar a tolerância e a eficácia do tratamento quimioterápico, aumentando a taxa de sucesso e a qualidade de vida da pessoa com câncer.

1.1 DOXORRUBICINA: AÇÃO E TOXICIDADE

A DOX foi descoberta a mais de 50 anos, pertencente a classe das antraciclinas com ação citotóxica isolada a partir de colônias de bactérias *Streptomyces peucetius* (19)(20) desde então vem sendo amplamente utilizada e alvo de novas estratégias de produção (21). Estudos clínicos sugerem que este é um dos antineoplásicos mais potentes, apresenta amplo espectro de ação tanto para tumores sólidos e tumores hematopoiéticos (3). Em 1974, a DOX foi aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização em monoterapia ou combinado com outras drogas para o tratamento de câncer cerebral, mama, estômago, ovário, tireoide, bexiga, rim, leucemia, linfoma e sarcoma (22). A quimioterapia com agentes antineoplásicos desempenha papel essencial no tratamento e aumento da sobrevida de pacientes submetidos a essa modalidade de tratamento.

Os dois principais mecanismos (Figura 1) envolvidos na atividade antineoplásica da DOX estão relacionados com a intercalação em Ácido Desoxirribonucleico (DNA), que leva à inibição da síntese de DNA, e interrupção do reparo de DNA mediado por topoisomerase II (TOP2A) (23) que gera níveis aumentados de apoptose das células neoplásicas (24)(25). Outro mecanismo envolvido é a produção de radicais livres com a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e formação de ERO's (26). A terapia antineoplásica limita-se pelas evidências de toxicidade relacionada a doses cumulativas, o uso clínico da DOX têm demonstrado amplamente sobre a toxicidade cardíaca, hepática, pulmonar e renal (27)(28)(29).

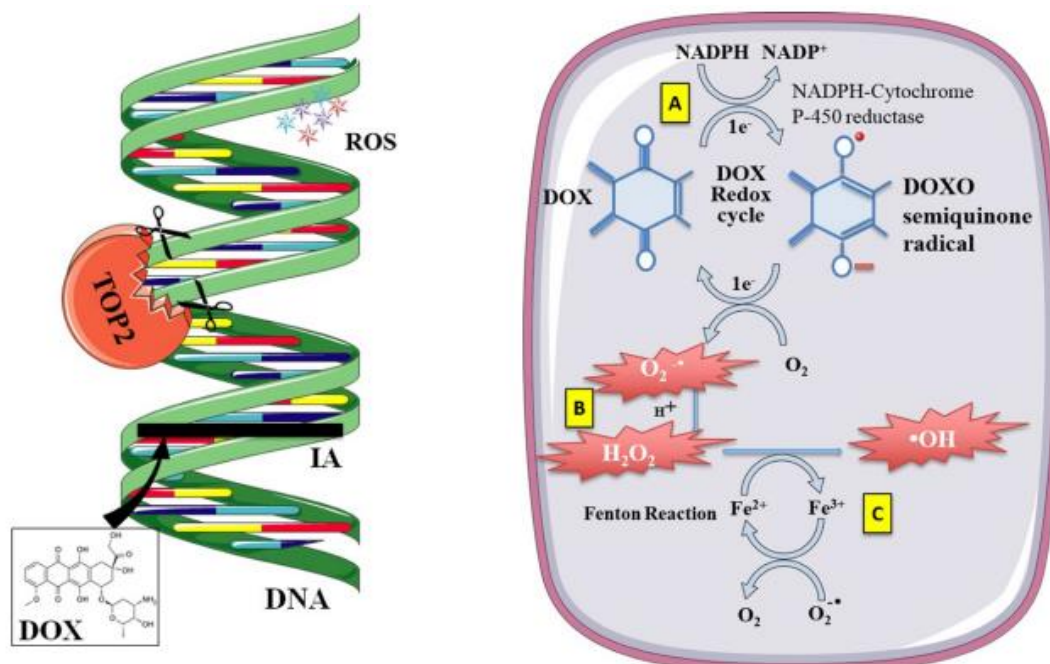


Fig. 1 – Mecanismos de ação da DOX (30)

Embora os mecanismos sobre o desenvolvimento da hepatotoxicidade induzida pela DOX ainda não são bem elucidados, sugere-se que os mecanismos de produção de ERO's e aumento do estresse oxidativo são os principais responsáveis pela patogênese de danos hepáticos (31). Condição que predispõe ao desequilíbrio do sistema Redox devido níveis reduzidos de enzimas antioxidantes, apoptose, inflamação e disfunção mitocondrial.

Estudos em animais apontam sobre as principais alterações histológicas decorrentes do tratamento com DOX a presença de congestão da veia central, hiperplasia de ducto biliar, dilatação dos espaços sinusoidais (32) fibrose hepática decorrente de lesões granulomatosas celulares (33), além de alterações teciduais indicativas de dano hepático evidenciado por aumento na atividade de fosfatase alcalina (ALP), desidrogenase hepática (LDH), aumento da atividade das aminotransferases hepáticas (ALT - alanina aminotransferase) e (AST – aspartato aminotransferase) (34).

Durante o tratamento quimioterápico, a peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo gera diversos produtos que podem atacar muitos alvos celulares. O tratamento com DOX promove a produção de radicais superóxidos (O_2^-) e peróxidos durante seu metabolismo no fígado, isso se deve a reação não enzimática, há doação de um elétron ao íon férrico (Fe^{+3}) resultando em compostos ferrosos (Fe^{+2}), originando o complexo de DOX que posteriormente sofre redução com oxigênio (O_2) produzindo ERO's, especialmente H_2O_2 , que promovem peroxidação lipídica, danos ao DNA e a membrana celular, além de apoptose de células tumorais e normais (35)(26)(36).

Outro mecanismo pelo qual esta droga gera toxicidade, é através da reação enzimática via citocromo (Cyp) p450, através da Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato hidrogênio (NADPH) redutase que reduz a DOX e dá origem ao radical semiquinona que leva à produção de ERO's (37).

De fato, estudos clínicos com modelo animal com câncer de mama, tratados com DOX (2 mg / kg, intraperitoneal - i.p, três vezes por semana) durante 2 semanas demonstraram que os radicais livres produzidos pelo agente quimioterápico aumentam os níveis de peroxidação lipídica evidenciados pelos níveis de Malondialdeído (MDA), o qual também é utilizado como biomarcador de estresse oxidativo (38). Resultado semelhante foi encontrado em estudo com ratos que receberam dose aguda com aplicação única da DOX (15 mg/kg) que além do aumento de MDA, o grupo tratado apresentou mortalidade de 40% (39).

Além disso, em outro estudo com ratos que receberam dose única de DOX (15 mg/kg) o tratamento reduziu o nível de antioxidantes, como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), e glutathiona (GSH) (40) esse efeito está relacionado à produção exacerbada de ERO's, inibindo assim o mecanismo de defesa (41).

1.2 EFEITOS ANTIOXIDANTES DA CR E SEU POSSÍVEL PAPEL HEPATOPROTETOR

A Cr trata-se de um composto nitrogenado endógeno, denominada ácido acético metilguanidina, isolada pela primeira vez pelo cientista Michel Eugene Chevreul em 1832 a partir do extrato de carne. (42). Desde então destaca-se na área desportiva, principalmente por seus efeitos no desempenho físico de atletas. Contudo novos estudos vêm investigando sua atividade na melhora na recuperação muscular, aumento de massa muscular e melhora na função física na população não atleta (43)(44)(45).

A Cr é encontrada nas formas livres ou fosforilada e pode ser adquirida através da ingestão alimentar (aproximadamente 1g, que corresponde à metade da necessidade diária), enquanto o restante é obtido através da síntese pelo organismo (42) a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina. Sua produção endógena (Figura 2) inicia nos rins (46) através da L-arginina que é catalisada pela enzima arginina-glicina amidinotransferase (AGAT) que transfere um grupo amidino de L-arginina para glicina, resultando na formação de L-ornitina e guanidinoacetato (GAA), posteriormente o GAA é transportado para o fígado através da corrente sanguínea, o qual será catalisado pela enzima guanidinoacetato metiltransferase (GAMT) que leva a transferência irreversível de um grupo metila da metionina através da S-adenosilmetionina (SAM) para GAA, resultando na formação de Cr. A conversão de Cr em Fosfocreatina (PCr) ocorre através da creatina quinase (CK), esse mecanismo desempenha papel fundamental no fornecimento de energia celular e transporte de energia intracelular (47). Tanto Cr quanto PCr são metabolizados naturalmente

em creatinina por meio de uma reação espontânea não enzimática, a creatinina se difunde livremente na circulação para ser transportada para os rins e ser totalmente excretada na urina (48).

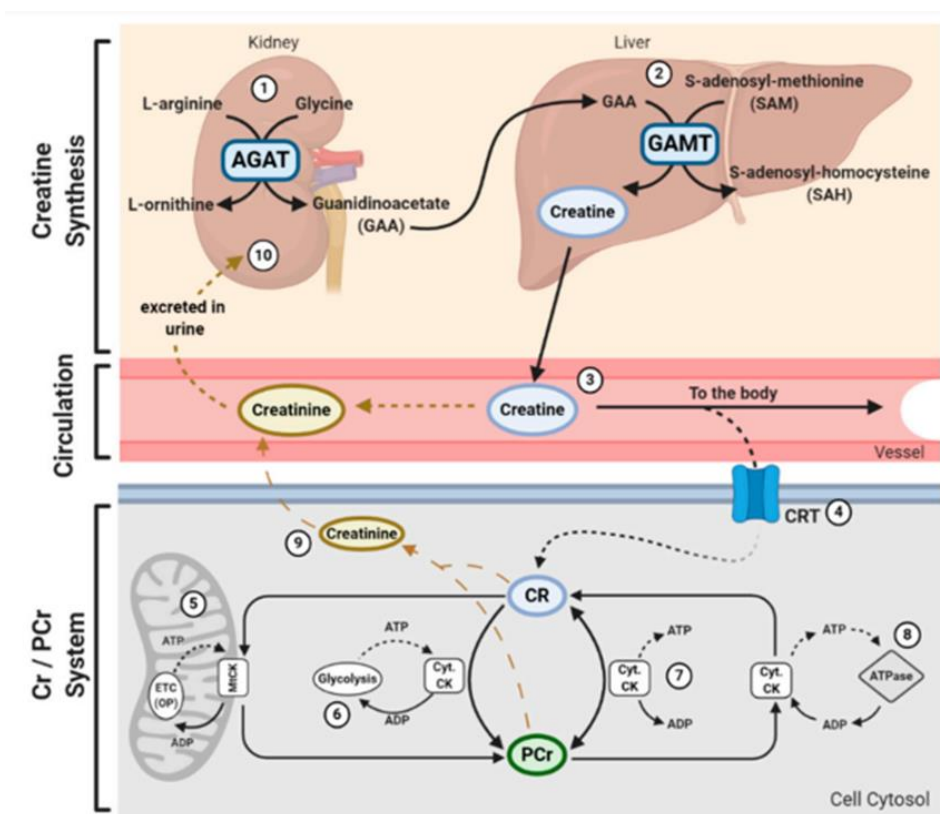


Fig. 2 - Biossíntese da Cr - (48)

Na alimentação a Cr é encontrada especialmente em produtos de origem animal, tais como carnes bovinas e peixes, além de suplementos nutricionais, o Quadro 1 descreve sua concentração nas principais fontes alimentares.

Quadro 1 - Concentração de Cr nas principais fontes alimentares

Alimento	Concentração de Cr (g/kg)
Arenque	6,5 - 10,0
Carne suína	5,0
Carne Bovina	4,5
Salmão	4,5
Atum	4,0
Bacalhau	4,0

Fonte: (49)

A primeira evidência da ação protetiva da Cr contra compostos que desencadeiam lesão oxidativa (malonato, ácido nitropropiónico e marcadores bioquímicos que geram radicais hidroxila) foi levantada por Matthews e colaboradores (50) onde observaram que os compostos eram capazes de levar a neurotoxicidade em ratos (modelo animal da doença de Huntington que leva a comprometimento energético) e a ação da Cr como potencial ação antioxidante. Em seguida Lawler e colaboradores (51) demonstraram a ação da Cr como um antioxidante direto contra ERO's. Posteriormente diversas pesquisas dedicam-se a elucidar sua ação antioxidante associada a prática de exercício físico (52) (53) assim como no tratamento de diversas patologias (54) (55) (56).

Embora o mecanismo de ação antioxidante da Cr não esteja totalmente elucidado, algumas pesquisas demonstraram que sua ingestão aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e a capacidade de eliminar ERO's e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON's) (50) (57), visto que 90% da Cr total do corpo é armazenada no músculo esquelético e as mitocôndrias são fonte importantes de ERO's (H_2O_2 - $O_2^{\cdot -}$ - $OH^{\cdot -}$ - $ONOO^{\cdot -}$) (58). Acredita-se que a Cr atua controlando as concentrações de cálcio intracelular, regulando as concentrações extracelulares de glutamato e impedindo a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (59). Além disso, Deminice e colaboradores (46) baseados na hipótese de que a hiperhomocisteinemia esteja diretamente ligada com a formação de ERO's pela auto oxidação da homocisteína (Hcy) e/ou cisteína que pode levar a danos celulares, discutiram sobre os aspectos da suplementação com Cr relacionados aos níveis de Hcy e o estresse oxidativo. Apesar da sua ação antioxidante, ainda são limitados os estudos que investigam sua utilização associada a DOX, entretanto estudo recente demonstrou que sua suplementação em concentração de 4% (por uma semana) seguida da suplementação de 2% (por 3 semanas) foi capaz de reduzir hepatotoxicidade induzida pelo agente quimioterápico (dose única de 15mg/kg), evidenciado pela redução da inflamação e fibrose hepática, além da diminuição do tamanho do fígado em proporção ao peso corporal dos animais (60).

1.3 EXERCÍCIO E SEU PAPEL NO METABOLISMO HEPÁTICO DURANTE O TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

O exercício físico (EF) vem sendo reconhecido como uma estratégia terapêutica associada a vários benefícios antes, durante e após o tratamento do câncer (61) (61)(62). O exercício resistido (ER) vem despertando interesse em muitos pesquisadores, a primeira evidência em 1979 já mostrou seus efeitos terapêuticos neutralizando a toxicidade da DOX (62). Ainda assim, seu impacto sobre a prevenção da hepatotoxicidade induzida por agentes quimioterápicos não está totalmente elucidado. Evidências (63)(64) levantam a possibilidade de que o ER promova melhora na sinalização de estresse oxidativo, função

mitocondrial, desregulação e sinalização do ferro, e suporte do fator de crescimento semelhante à insulina.

Em uma revisão sistemática realizada por Fuller e colaboradores (65) com exercício aeróbico e resistido demonstraram efeito benéfico estatisticamente significativo do exercício em 104 (75%) metanálises, com a maioria dos resultados moderados para aptidão cardiovascular e força muscular e pequenos para fadiga relacionada ao câncer, qualidade de vida relacionada à saúde e depressão em pessoas em tratamento de câncer ou sobreviventes. Em estudo (66) realizado para investigar o estado oxidante e antioxidante do tecido hepático induzido pela DOX em ratos jovens adultos, associando como intervenção protocolo de exercício aeróbico, os autores evidenciaram que o treinamento físico aumentou a proteína de choque térmico (HSP70), e Glutathione peroxidase (GPx), substâncias com ação citoprotetora e antioxidante, respectivamente. Além da diminuição de biomarcadores de estresse oxidativo (MDA e carbonilação de proteínas).

No estudo de Deminice e colaboradores (15) demonstraram que o ER evitou o dano oxidativo ao fígado causado pela inoculação de células tumorais Walker-256, e possivelmente os efeitos modulatórios do ER no metabolismo da Hcy pareciam estar no nível da via de transulfuração, apesar do estudo não ter avaliado a ação do ER na redução da hepatotoxicidade, fica evidente sua ação em condições em que o estresse oxidativo esteja aumentado, nesse caso associado à tumorigênese.

Embora o delineamento do estudo não correspondesse a utilização do tratamento com DOX, os resultados do trabalho de Deminice e Jordão (52) nos motivaram a associar as duas intervenções como terapêutica no tratamento com o quimioterápico, visto que evidenciaram que a suplementação de Cr foi capaz de inibir marcadores de estresse oxidativo aumentados no plasma e músculos induzidos por exercício agudo.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do exercício resistido isolado ou associado com a suplementação de creatina, na hepatotoxicidade induzida pelo quimioterápico Doxorubicina em modelo animal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados camundongos Swiss machos pesando 42,3 g (DP±4,6), com idade entre 6 a 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e mantidos no Biotério do Laboratório de Bioquímica do Exercício/UEL. Os animais foram acomodados em caixas individuais de polietileno, mantidos sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura média de 22°C. Ao longo do estudo, a ração e a água foram fornecidas *ad libitum*. Os animais foram pesados diariamente durante experimento, o cálculo do ganho de peso corporal foi obtido pela subtração do peso corporal final pelo inicial. O índice hepatossomático (IHS) foi obtido pela relação entre o peso do fígado (PF) e o peso corporal final (PCf), sendo $IHS = PF/PCf \times 100$. Todos os procedimentos experimentais previstos neste estudo foram iniciados após aprovação (Anexo A) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA nº 11131.2019.07) e seguiram as normas éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, bem como a Declaração de Helsinque e suas posteriores alterações.

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Trata-se de um estudo experimental, no qual foram utilizados 38 animais divididos aleatoriamente em cinco grupos: Controle/C (N = 7), Exercitados/Ex (n = 7), Doxorrubicina/Dox (n = 8), Doxorrubicina exercitados/DoxEx (n = 8) e Doxorrubicina, exercitados e suplementados com creatina/DoxExCr (n = 8).

Grupo 1 (C) – Controle, tratados com ração padrão, receberam semanalmente solução salina (NaCl 0,9%) (i.p) no dia da aplicação da droga, mantiveram-se sedentários;

Grupo 2 (Ex) – Animais tratados com ração padrão, receberam semanalmente solução salina (NaCl 0,9%) (i.p) no dia da aplicação da droga e realizaram protocolo de ER;

Grupo 3 (Dox) – Animais tratados com ração padrão, receberam DOX (i.p) semanalmente e mantiveram-se sedentários;

Grupo 4 (DoxEx) – Animais tratados com ração padrão, receberam DOX (i.p) semanalmente e realizaram protocolo de ER;

Grupo 5 (DoxExCr) - Animais tratados com ração suplementada com Cr, receberam DOX (i.p) semanalmente e realizaram protocolo de ER.

O Cloridrato de doxorrubicina (Bérgamo, Brasil) foi injetado (i.p) uma vez por semana, durante as cinco semanas do protocolo experimental, totalizando a dosagem de 12 mg/kg.

A elaboração da ração seguiu a recomendação da *American Institute of Nutrition* (67), que estabelece como base a formulação AIN-93G, adequada para a manutenção de roedores, composta por proteínas (20%); carboidratos (63%); gorduras (7%), fibras (5%) e mix multivitamínico (5%), conforme laudo do fornecedor. A AIN-93G foi ofertada para todos os grupos, exceto para o grupo DoxExCr que recebeu ração AIN-93G suplementada com 2% de Cr, ambas fornecidas pela Rhoster® (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil). A suplementação de Cr iniciou uma semana antes da aplicação da droga e do início do treinamento e foi mantida durante todo o período, totalizando 6 semanas. O peso corporal foi avaliado diariamente e o consumo da ração duas vezes por semana.

3.3 PROTOCOLO DE ER

Uma semana antes de iniciar a rotina de treino de exercício resistido, os animais foram adaptados por cinco dias consecutivos ao aparelho de escalada e rotina de treinamento descrito anteriormente por Padilha e colaboradores (68). A rotina dos treinos do ER foi mantida para os grupos Ex, DoxEx e DoxExCr até o final do protocolo (Figura 3).

O protocolo de ER consistia em subir uma escada 3 vezes por semana por um período de cinco semanas, onde duas vezes por semana os animais realizavam treinamento de 60% de 1RM (teste de repetição máxima), intercalado com treinamento de 1RM. O dispositivo de escalada foi projetado de forma a facilitar os movimentos dinâmicos ao subir, no topo da escada foi construída uma sala escura coberta para descanso (2 minutos) entre as sessões de treinamento. Resumidamente, 1 semana após a adaptação ao dispositivo de escalada, todos os animais realizaram o primeiro teste de 1RM 48 horas antes da administração da primeira dose de DOX. Os animais dos grupos Ex; DoxEx e DoxExCr foram submetidos uma vez por semana ao treinamento de 1RM no qual os animais escalaram com 60% - 75% - 90% e 100% de sua capacidade de carga máxima alcançada no treinamento anterior, após escalar com sucesso com a carga inicial, 3g era adicionado à cauda do animal até que houvesse duas falhas consecutivas na escalada.

Durante o treino a 60% de 1RM (duas vezes por semana) os animais foram submetidos a 8 escaladas com uma carga fixa (baseado na carga treino de 1RM realizado anteriormente) amarrada na cauda do animal. O segundo teste de 1RM realizado com todos os animais ocorreu 48h antes da eutanásia. Os camundongos dos grupos C e Dox permaneceram sedentários durante todo o período do protocolo experimental de treinamento resistido.

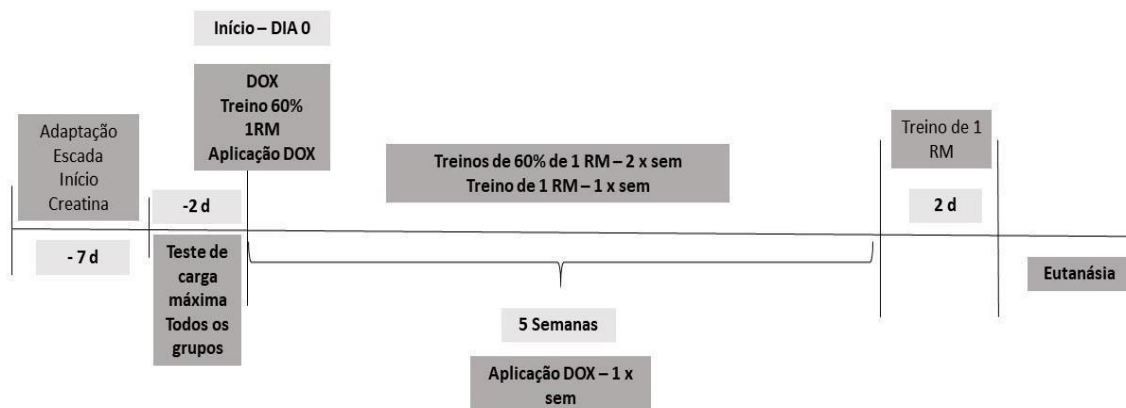


Fig. 3 – Delineamento Experimental

Fonte: Autoria própria (2022)

Legenda: d (dias); 1RM (Teste de repetição máxima); DOX (doxorrubicina); sem (semana)

3.4 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

Após 48 horas da última sessão de TR, os camundongos foram anestesiados por inalação com Isoflurano a 5% (Cristália, Itapira-Brasil) e eutanasiados por exsanguinação. A eutanásia foi realizada entre 7h e 13h. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados a 1000g por 15 min a 4°C e o plasma armazenado a -80 °C para posterior análise. O fígado foi excisado e pesado, em seguida fragmentos foram armazenados em *ependorfs* para os testes bioquímicos em tecidos, congelados a -80 °C até a análise. Outra porção do fígado foi preparada fixada utilizando paraformaldeído tamponado e utilizado para posterior análise histológica.

3.5 HISTOLOGIA

Para a análise histológica, fragmentos de fígado do lobo direito foram incluídos em solução de formalina a 4% por 24 horas. Após a etapa de fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70, 95 e 100%) seguidas de duas trocas de xilol. A inclusão foi feita em parafina e as peças cortadas em cortes de 5 µm de espessura e montados em lâminas de vidro. Antes da coloração foram submetidos a desparafinização, e posteriormente foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E). Em seguida a análise histopatológica foi realizada de forma cega por um patologista experiente, foram analisadas aproximadamente 35 imagens representativas de cada grupo (aumento de 20 vezes) que foram adquiridas digitalmente em microscópio de luz (Biopta®) com câmera acoplada (AmScope®).

O depósito de colágeno foi avaliado através de aproximadamente 30 imagens representativas de cada grupo, coradas com *Picrosirius Red* (aumento de 40 vezes), foram adquiridas digitalmente em microscópio de luz (Biopta®) com câmera acoplada (AmScope®) e analisadas cegamente através do software *Image J* (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA). A área do tecido hepático ocupada pelo colágeno (tingido de

vermelho) foi quantificada para cada campo visual e expressado em porcentagem (%) do campo total, vários campos por fígado foram avaliados para garantir que os dados fossem representativos.

A arquitetura e morfologia do tecido hepático foram avaliadas após a coloração com H&E. Os cortes de tecido foram analisados de forma cega por um patologista experiente, para detectar a ocorrência dos seguintes parâmetros: degeneração celular, infiltração de células inflamatórias intersticiais, zonas necróticas e alteração da organização do tecido (69). Para a gravidade da degeneração celular, o número de células que demonstraram quaisquer alterações (dilatação, vacuolização e núcleos picnóticos) foi determinado visualmente, como grau 0 = sem alteração da histologia normal; grau 1 = número limitado de células isoladas (até 5% do número total de células); grau 2 = grupos de células (5-30% do número total de células); e grau 3 = dano celular difuso (> 30% do número total de células).

A atividade inflamatória foi graduada nos seguintes graus: grau 0 = sem infiltração celular; grau 1 = infiltração leucocitária leve (1 a 3 células por campo visual); grau 2 = infiltração moderada (4 a 6 leucócitos por campo visual); e grau 3 = infiltração intensa por neutrófilos (> 6 leucócitos por campo visual). O nível de necrose foi determinado como grau 0 = sem necrose; grau 1 = focos necróticos dispersos; grau 2 = áreas necróticas confluentes; e grau 3 = áreas maciças de necrose. A gravidade da desorganização do tecido foi classificada como 0 = estrutura normal; 1 = menos de um terço do tecido; 2 = mais de um terço e menos de dois terços; 3 = mais de dois terços do tecido.

3.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA

As amostras de fígado congeladas foram homogeneizadas em tampão de fosfato salino gelado (PBS). Glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) foram determinadas pelo método de Rahman e colaboradores (70). Para avaliação do dano oxidante, os sobrenadantes foram usados para a determinação de Malondialdeído (MDA) como parâmetros de peroxidação lipídica pelo método de Spirlandeli e colaboradores (71). Produtos de Proteína de Oxidação Avançada (AOPP) foram determinados pelo método descrito por Witko Sarsat e colaboradores (72).

Alíquotas do homogeneizado também foram usados para fator de necrose tumoral alfa (TNF- α , Ref: 88-7324-88) e interleucina 6 (IL-6, Ref: 88-7064-88), foram determinados usando o kit ELISA da Thermo Fisher Scientific (Áustria).

A determinação plasmática dos níveis de AST (Ref. 109-4 / 30) e ALT (Ref. 108-2/100) foi realizada espectrofotometricamente usando um kit comercialmente disponível na Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa / Brasil), os resultados foram expressos como uma unidade enzimática/L de plasma.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SPSS (versão 20.0) e GraphPad Prism 7. O teste de Shapiro-Wilk foi usado para analisar a normalidade da distribuição dos dados. Os dados que assumiram distribuição normal foram apresentados como valores de média e desvio padrão. Para comparar os dados paramétricos e identificar possíveis diferenças entre os grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) one-way, seguida do Post-Hoc de Tukey. Para dados não paramétricos (ALT; TNF- α ganho de peso) foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com Post-Hoc de Dunn. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$ em todos os casos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Effects of resistance exercise with or without creatine supplementation on doxorubicin-induced hepatotoxicity in mice

Loriane R. L. Costa Godinho¹, Guilherme H. Dantas Palma¹, Jonathan H. C. Nunes¹, Paola S. Cella¹, Rafael Deminice¹

¹ Physical Education and Sports Institute, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Corresponding author: Rafael Deminice. Department of Physical Education, Faculty of Physical Education and Sport, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 km 380, Campus Universitário, Londrina, PR, Brazil. E-mail: rdeminice@uel.br

Orcid Number ID:

Rafael Deminice: 0000-0002-9246-1079

Abstract

Purpose The aim of this study was to investigate the effects of resistance exercise (RE) alone or associated with creatine supplementation, on hepatotoxicity-induced by doxorubicin (DOX) in mice.

Methods A total of 38 Swiss mice were randomly allocated to one of the following groups: Control / C (n = 7), Exercised / Ex (n = 7), Doxorubicin / Dox (n = 8), Doxorubicin and exercised / DoxEx (n = 8) and doxorubicin, exercised and supplemented with creatine/DoxExCr (n = 8). DOX was administered (i.p.) weekly with a total dose of 12 mg/kg. Creatine supplementation was performed in the diet (2%) throughout the experimental period. RE consisted in climbing stairs 3 times a week for a total of 5 weeks. At the end of 5 weeks (15 RT sessions) the animals were euthanized.

Results Treatment with DOX caused hepatotoxicity evidenced by increased inflammatory markers (TNF- α and IL-6), liver function marker (AST), oxidative stress markers (MDA and AOPP) while the antioxidant defense marker GSH:GSSG ratio was reduced. Furthermore, DOX-treated animals presented hepatic fibrosis and histopathological alterations characterized by cellular degeneration, infiltrate of interstitial inflammatory cells, necrotic zones, alteration of tissue organization, in comparison with the control group. ER partially protected the liver from DOX-induced hepatotoxicity, and when associated with Cr, they were able to attenuate liver damage.

Conclusion: Our data suggest that the association of ER and Cr protected against DOX-induced hepatotoxicity by attenuating hepatic fibrosis, inflammation, oxidative stress markers and maintenance of liver function and architecture.

Keywords: Chemotherapy; liver toxicity; strength training; food supplement; cancer.

Introduction

Cancer is the second leading cause of death worldwide, a disease with increasing prevalence. According to the *Global Cancer Observatory* it is estimated that 28.4 million new cases of cancer (including non-melanoma skin cancer, except basal cell carcinoma) will occur in 2040, 47% higher than 2020 (1). Same is observed in Brazil, when the National Cancer Institute estimate for each year of the 2020-2022 triennium is 625,000 new cases (2).

Anticyclines such as doxorubicin (DOX) are widely used during cancer treatment due to their potent antineoplastic effect against solid tumors, lymphomas and leukemias (3). Although effective, this drug has high toxicity level in several healthy tissues, as demonstrated by several studies in which DOX has a potential catabolic effect (4), cardiotoxicity (5) increased oxidative stress (6) and inflammation (7). Among the adverse effects, liver toxicity has a significant impact on cancer treatment, as it can progress to liver dysfunction, which can lead to the individual's death. In cases where the liver involvement is reversible, antineoplastic treatment can be suspended, however it contributes to delay in cancer treatment. Although the mechanisms on the development of hepatotoxicity induced by DOX are still not well elucidated, it is suggested that the mechanisms of production of ROS and increased oxidative stress are the main responsible for the pathogenesis of liver damage (31). Condition that predisposes to system imbalance Redox due to reduced levels of antioxidant enzymes, apoptosis, inflammation and dysfunction mitochondrial.

The Cr has been studied for its antioxidant properties, demonstrated in different situations, such as muscular dystrophy, arthritic diseases, spinal cord injury, chronic obstructive pulmonary disease, amyotrophic lateral sclerosis, acute injury, immobilization, heart failure, mitochondrial cytopathies, Charcot-Marie-Tooth disease (13). In fact, studies have shown that Cr supplementation protects against high-fat diet-induced hepatotoxicity (14) cancer (15) fatty liver disease (16), among others. Likewise, regular physical exercise is associated with health and a decrease in overall mortality. Recently, positions and consensuses from scientific and medical entities (17)(18) have suggested that physical exercise, including strength training, should be used as part of cancer treatment, including during adjuvant and/or neoadjuvant treatment. However, the effects and consequences of exercise during chemotherapy, as well as its possible hepatoprotective role, are still unknown.

Thus, due the lack of effective treatments or procedures to alleviate or

decrease liver toxicity induced by DOX treatment, the aim of this study was to investigate the effects of Cr supplementation and physical exercise on chemotherapy-induced hepatotoxicity. The hypothesis that RE and Cr supplementation can attenuate the hepatotoxicity induced by doxorubicin was raised due to the improvement in oxidative stress signaling from the two interventions, preventing liver damage. It is important to identify therefore, new therapies that allow protection against liver toxicity, which increase the tolerance and effectiveness of chemotherapy treatment, in addition to the success rate and quality of life of people with cancer.

Material and Methods

Animals and study design

Thirty-eight male Swiss mice who were 6–8 weeks old were obtained from the facilities of the State University of Londrina Animal Care Unit. Animals were individually housed and maintained on a 12-h light/dark cycle at a mean temperature of 22 °C, with free access to food and water for the entirety of the experimental protocol. All procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Use at the same institution and were in accordance with the ethical standards of Brazilian College of Animal Experimentation as well as the Declaration of Helsinki and its later amendments.

Animals were randomly assigned to five groups designated as control (C, n=7), doxorubicin (Dox, n=8), resistance exercised (Ex, n = 7), doxorubicin and resistance exercised (DoxEx, n=8), and doxorubicin, resistance exercised and supplemented with Cr (DoxExCr). Doxorubicin hydrochloride (Bergamo, Brazil) was injected (i.p) weekly for a total of 5 weeks and 12 mg/kg total dosage. All groups received AIN-93 formulated diet for maintenance commercialized by Rhoster®, (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brazil), with exception of the group DoxExCr that received a diet AIN-93G supplemented with 2% Cr (Rhoster®, Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brazil). Supplementation with 2% Cr was chosen as previous studies demonstrated it increased plasma creatine and hepatic Cr concentration (81). The Cr supplementation was started one week before the application of the drug and the beginning of exercise training, the supplementation occurred during the entire period of the experiment, totaling 6 weeks. Body weight was assessed daily and diet consumption twice a week, the experiment lasted for 5 weeks. Body weight gain was obtained by subtracting the final body weight from the initial one. The hepatosomatic index (HSI) was obtained by the ratio between liver weight (FP) and final body weight (BW), with $HSI = FP/BW \times 100$.

RE protocol

One week before starting the RE routine, the animals were adapted for five consecutive days to the climbing apparatus and training routine. previously described by (68).

The RE regimen consisted of climbing a ladder 3 times a week for a period of five weeks, where twice a week the animals performed training of 60% of 1RM, interspersed with 1RM training. The climbing device was designed in a way to facilitate dynamic movements by climbing, at the top of the stairs a covered dark room was built for resting between training sessions. Briefly, 1 week after adaptation to the climbing device, all animals performed the first 1RM test 48 hours before the administration of the first dose of DOX. The animals of the Ex groups; DoxEx and DoxExCr were subjected once a week to 1RM training in which the animals climbed with 60% - 75% - 90% and 100% of their maximum load capacity reached in the previous training, after successfully climbing with the initial load, an additional 3g was added to the animal's tail until there were two consecutive failures in climbing.

Other than that, the animals performed twice a week training at 60% of 1RM, in which the animals were submitted to 8 climbs with a fixed load tied to the animal's tail. The second 1RM test performed with all animals took place 48h before euthanasia. The mice in groups C and Dox remained sedentary during the entire period of the RE experimental protocol.

Euthanasia and tissue preparation

After 48 hours of the last training session, the mice were anesthetized by inhalation with Isoflurane (5%) and euthanized by exsanguination. Euthanasia was performed between 7 am and 1 pm. Blood was collected into heparinized tubes; and centrifuged at 1000g for 15 min at 4°C and the plasma stored at -80°C for further analysis. The liver was excised and weight and then a portion was stored at -80 °C until analysis. Another portion of the liver was prepared for histological analysis.

Histological analysis

For the histological analysis, liver fragments from the right lobe were included in a 4% formalin solution for 24 hours. After the fixation step, the samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (70, 95 and 100%) followed by two xylene changes, the inclusion was made in paraffin and the pieces were cut into 5 µm thick cuts and mounted on slides. of glass. Before staining, they underwent deparaffinization, and later they were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Then, the histopathological analysis was performed blindly by an experienced pathologist, approximately 35 representative images of each group were analyzed (20x magnification) that were digitally acquired under a light microscope (Biopta®) with an attached camera (AmScope®).

The accumulation of fibrous tissue was evaluated through approximately 30

representative images of each group, stained with Picrosirius Red (40x magnification), digitally acquired under a light microscope (Biopta®) with an attached camera (AmScope®) and analyzed by a blinded observer using Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA). The area of liver tissue occupied by collagen (stained red) was quantified for each visual field and expressed as a percentage (%) of the total field, multiple fields per liver were evaluated to ensure that the data were representative.

Tissue morphology evaluated after staining with H&E. Tissue sections were analyzed blindly to assess the occurrence of the following parameters: cellular degeneration, infiltration of interstitial inflammatory cells, necrotic zones and alteration of tissue organization (69). For the severity of cell degeneration, the number of cells that demonstrated any changes (dilation, vacuolization, and pyknotic nuclei) was determined visually, with grade 0 = no change from normal histology; grade 1 = limited number of isolated cells (up to 5% of the total number of cells); grade 2 = groups of cells (5-30% of the total number of cells); and grade 3 = diffuse cell damage (> 30% of the total number of cells). Inflammatory activity was graded in the following grades: grade 0 = no cell infiltration; grade 1 = mild leukocyte infiltration (1 to 3 cells per visual field); grade 2 = moderate infiltration (4 to 6 leukocytes per visual field); and grade 3 = intense infiltration by neutrophils (> 6 leukocytes per visual field). The level of necrosis was determined as grade 0 = no necrosis; grade 1 = scattered necrotic foci; grade 2 = confluent necrotic areas; and grade 3 = massive areas of necrosis. The severity of tissue disorganization was rated as 0 = normal structure; 1 = less than one third of the tissue; 2 = more than one third and less than two thirds; 3 = more than two-thirds of the tissue.

Interleukins, oxidative stress and oxidative damage analysis

Frozen liver samples were homogenized in ice cold phosphate saline buffer (PBS). Reduced (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) was determined by the method of Rahman and contributors (70). For oxidant evaluation damage, the supernatants were used for the determination of malondialdehyde (MDA) as lipid peroxidation parameters by the method of Spirlandeli and contributors (71). Advanced Oxidation Protein products (AOPP) were determined by the method described by Witko-Sarsat and contributors (72).

The homogenates were also used for Tumor necrosis factor alpha (TNF- α , Ref: 88-7324-88) and interleukin 6 (IL-6, Ref: 88-7064-88) were determined using the uncoated ELISA kit by Thermo Fisher Scientific (Austria).

Plasma determination of AST (Ref. 109-4/30) and ALT (Ref. 108-2/) levels were performed spectrophotometrically using a kit commercially available from Labtest Diagnostica (Lagoa Santa / Brazil), the results were expressed as an enzymatic unit/L of plasma.

Statistical analyses

Data were analyzed using the SPSS statistical package (version 20.0) and GraphPad Prism 7. The Shapiro-Wilk test was used to analyze the normality of data distribution. Data that assumed normal distribution were presented as mean and standard deviation values. To compare the parametric data and identify possible differences between the groups, one-way analysis of variance (ANOVA) was used, followed by Tukey's Post-Hoc. For non-parametric data (ALT; TNF- α hepatic and weight gain) the Kruskal-Wallis test with Dunn's Post-Hoc was performed. The level of significance was set at $P < 0.05$ in all cases.

Results

The data presented in Table 1 demonstrate lower body weight gain in DoxEx and DoxExCr animals compared to group C ($P < 0.05$). As well, as the hepatosomatic index of the DoxExCr group showed a significant increase ($P < 0.05$) in relation to the C group. There was no difference in food intake between the five groups during the experiment.

Table 1- Body weight gain, hepatosomatic index and food intake in mice control (C), doxorubicin (Dox), resistance exercised (Ex), doxorubicin and resistance exercised (DoxEx), and doxorubicin with resistance exercised training and supplemented with Cr (DoxExCr).

		C	Ex	Dox	DoxEx	DoxExCr
Body	Weight	7.1 \pm 4.3 ^a	3.3 \pm 2.7 ^{ab}	2.1 \pm 1.9 ^{ab}	2.1 \pm 1.6 ^b	1.4 \pm 1.8 ^b
	gain (g)					
Hepatosomatic		4.63 \pm 0.53 ^a	4.54 \pm 0.15 ^a	5.19 \pm 0.60 ^{ab}	5.07 \pm 0.34 ^{ab}	5.39 \pm 0.58 ^b
index (%)						
Food	intake	4.04 \pm 0.32	3.7 \pm 0.30	3.95 \pm 0.26	3.7 \pm 0.25	3.82 \pm 0.27
	(g/day)					

Source: own authorship (2022)

Data are presented as mean \pm SD. Intergroup differences were assessed by one-way analysis of variance using the Tukey post hoc test, with $P < 0.05$ considered significant. Different letters (a, b) represent statistical difference.

Biochemical data suggest that doxorubicin treatment induces hepatotoxicity compared to control, evidenced by increased plasma AST activity (Fig. 4B, $p < 0.05$), elevated hepatic inflammatory biomarkers TNF- α and IL-6 (Fig. 4C - D, $p < 0.05$), in addition to a significant increase in hepatic oxidative damage markers AOPP and MDA (Fig 5A - B, $p < 0.05$) and a reduction in the GSH/GSSG ratio (Fig 5D, $p < 0.05$).

The RE partially protects the liver from DOX-induced hepatotoxicity characterized by significant reduction of AOPP and MDA (Fig. 5A-F=B, $p < 0.05$); as well as

increased hepatic concentration of GSH (Fig. 5D, $p < 0.05$), contributing to the balance of the redox system. RE also attenuated the liver injury marker AST (Fig. 4B, $p < 0.05$). However, the RE was not able to attenuate the elevated hepatic concentration of TNF- α and IL-6 (Fig. 4C-D, $p > 0.05$) and GSH/GSSG ratio (Fig. 5D, $p > 0.05$).

When associated with Cr, resistance training avoided DOX-induced hepatotoxicity, as liver function markers (ALT and AST) and inflammatory biomarkers (TNF- α and IL-6) showed a significant reduction (Fig. 4 A-B-C and D, $p < 0.05$). Furthermore, antioxidant defense was significantly higher in animals that associated RE with Cr (Fig. 5C, GSH, $p < 0.05$), and lower redox status, which is provided by the GSH:GSSG ratio. Oxidative stress markers observed through protein peroxidation and hepatic lipid peroxidation, AOPP and MDA, were also reduced (Fig. 5A-B, $p < 0.05$) in relation to the Dox group. Importantly, RE did not cause oxidative stress or inflammation (Ex vs C).

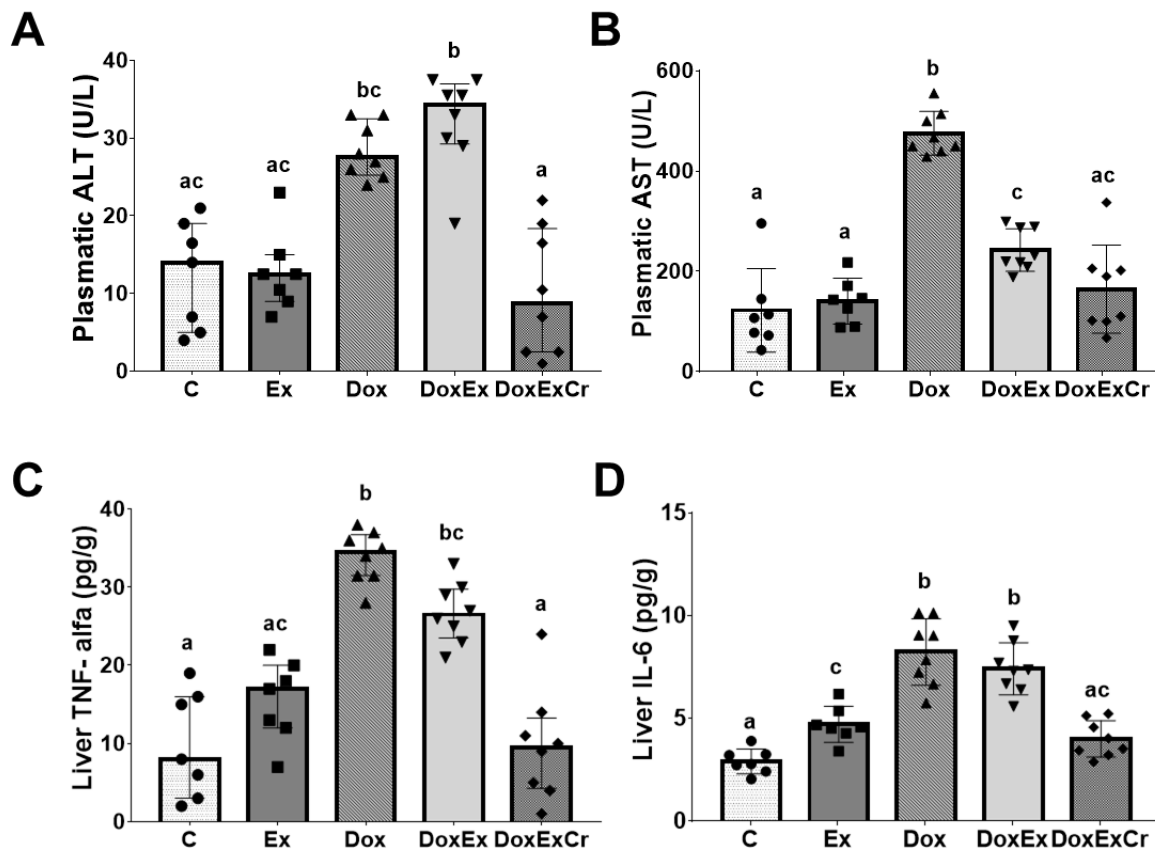


Fig. 4. Plasma analysis of hepatic transaminases ALT (A) and AST (B) and hepatic inflammatory biomarkers, TNF- α (C) and IL-6 (D). Data are expressed as mean \pm standard deviation or median (ALT and TNF- α). Differences between groups were assessed by one-way analysis of variance using Tukey's post hoc test or by Kruskal Wallis using Dunn's post hoc test. With $P < 0.05$ considered significant. Different letters (a, b, c) represent statistical difference.

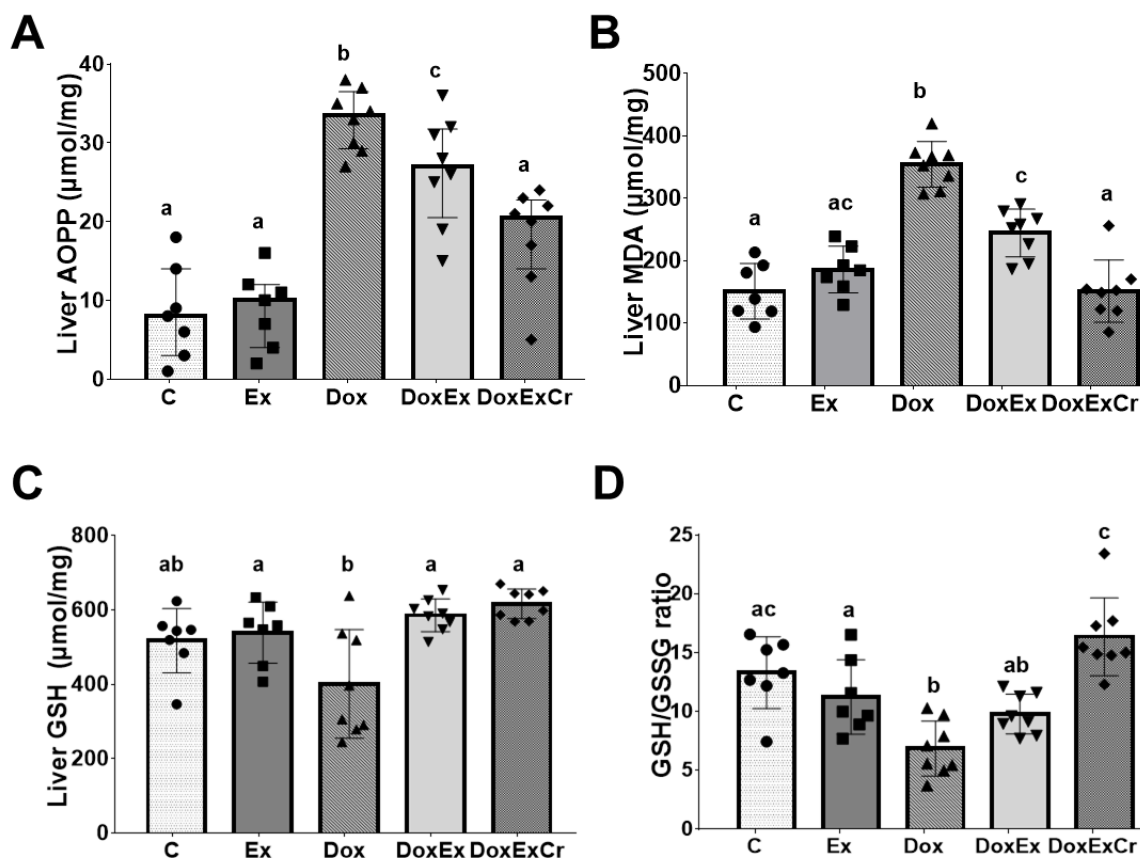


Fig. 5. Evaluation of oxidative stress and antioxidant defense markers. Hepatic Protein Peroxidation Products - AOPP (E), Hepatic Malondialdehyde - MDA (F), Reduced Glutathione GSH(G) and GSH/GSSG Ratio (H). Data are expressed as mean \pm SD. Differences between groups were surveyed by one-way analysis of variance using Tukey's post hoc test. With $P < 0.05$ considered significant. Different letters (a, b, c) represent statistical difference.

Evaluation of liver fibrosis in Picosirius stained sections revealed (Fig. 6A) an increase in collagen deposition in the Dox group, evidencing an increased risk of liver damage compared to the C group. On the other hand, the animals submitted to RE alone and associated with Cr, showed reduced marking of the presence of collagen, which did not present a significant difference ($p > 0.05$) in relation to group C.

Histological data stained with H&E suggest that DOX treatment promoted hepatotoxicity as evidenced by an elevated histopathological score compared to group C (Fig. 7A). RE alone did not provide significant protection when compared to the Dox group ($p > 0.05$). In contrast, the combination of Cr with RE was able to reduce the risk of hepatotoxicity ($p < 0.05$) in relation to the Dox group.

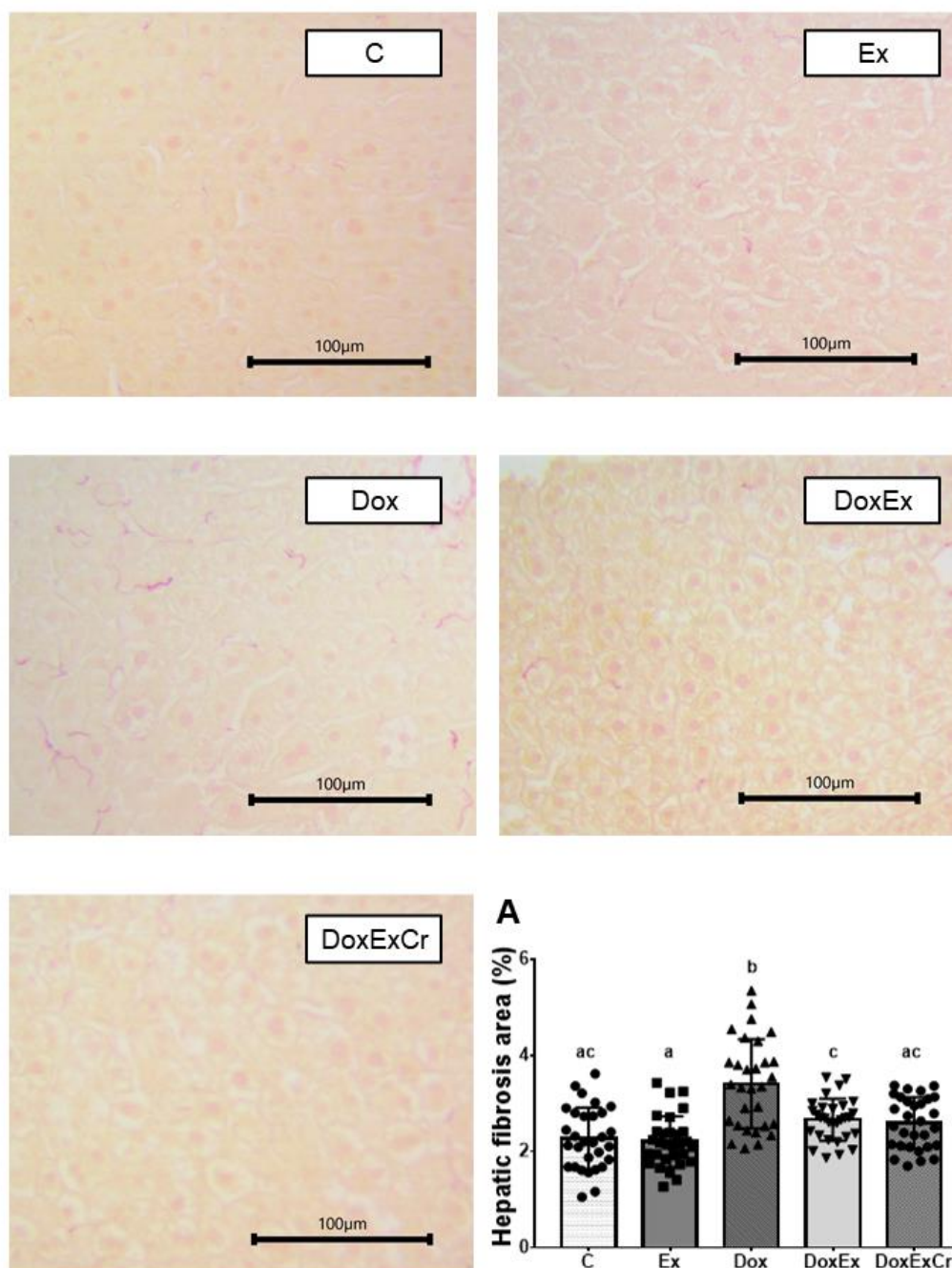


Fig. 6. Microscopic evaluation of the percentage of hepatic fibrosis area (A) after staining with Picrossirius red. Illustrative panel (with representative photomicrographs of experimental groups (C - Ex - Dox - DoxEx - DoxExCr) – the pictures were taken under the magnification of 20x. Differences between groups were surveyed by one-way analysis of variance using Tukey's post hoc test. With $P < 0.05$ considered significant. Data are presented as mean \pm SD. Different letters (a, b, c) represent statistical difference.

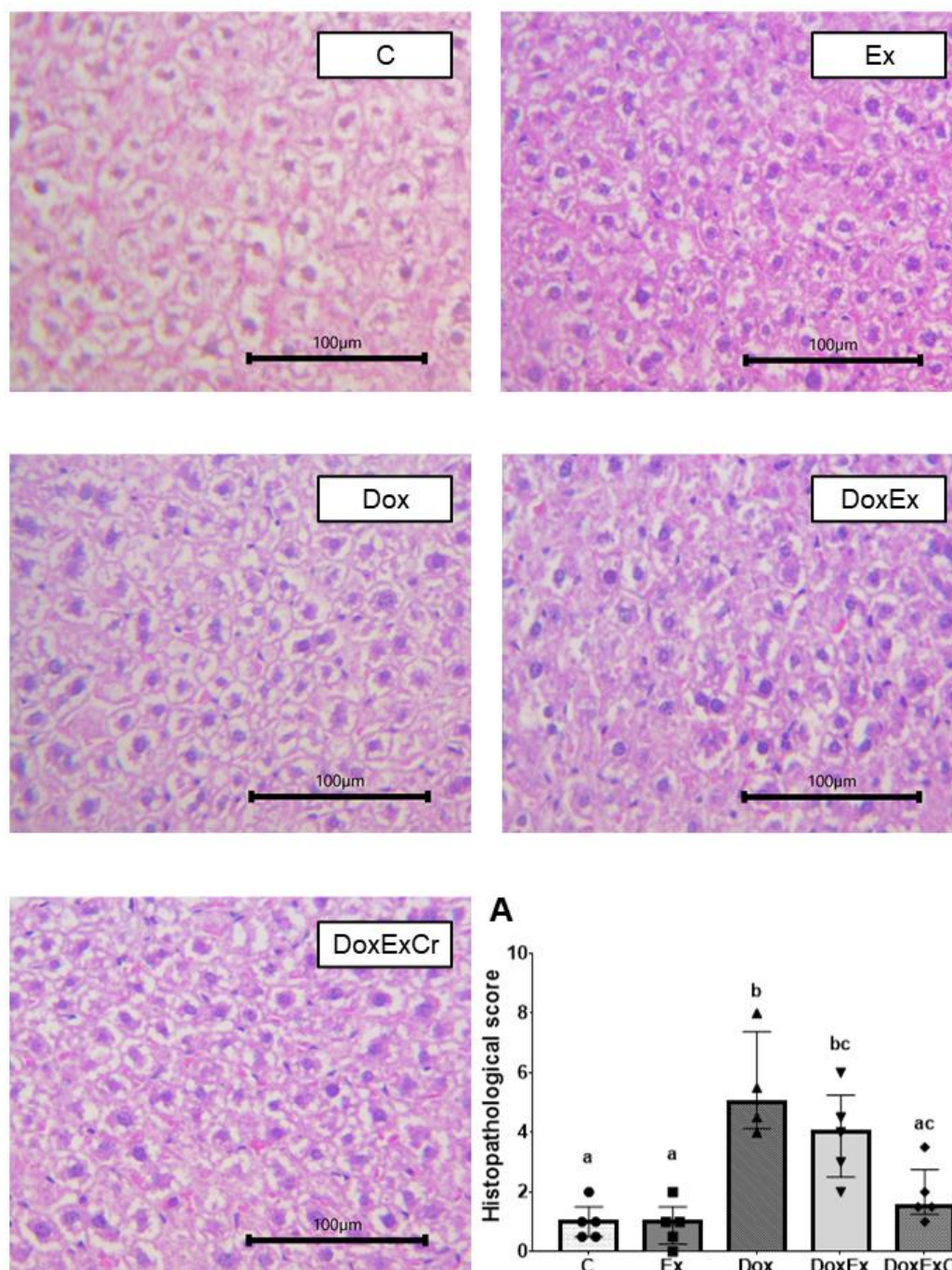


Fig. 7. Microscopic evaluation of liver architecture after H&E staining. The histopathological score (A) data are presented by median, the intergroup differences were evaluated through the sum of 4 parameters of the hepatic architecture (cellular degeneration, infiltrate of interstitial inflammatory cells, necrotic zones, alteration of tissue organization), the differences between the groups were surveyed by one-way analysis of variance using Tukey's post hoc test. Illustrative panel with representative photomicrographs of the experimental groups (C - Ex - Dox - DoxEx - DoxExCr) - the pictures were taken at 20x magnification. Different letters (a, b, c) represent statistical difference, with $P < 0.05$ considered significant.

Discussion

DOX is an effective drug in the treatment of several types of tumors, but its clinical use is restricted due to its hepatotoxic effects (73) (74). The present is the first study to combine RE and Cr supplementation with the aim of minimizing DOX-induced liver damage. Our main findings were: five weeks of DOX treatment promoted hepatotoxicity, characterized by reduced antioxidant defense, increased inflammation, presence liver fibrosis and altered histopathological score, evidenced by presence Cellular degeneration, interstitial inflammatory cell infiltration, necrotic zones and alteration of tissue organization compared to group C. In contrast, RE exercise partially protects the liver from DOX-induced hepatotoxicity, by restoring hepatic redox capacity and decreasing oxidative damage markers, despite RE did not attenuate histopathological and morphological changes imposed by DOX treatment. Notably, Cr was able to potentiate the protective effect of RE, reducing plasma markers of liver function and hepatic oxidative stress, inflammation, increased antioxidant defense, reduced liver fibrosis and histopathological score.

Despite its effectiveness in anticancer treatment, DOX-induced toxicity is the main limiting factor for its use in clinical practice, as it has adverse effects, among the main ones are: cardiotoxicity (73), hepatotoxicity (11) nephrotoxicity (74) and myotoxicity (75) which can interfere with the prognosis and quality of life of the patient. In the present study, the Dox group presented an imbalance in the redox system, evidenced by the increase in oxidative stress and by the presence of inflammation. Other studies have already demonstrated the action of DOX in increasing the inflammatory process and oxidative stress (76)(40)(9), due to the production of ROS, including superoxide anions and hydroxyl radicals, leading to lipid peroxidation and tissue damage.

In view of the studies developed in recent years, Cr has been considered a promising substance in several pathologies (82) (83) (13) since the first evidence described by Lawler et al. (31) which showed the direct antioxidant effects of Cr due to its ability to directly scavenge superoxide and peroxynitrite anions. One of the pioneering revisional works on the antioxidant action of Cr demonstrated its action to significantly protect mtDNA from oxidative damage (samples treated with H₂O₂); in addition to reducing the RNA damage induced by H₂O₂ and DOX, by increasing the CrP reserve that leads to the efficiency of ATP regeneration; and the dose-dependent attenuation of the cytotoxic impact of H₂O₂ (56).

Unlike other substances with antioxidant properties, the mechanisms involved in the antioxidant activity of Cr are still complex, and include both direct and indirect actions. Evidence suggests that Cr activates AMPK, which can promote cellular adaptive responses that overcome oxidative stress (84) (85) (86). Another indication of its antioxidant action may be related to the induction of Cr in the thioredoxin and peroxiredoxin system, which

can increase NADPH resynthesis due to the greater bioavailability of ATP (87) (88). Probably what differentiates the action of Cr from other antioxidants is its role in the production of cellular energy, which occurs through the CrP/ATP ratio, facilitating the transport of intracellular energy through CrP, in addition to increasing its production (89).

We demonstrated that RE alone or associated with Cr were both able to protect against chemotherapy-induced liver toxicity. The cytoprotective effect of Cr on skeletal and cardiac myocytes has been described in recent years (77) (78) (79). A recent study showed that Cr supplementation prior to DOX treatment reduced the elevated levels of liver fibrosis, inflammation, oxidative stress, and senescence promoted by chemotherapy (60). Although Cr was ingested before administering the drug, the results are promising for future studies that use the substance as an intervention to prevent liver toxicity.

Over the years, several studies have shown that exercise attenuates the adverse effects of DOX on cardiovascular and muscle function (80) (77). However, its role in liver function associated with the use of DOX, as assessed in the present study, remains unknown. Resistance training combined with Cr contributed to better results in the redox system, reduced inflammatory response and markers of liver damage. Although the training protocol is different from the present study, the authors (66) corroborated our results, demonstrating that the inclusion of aerobic exercise training significantly increased enzymatic levels (glutathione peroxidase) and reduced oxidative stress biomarkers (malondialdehyde and carbonyl protein).

Despite the beneficial effects of RE alone or associated with Cr supplementation in attenuating DOX-induced liver toxicity, some limitations of the present study need to be considered. It is important to investigate the isolated effect of Cr as an intervention in the group treated with DOX, as well as the analysis of the effects of the two interventions (RE and Cr) reproducing the chemotherapy cycle (intermittent) in animals with the presence of the tumor, simulating what occurs in clinical practice with cancer patients. Side effects, mainly oxidative stress, interfere with several cellular functions, such as cell cycle progression and apoptosis, which can reduce the ability of the chemotherapeutic agent to treat cancer. Although the isolated RE did not present the same results as the association with Cr, it is worth mentioning that its action is important to improve the antioxidant system, it is known that trained people improve their antioxidant capacity, and it was evidenced that its performance did not bring harm when associated to DOX treatment, which supports that its practice can bring direct and indirect benefits during DOX treatment. Finally, our study addresses the need for more clinical trials to establish physiological mechanisms, prescription of physical training and Cr supplementation in order to reduce hepatotoxicity and, consequently, provide a better therapeutic response and quality of life to the patient.

CONCLUSIONS

The benefits of physical exercise on cardiotoxicity and myotoxicity mediated by anthracyclines have shown important therapeutic and preventive relevance. However, this is the first study that relates RE to Cr supplementation in order to ameliorate the side effects resulting from chemotherapeutic agent-induced hepatotoxicity. In conclusion, our data demonstrated the presence of hepatic inflammation induced by DOX administration, oxidative stress, hepatic fibrosis and increased markers of liver damage in the liver. In contrast, RE-associated Cr supplementation decreased DOX-induced toxicity, just as RE alone partially protected the liver from chemotherapeutic-induced hepatotoxicity. We suggest further investigations to explore the mechanisms involved in the reduction of hepatotoxicity promoted by ER alone and by Cr supplementation.

Conflict of interest The authors have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209–49.
2. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro; 2019. 120 p. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
3. Ministério da Saúde (Brasil). Secretaria de Atenção à Saúde. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia. Ministério Da Saúde [Internet]. 2014;1:356. Available from: <http://old.cremerj.org.br/publicacoes/148.PDF>
4. Powers SK, Duarte JA, Le Nguyen B, Hyatt H. Endurance exercise protects skeletal muscle against both doxorubicin-induced and inactivity-induced muscle wasting. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2019;471(3):441–53.
5. McGowan J V., Chung R, Maulik A, Piotrowska I, Walker JM, Yellon DM. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017;31(1):63–75.
6. Hahn VS, Lenihan DJ, Ky B. Cancer therapy-induced cardiotoxicity: Basic mechanisms and potential cardioprotective therapies. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(2):1–14.
7. Wang L, Chen Q, Qi H, Wang C, Wang C, Zhang J, et al. Doxorubicin-induced systemic inflammation is driven by upregulation of toll-like receptor TLR4 and endotoxin leakage. *Cancer Res.* 2016;76(22):6631–42.
8. Pieniżek A, Czepas J, Piasecka-Zelga J, Gwoździński K, Koceva-Chyła A. Oxidative stress induced in rat liver by anticancer drugs doxorubicin, paclitaxel and docetaxel. *Adv Med Sci.* 2013;58(1):104–11.
9. Erdem Guzel E, Kaya Tektemur N. No Title Hesperetin may alleviate the development of doxorubicin-induced pulmonary toxicity by decreasing oxidative stress and apoptosis in male rats. *Tissue Cell.* 2021;(out).
10. Öz E, İlhan MN. Effects of melatonin in reducing the toxic effects of doxorubicin. *Mol Cell Biochem.* 2006;286(1–2):11–5.
11. Akin AT, Öztürk E, Kaymak E, Karabulut D, Yakan B. Therapeutic effects of thymoquinone in doxorubicin-induced hepatotoxicity via oxidative stress, inflammation and apoptosis. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol.* 2021;50(6):908–17.
12. Kochetkova EA, Nevzorova VA, Ugai LG, Maistrovskaia Y V., Massard G. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha and TNF Superfamily Members in Bone Damage in

- Patients with End-Stage Chronic Obstructive Lung Disease Prior to Lung Transplantation. *Calcif Tissue Int.* 2016;99(6):578–87.
13. Harmon KK, Stout JR, Fukuda DH, Pabian PS, Rawson ES, Stock MS. The application of creatine supplementation in medical rehabilitation. *Nutrients.* 2021;13(6):1–24.
 14. Deminice R, da Silva RP, Lamarre SG, Brown C, Furey GN, McCarter SA, et al. Creatine supplementation prevents the accumulation of fat in the livers of rats fed a high-fat diet. *J Nutr.* 2011;141(10):1799–804.
 15. Deminice R, Cella PS, Padilha CS, Borges FH, da Silva LECM, Campos-Ferraz PL, et al. Creatine supplementation prevents hyperhomocysteinemia, oxidative stress and cancer-induced cachexia progression in Walker-256 tumor-bearing rats. *Amino Acids.* 2016;48(8):2015–24.
 16. Deminice R, de Castro GS, Brosnan ME, Brosnan JT. Creatine supplementation as a possible new therapeutic approach for fatty liver disease: early findings. *Amino Acids.* 2016;48(8):1983–91.
 17. Campbell KL, Winters-Stone KM, Wiskemann J, May AM, Schwartz AL, Courneya KS, et al. Exercise Guidelines for Cancer Survivors: Consensus Statement from International Multidisciplinary Roundtable. Vol. 51, *Medicine and science in sports and exercise.* 2019. 2375–2390 p.
 18. Hayes SC, Spence RR, Galvão DA, Newton RU. Australian Association for Exercise and Sport Science position stand: Optimising cancer outcomes through exercise. *J Sci Med Sport.* 2009;12(4):428–34.
 19. Arcamone F, Franoeschi G, Pence S, Farmitalia IR, Selva A. Adriamycin, A Novel Antitumor Antibiotic. *Tetrahedron Lett.* 1969;13(13):1007–10.
 20. Bonadonna G, Monfardinit S, De Lena M, Franca Fossati-Bellani \$. Clinical Evaluation of Adriamycin, a New Antitumour Antibiotic. *Br MedicalJournal.* 1961;7(3):29–503.
 21. Wang N, Zhang Y, Liu H, Wang A, Ren T, Gou J, et al. Toxicity Reduction and Efficacy Promotion of Doxorubicin in the Treatment of Breast Tumors Assisted by Enhanced Oral Absorption of Curcumin-Loaded Lipid-Polyester Mixed Nanoparticles. *Mol Pharm.* 2020;17(12):4533–47.
 22. Sun J, Wei Q, Zhou Y, Wang J, Liu Q, Xu H. A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs. *BMC Syst Biol.* 2017;11(Suppl 5).
 23. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol.* 1999;57(7):727–41.
 24. Perego P, Corna E, De Cesare M, Gatti L, Polizzi D, Pratesi G, et al. Role of Apoptosis and Apoptosis-Related Genes in Cellular Response and Antitumor Efficacy

- of Anthracyclines. *Curr Med Chem*. 2001;8(1):31–7.
25. Kaufmann SH. Cell death induced by topoisomerase-targeted drugs: More questions than answers. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 1998;1400(1–3):195–211.
 26. Doroshow JH. Role of hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation in the killing of Ehrlich tumor cells by anticancer quinones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(12):4514–8.
 27. Jacevic V, Djordjevic A, Srdjenovic B, Milic-Tores V, Segrt Z, Dragojevic-Simic V, et al. Fullerenol nanoparticles prevents doxorubicin-induced acute hepatotoxicity in rats. *Exp Mol Pathol* [Internet]. 2017;102(2):360–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.03.005>
 28. Injac R, Perse M, Obermajer N, Djordjevic-Milic V, Prijatelj M, Djordjevic A, et al. Potential hepatoprotective effects of fullerenol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials*. 2008;29(24–25):3451–60.
 29. Renu K, V.G. A, Tirupathi TP, Arunachalam S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update [Internet]. Vol. 818, *European Journal of Pharmacology*. 2018. 241–253 p. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.043>
 30. Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2019;46(3):204–15.
 31. Rashid S, Ali N, Nafees S, Ahmad ST, Arjumand W, Hasan SK, et al. Alleviation of doxorubicin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity by chrysin in Wistar rats. *Toxicol Mech Methods*. 2013;23(5):337–45.
 32. Shivakumar P, Usha Rani M, Gopala Reddy A, Anjaneyulu Y. A study on the toxic effects of doxorubicin on the histology of certain organs. *Toxicol Int*. 2012;19(3):241–4.
 33. El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur RL, Fernando A, et al. Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int J Biol Sci*. 2009;5(5):466–73.
 34. Deepa PR, Varalakshmi P. Protective effect of low molecular weight heparin on oxidative injury and cellular abnormalities in adriamycin-induced cardiac and hepatic toxicity. *Chem Biol Interact*. 2003;146(2):201–10.
 35. Sasame HA, Boyd MR. Superoxide and hydrogen peroxide production and NADPH oxidation stimulated by nitrofurantoin in lung microsomes: possible implications for toxicity. *Life Sci*. 1979;24(Mar):1091–6.
 36. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*. 2002;180(1):79–95.

37. Ferreira ALA, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. 2008;278–81.
38. Lamas DjmJM, Nicoud M, Sterle H, Carabajal E, Tesan F, Perazzo J, et al. Selective cytoprotective effect of histamine on doxorubicin-induced hepatic and cardiac toxicity in animal models. *Cell Death Discov.* 2015;1(1):1–11.
39. Shaimaa W, I MA. Cardioprotective effect of allyl isothiocyanate in a rat model of doxorubicin acute toxicity. *Toxicol Mech Methods.* 2021;28(out):1–10.
40. Sirwi A, Shaik RA, Alamoudi AJ, Eid BG, Kammoun AK, Ibrahim SRM, et al. Article mokko lactone attenuates doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats: Emphasis on sirt-1/foxo1/nf-kb axis. *Nutrients.* 2021;13(11).
41. Ferreira AL., Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras [Internet] [Internet].* 1997;43(Mar). Available from:
<https://www.scielo.br/j/ramb/a/FBtqwzvvhJhcCgRbYZtp4yTQ/?lang=pt>
42. Williams MH, Kreider RB, Branch DJ. *Creatina.* 1a ed. Manole, editor. São Paulo; 2000.
43. Clark JF. Creatine: a review of its nutritional applications in sport. *Nutrition.* 1998;14(Mar):322–4.
44. Stares A, Bains M. The Additive Effects of Creatine Supplementation and Exercise Training in an Aging Population: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *J Geriatr Phys Ther.* 2019;43(2):99–112.
45. Chilibeck P, Kaviani M, Candow D, Zello GA. Effect of creatine supplementation during resistance training on lean tissue mass and muscular strength in older adults: a meta-analysis. *Open Access J Sport Med.* 2017;Volume 8:213–26.
46. Deminice R, Vilhena R, Portari G V., Jordão AA. Suplementação de creatina, homocisteína e estresse oxidativo. *Medicina (B Aires).* 2007;40(3):368–77.
47. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: The “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochem J.* 1992;281(1):21–40.
48. Clarke H, Kim DH, Meza CA, Ormsbee MJ, Hickner RC. The evolving applications of creatine supplementation: Could creatine improve vascular health? *Nutrients.* 2020;12(9):1–23.
49. Rebello MR, TIRAPEGUI J. *Creatina: o suplemento nutricional para a atividade física - Conceitos atuais.* ALAN [Internet]. 2002;52(jun):117–27.
50. Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, et al. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington’s

- disease. *J Neurosci.* 1998;18(1):156–63.
51. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(1):47–52.
 52. Deminice R, Jordao AA. Creatine supplementation reduces oxidative stress biomarkers after acute exercise in rats. *Amino Acids.* 2012;43(2):709–15.
 53. Stefani GP, Nunes RB, Dornelles AZ, Alves JP, Piva MO, Domenico MD, et al. Effects of creatine supplementation associated with resistance training on oxidative stress in different tissues of rats. *J Int Soc Sports Nutr.* 2014;11(1):1–9.
 54. Fimognari C, Sestili P, Lenzi M, Cantelli-Forti G, Hrelia P. Protective effect of creatine against RNA damage. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen.* 2009;670(1–2):59–67.
 55. Sestili P, Barbieri E, Martinelli C, Battistelli M, Guescini M, Vallorani L, et al. Creatine supplementation prevents the inhibition of myogenic differentiation in oxidatively injured C2C12 murine myoblasts. *Mol Nutr Food Res.* 2009;53(9):1187–204.
 56. Sestili P, Martinelli C, Colombo E, Barbieri E, Potenza L, Sartini S, et al. Creatine as an antioxidant. *Amino Acids.* 2011;40(5):1385–96.
 57. Sestili P, Martinelli C, Bravi G, Piccoli G, Curci R, Battistelli M, et al. Creatine supplementation affords cytoprotection in oxidatively injured cultured mammalian cells via direct antioxidant activity. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(5):837–49.
 58. Rahimi R. Creatine supplementation decreases oxidative DNA damage and lipid peroxidation induced by a single bout of resistance exercise. *J Strength Cond Res.* 2011;25(dec):3448–55.
 59. Gonzales EB, Smith RN, Agharkar AS. A review of creatine supplementation in age-related diseases: More than a supplement for athletes. *F1000Research.* 2014;3(0):1–11.
 60. Aljobaily N, Viereckl MJ, Hydock DS, Aljobaily H, Wu TY, Busekrus R, et al. Creatine alleviates doxorubicin-induced liver damage by inhibiting liver fibrosis, inflammation, oxidative stress, and cellular senescence. *Nutrients.* 2021;13(1):1–15.
 61. Alishahi A, Roshan VD, Hedayati M. Pretreatment effects of regular aerobic training on the IGF system and hepatotoxicity induced by Doxorubicin in Rats. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2013;14(12):7427–31.
 62. Cheema BS, Kilbreath SL, Fahey PP, Delaney GP, Atlantis E. Safety and efficacy of progressive resistance training in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;148(2):249–68.
 63. Hinkley JM, Konopka AR, Suer MK, Harber MP. Short-term intense exercise training reduces stress markers and alters the transcriptional response to exercise in skeletal muscle. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2017;312(3):R426–33.

64. Mackay AD, Marchant ED, Munk DJ, Watt RK, Hansen JM, Thomson DM, et al. Multitissue analysis of exercise and metformin on doxorubicin-induced iron dysregulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;316(May):E922–30.
65. Fuller JT, Hartland MC, Maloney LT, Davison K. Therapeutic effects of aerobic and resistance exercises for cancer survivors: A systematic review of meta-analyses of clinical trials. *Br J Sports Med.* 2018;52(20):1311.
66. Ahmadian M, Dabidi Roshan V, Leicht AS. Age-related effect of aerobic exercise training on antioxidant and oxidative markers in the liver challenged by doxorubicin in rats. *Free Radic Res [Internet].* 2018;52(7):775–82. Available from: <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1470328>
67. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939–51.
68. Padilha CS, Cella PS, Chimin P, Voltarelli FA, Marinello PC, De Jesus Testa MT, et al. Resistance Training's Ability to Prevent Cancer-induced Muscle Atrophy Extends Anabolic Stimulus. *Med Sci Sports Exerc.* 2021;53(8):1572–82.
69. Duarte JA, Leão A, Magalhães J, Ascensão A, Bastos ML, Amado FL, et al. Strenuous exercise aggravates MDMA-induced skeletal muscle damage in mice. *Toxicology.* 2005;206(3):349–58.
70. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 2007;1(6):3159–65.
71. Spirlandeli AL, Deminice R, Jordao AA. Personal pdf file for Plasma Malondialdehyde as Biomarker of Lipid Peroxidation : Effects of Acute Exercise Plasma Malondialdehyde as Biomarker of Lipid Peroxidation : Effects of Acute Exercise. 2014;14–8.
72. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304–13.
73. Hafez AA, Jamali Z, Samiei S, Khezri S, Salimi A. Reduction of doxorubicin-induced cytotoxicity and mitochondrial damage by betanin in rat isolated cardiomyocytes and mitochondria. *Hum Exp Toxicol.* 2021;40(12):2123–34.
74. Afsar T, Razak S, Almajwal A, Al-Disi D. Doxorubicin-induced alterations in kidney functioning, oxidative stress, DNA damage, and renal tissue morphology; Improvement by *Acacia hydaspica* tannin-rich ethyl acetate fraction. *Saudi J Biol Sci [Internet].* 2020;27(9):2251–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.07.011>

75. Kwon I. Protective effects of endurance exercise on skeletal muscle remodeling against doxorubicin-induced myotoxicity in mice. *Phys Act Nutr.* 2020;24(2):11–21.
76. Ibrahim Fouad G, Ahmed KA. The protective impact of berberine against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *Tissue Cell [Internet].* 2021;73(July):101612. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101612>
77. Bredahl EC, Sharif S, Siedlik JA, Wagner MK, Twaddell MD, Tigner AT, et al. Resistance Training during Chemotherapy with Doxorubicin. *Med Sci Sports Exerc.* 2020;52(12):2529–37.
78. Torok ZA, Busekrus RB, Hydock DS. Effects of Creatine Supplementation on Muscle Fatigue in Rats Receiving Doxorubicin Treatment. *Nutr Cancer [Internet].* 2020;72(2):252–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1623900>
79. Santacruz L, Darrabie MD, Mantilla JG, Mishra R, Feger BJ, Jacobs DO. Creatine Supplementation Reduces Doxorubicin-Induced Cardiomyocellular Injury. *Cardiovasc Toxicol.* 2015;15(2):180–8.
80. Wonders KY, Hydock DS, Schneider CM, Hayward R. Acute exercise protects against doxorubicin cardiotoxicity. *Integr Cancer Ther.* 2008;7(3):147–54.
81. Deminice R, Portari GV, Vannucchi H, Jordao AA. Effects of creatine supplementation on homocysteine levels and lipid peroxidation in rats. *Br J Nutr.* 2009; 102(1):110-6. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0007114508162985>.
82. Gualano B, Artioli GG, Poortmans JR, Lancha Junior AH. Exploring the therapeutic role of creatine supplementation. *Amino Acids.* 2010 Jan; 38(1):31-44. Available from: [https://doi: 10.1007/s00726-009-0263-6](https://doi:10.1007/s00726-009-0263-6).
83. Alves CR, Santiago BM, Lima FR, Otaduy MC, Calich AL, Tritto AC, de Sá Pinto AL, Roschel H, Leite CC, Benatti FB, Bonfá E, Gualano B. Creatine supplementation in fibromyalgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2013 Sep;65(9):1449-59. Available from: [https://doi: 10.1002/acr.22020](https://doi:10.1002/acr.22020).
84. Barbieri E, Guescini M, Calcabrini C, Vallorani L, Diaz AR, Fimognari C, Canonico B, Luchetti F, Papa S, Battistelli M, Falcieri E, Romanello V, Sandri M, Stocchi V, Ciacci C, Sestili P. Creatine Prevents the Structural and Functional Damage to Mitochondria in Myogenic, Oxidatively Stressed C2C12 Cells and Restores Their Differentiation Capacity. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;ID 5152029. Available from: [https://doi: 10.1155/2016/5152029](https://doi:10.1155/2016/5152029).
85. Alves CR, Ferreira JC, de Siqueira-Filho MA, Carvalho CR, Lancha AH Jr, Gualano B. Creatine-induced glucose uptake in type 2 diabetes: a role for AMPK- α ? *Amino Acids.* 2012 Oct;43(4):1803-1807. Available from: [https://doi: 10.1007/s00726-012-1246-6](https://doi:10.1007/s00726-012-1246-6).
86. Ceddia RB, Sweeney G. Creatine supplementation increases glucose oxidation and AMPK phosphorylation and reduces lactate production in L6 rat skeletal muscle cells. *J*

Physiol. 2004 Mar 1; 555(Pt 2):409-21. Available from: <https://doi:10.1113/jphysiol.2003.056291>.

87. Sestili P, Ambrogini P, Barbieri E, Sartini S, Fimognari C, Calcabrini C, Diaz AR, Guescini M, Polidori E, Luchetti F, Canonico B, Lattanzi D, Cuppini R, Papa S, Stocchi V. New insights into the trophic and cytoprotective effects of creatine in in vitro and in vivo models of cell maturation. *Amino Acids*. 2016 Aug; 48(8):1897-911. Available from: [https://doi: 10.1007/s00726-015-2161-4](https://doi:10.1007/s00726-015-2161-4).
- 88 Sestili P, Barbieri E, Stocchi V. Effects of Creatine in Skeletal Muscle Cells and in Myoblasts Differentiating Under Normal or Oxidatively Stressing Conditions. *Mini Rev Med Chem*. 2016; 16(1):4-11. Available from: <https://doi:10.2174/1389557515666150722102342>.
- 89 Wallimann T, Tokarska-Schlattner M, Schlattner U. The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids*. 2011 May; 40(5):1271-96. Available from: [https://doi: 10.1007/s00726-011-0877-3](https://doi:10.1007/s00726-011-0877-3).

ANEXOS

ANEXO A
Comissão de ética no uso de animais



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 128/2019

Londrina, 20 setembro de 2019.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "**Toxicidade muscular cardíaca e esquelética induzida pelo quimioterápico doxorrubicina em modelo de carcinoma experimental: efeito da suplementação de creatina e do exercício.**" protocolo CEUA nº 11131.2019.07 sob a responsabilidade de **Rafael Deminice**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/Uel), em **20/09/2019**.

Este projeto tem por objetivos: estudar o possível efeito protetor da suplementação de creatina e do exercício resistido sobre a toxicidade e atrofia muscular cardíaca e esquelética induzidos por doxorrubicina; estudar o possível papel adjuvante da suplementação de creatina e do exercício resistido no tratamento do câncer com quimioterápico doxorrubicina; analisar os efeitos da suplementação de creatina e do exercício físico sobre a sobrevida dos animais inoculados com tumor e tratados com doxorrubicina. Grau de invasividade: 3.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	20/09/2019 a 31/08/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogênico (Swiss) Rato heterogênico (Wistar)
Nº de animais	312 (156 camundongos Swiss e 156 ratos Wistar)
Peso/ Idade	20-25g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central – Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, músculos sóleo, gastrocnêmio, extensor longo dos dedos, gordura epididimal e retroperitoneal, coração, fígado, baço e tumor.

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/Uel

**Profª Drª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano**
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). **Rafael Deminice**
Responsável pelo projeto
Departamento de Educação Física/CEFE
C/C para a Chefia do Depto de Educação Física/CEFE
C/C para a Direção do Centro de Educação Física/CEFE