



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em  
Saúde e Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**ESTUDO DO EFEITO DO MITO-TEMPO E DO ÁCIDO  
LIPOICO SOBRE A CARDIOTOXICIDADE DA  
DOXORRUBICINA**

**VIVIANE COSTA JUNQUEIRA ROCHA**

**Salvador – Bahia  
2015**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PÉSQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em  
Saúde e Medicina Investigativa**

**ESTUDO DO EFEITO DO MITO-TEMPO E DO ÁCIDO  
LIPOICO SOBRE A CARDIOTOXICIDADE DA  
DOXORRUBICINA**

**VIVIANE COSTA JUNQUEIRA ROCHA**

Orientador: Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho  
Co-orientador: Dr. Alberto Augusto Noronha Dutra

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia  
2015**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

R672e Rocha, Viviane Costa Junqueira  
Estudo do efeito do Mito-TEMPO e do ácido lipoico sobre a  
cardiotoxicidade da doxorrubicina. / Viviane Costa Junqueira Rocha. - 2015.  
96 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho, Laboratório de  
Patologia e Biointervenção

Tese (Doutorado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –  
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2015.

1. Doxorrubicina. 2. Cardiotoxicidade. 3. Ácido lipoico. 4. Melanoma.  
I. Título.

CDU 54-32:616-006.8

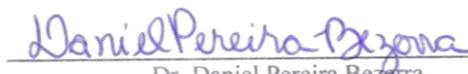
"ESTUDO DO EFEITO DO MITO-TEMPO E DO ÁCIDO LIPOICO SOBRE A CARDIOTOXICIDADE DA  
DOXORRUBICINA."

VIVIANE COSTA JUNQUEIRA ROCHA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dra. Elisalva Teixeira Guimarães  
Professora Assistente  
UNEB

  
Dr. Daniel Pereira Bezerra  
Pesquisador em Saúde Pública  
CPqGM/FIOCRUZ

  
Dra. Fabíola Cardillo  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

*Dedico este trabalho...*

*Aos preciosos presentes de Deus em minha vida:*

*Minha mãezona, Elizaura, minhas queridas  
irmãs, Cristiane e Lisiane, e ao meu lindo e  
grande amor Luciano. Eu os amo!!!*

## AGRADECIMENTOS

*“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito?”* (Salmos 116.12). Pai, muito obrigada por cuidar de mim todo o tempo, sem Sua ajuda eu não teria conseguido, e por colocar em minha vida esses anjos sem os quais seria impossível realizar este trabalho.

Ao Dr. Lain C. Pontes de Carvalho pela orientação, pelo exemplo de perseverança e amor pela pesquisa, por estimular o meu amadurecimento científico com reflexões e questionamentos sempre elegantes e extremamente inteligentes, pela paciência, atenção e confiança no desenvolvimento do projeto. Muito obrigada por tudo!

Ao Dr. Alberto Dutra pela co-orientação, pelo exemplo de simplicidade, por estar sempre disponível e pela convivência agradável e muito enriquecedora, pois mesmo nas conversas mais simples eu sempre aprendia algo novo e interessante.

À Dra. Simone Macambira, minha co-orientadora de coração, por me ajudar no momento mais difícil da tese, disponibilizando o tempo que não possuía para discutir artigos, desenhar, executar e analisar experimentos, pela doçura, pelo exemplo de elegância e competência profissional e pessoal.

Ao meu grande amor, Luciano, por toda paciência, compreensão, incentivo, cuidado, pela ajuda nas fórmulas e planilhas e por fazer de tudo para ver um sorriso estampado em meu rosto.

À minha mãe, Elizaura, pelas orações, conselhos, pelo carinho, cuidado e por todo o suporte, impossível de mensurar ou listar, durante toda a minha vida.

Às minhas preciosas irmãs, Cristiane e Lisiane, pela ajuda incondicional em todos os momentos, pelas orações e, principalmente à Cris, pelo auxílio na formatação da tese e artigo, e na adaptação das figuras.

À minha família pela torcida, incentivo e, principalmente, ao meu cunhado Wesley, tio Evandro, meu primo Márcio, tia Maria Isaura e à Carmelita pela preocupação, cuidado e pelas orações.

Aos meus sogros, Seu Zeca e Dona Mira, cunhados, Joca e Janylle, D. Nena e D. Carmem pelo carinho.

À Luciana França, pela preciosa e sincera amizade, pelo carinho, por estar sempre ao meu lado, chegando de madrugada e ficando até tarde da noite no biotério e laboratório, pelas muitas caronas, pelos almoços, desabafos, enfim, por TUDO, Lu! Muito obrigada!

À Virgínia da Silva pela amizade, incentivo, torcida, pelos conselhos e exemplo de serenidade.

Aos queridos amigos da eterna B05 que ocupam um lugar especial em meu coração e, apesar da distância e dos diferentes caminhos que possamos seguir, tenho certeza de que estaremos sempre unidos e torcendo um pelo outro. Em especial, agradeço à Ayling, minha querida ex-IC que foi essencial em muitas etapas do projeto, e à Cintia, Candace e Emanuelle por toda a ajuda, principalmente na reta final do doutorado.

À Joselli O'Hare, Mila Figueiredo e Nice Oliveira pela amizade, carinho, pelas orações e constante incentivo.

Ao meu amado grupo familiar que me sustentou em oração e foi meu refúgio nos momentos mais difíceis dessa reta final, em especial à Gilmara, Gabriel, Elaine, Ellis e Cristiane.

Aos amigos do LPBI pela convivência diária e pelo auxílio sempre que possível.

Aos amigos do LGHB, principalmente à Thassila Pitanga (sempre B05!), pela amizade sincera, pelas discussões e sugestões de experimentos, pela disponibilidade em ajudar no que fosse necessário e a Sânzio pela carinhosa atenção e auxílio no experimento do DPPH.

Aos amigos do LETI, principalmente a Cássio Meira, pelo auxílio em vários experimentos e pela atenção.

À Pâmela Daltro e Breno Barreto por me receberem tão bem no CBTC, pelas caronas, atenção, carinho e ajuda nos experimentos.

Aos amigos que fiz ao longo de toda a pós-graduação, principalmente Lorena Pinto, Diego Menezes, Ciro Filadelfo e Tiago Landim, por estarem sempre dispostos a ajudar e torcendo pelo meu sucesso.

A Sérgio Vasconcelos pelo trabalho exemplar no setor de esterilização e pela alegre e agradável companhia.

À Ana Partícia pelo auxílio nas questões administrativas do laboratório e à Elivani de Jesus pelo auxílio técnico quando possível.

À D. Lia pelas orações, carinho e preocupação com meu bem estar.

À Flávia Paixão pela amizade, torcida e por me socorrer em tantos momentos, mesmo não fazendo mais parte do laboratório.

A Cláudio Figueira pela atenção, auxílio e pelas dicas de microscopia.

Aos funcionários do Biotério, principalmente à Rejane de Menezes.

Ao Dr. Daniel Bezerra, Dra. Fabíola Cardillo e Dra. Elisalva Guimarães pelas correções e importantes sugestões.

À bibliotecária do CPqGM Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio, pelas orientações na elaboração da versão final desta tese.

À D. Vânia do restaurante pelo carinho e atenção sempre demonstrados.

Aos vigilantes pela cordialidade.

A FIOCRUZ pela concessão da bolsa de doutorado.

*“Eu sei que para além das nuvens, o sol não deixou de brilhar, só por que a terra escureceu” (Kleber Lucas).*

ROCHA, Viviane Costa Junqueira. Estudo do efeito do Mito-TEMPO e do ácido lipoico sobre a cardiotoxicidade da doxorubicina. 96 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## RESUMO

**Introdução:** A doxorubicina (DOX) é um quimioterápico antracíclico amplamente usado para o tratamento de diversos tumores humanos, entretanto, o desenvolvimento de reações adversas à droga, em particular, cardiotoxicidade, tem limitado seu uso. Embora a toxicidade cardíaca induzida pela DOX pareça ser multifatorial, a hipótese mais investigada tem sido a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e há evidências apontando para as mitocôndrias cardíacas como alvos primários da toxicidade da DOX. Esse dano oxidativo pode iniciar peroxidação lipídica e pode ser potencialmente limitado pelo uso de antioxidantes. **Objetivo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a possível eficácia do ácido lipoico (AL) e do Mito-TEMPO (Mito-T) como agentes protetores contra a cardiotoxicidade induzida pela DOX *in vitro* e *in vivo* e investigar se essa proteção pode afetar a atividade antitumoral da DOX. **Método e Resultados:** A capacidade do AL e Mito-T eliminar radicais livres foi avaliada usando o teste do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Menor atividade antioxidante do AL (29%) comparada ao Mito-T (63%) foi observada. DOX reduziu a viabilidade de células H9c2 ( $CI_{50} = 40,83 \mu M$ , IC 95% = 28,64 – 58,21  $\mu M$ ) e aumentou a concentração de malondialdeído (MLDA), um marcador de peroxidação lipídica, confirmando a citotoxicidade induzida pela DOX *in vitro*. O pré-tratamento com AL ou Mito-T não promoveu proteção contra o dano induzido pela DOX *in vitro*. Uma única injeção intraperitoneal (i.p.) de DOX (24 mg/kg de peso corpóreo) induziu redução significativa no peso corpóreo ( $p < 0,001$ ), elevação da atividade sérica total de creatina quinase ( $p < 0,05$ ) e creatina quinase-MB ( $p < 0,05$ ), aumento na concentração de malondialdeído em mitocôndrias ( $p < 0,05$ ) e tecido cardíaco ( $p < 0,01$ ) em camundongos da linhagem C57BL/6 após 48 horas. O pré-tratamento dos animais com Mito-T (5 mg/kg de peso corpóreo, i.p., por dois dias, 48 e 24 horas antes da DOX) reduziu significativamente a peroxidação lipídica de mitocôndrias cardíacas ( $p < 0,01$ ) indicando o direcionamento do antioxidante para a mitocôndria. O tratamento com Mito-T ou AL, duas vezes, 24 e uma hora antes do tratamento com DOX, inibiu a atividade sérica de creatina quinase total ( $p < 0,05$ ). Além disso, o tratamento de camundongos apresentando tumor B16F10 com AL não interferiu na eficácia antitumoral da DOX. **Conclusão:** Os dados sugerem que a combinação de AL com DOX pode ser benéfica para o tratamento de câncer, entretanto, são necessárias novas investigações para confirmar essa suposição.

**Palavras-chave:** Doxorubicina, cardiotoxicidade, ácido lipoico, Mito-TEMPO, melanoma.

ROCHA, Viviane Costa Junqueira. Study of the effect of Mito-TEMPO and lipoic acid on the cardiotoxicity of doxorubicin. 96 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

## ABSTRACT

**Introduction:** Doxorubicin (DOX) is an anthracycline chemotherapeutic that is widely used for the treatment of many human tumours, however, the development of adverse drug reactions in particular cardiotoxicity has limited its use. Although doxorubicin-induced cardiac toxicity appears to be multifactorial, the most thoroughly investigated hypothesis has been the formation of reactive oxygen species (ROS) and there is evidence pointing to cardiac mitochondria as primary targets of the toxicity of DOX. This oxidative injury can initiate lipidic peroxidation and may be potentially limited by the use of antioxidants. **Aim:** The aim of the present study was to evaluate the possible efficacy of lipoic acid (LA) and Mito-TEMPO (Mito-T) as a protective agent against DOX-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo and to investigate whether this protection may affect the antitumor activity of DOX. **Method and Results:** Free radical scavenging capacity of LA and Mito-T was assayed using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay. Lower antioxidant activity for LA (29%) compared to Mito-T (63%) were observed. DOX reduced H9c2 viability (IC<sub>50</sub> = 40.83  $\mu$ M, 95% CI = 28.64 – 58.21  $\mu$ M) and increased the levels of malondialdehyde (MLDA), a marker of lipid peroxidation, confirming DOX-induced cytotoxicity in vitro. Pretreatment with LA or Mito-T did not provide protection against DOX-induced damage in vitro. A single intraperitoneal (i.p.) injection of DOX (24 mg/kg body weight) induced a significant reduction in body weight ( $p < 0.001$ ), elevation of serum activity of total creatine kinase ( $p < 0.05$ ) and creatine kinase-MB ( $p < 0.05$ ), increase in malondialdehyde levels in cardiac mitochondria ( $p < 0.05$ ) and cardiac tissue ( $p < 0.01$ ) in C57BL/6 mice after 48 hours. Pretreatment of animals with Mito-T (5 mg/kg body weight, i.p., for two days, 48 and 24 hours prior to Dox) significantly reduced the lipid peroxidation of cardiac mitochondria ( $p < 0.01$ ) indicating targeting of the antioxidant to the mitochondria. Treatment with Mito-T (20 mg/kg) or LA (200 mg/kg) twice, 24 and one hour before DOX-treatment, inhibited creatine kinase total serum activity ( $p < 0.05$ ). Moreover, treatment of mice bearing B16F10 tumors with LA did not interfere with the DOX antitumor efficacy. **Conclusion:** Our data suggest that there may be benefits of combining LA with DOX for the treatment of cancer, however further investigations are required to confirm this assumption.

**Keywords:** Doxorubicin, cardiotoxicity, lipoic acid, Mito-TEMPO, melanoma.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da doxorubicina (DOX, $C_{27}H_{29}NO_{11}\cdot HCl$ ) e mecanismos de ação cardiotoxicos.....	17
Figura 2	Estrutura química do ácido lipoico (AL, $C_8H_{14}O_2S_2$ ).....	27
Figura 3	Captação de componente direcionado para a mitocôndria.....	30
Figura 4	Estrutura química do Mito-TEMPO (Mito-T, $C_{29}H_{35}N_2O_2P\cdot Cl$ ).....	31
Figura 5	Desenho experimental do tratamento de camundongos com a dose única de 5 mg/kg de Mito-TEMPO (Mito-T) e doxorubicina (DOX)..	44
Figura 6	Desenho experimental do tratamento de camundongos com duas doses de 5 mg/kg de Mito-TEMPO (Mito-T) e uma dose de doxorubicina (DOX).....	45
Figura 7	Desenho experimental do tratamento de camundongos com três doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 12,5 mg/kg) ou ácido lipoico (AL, 120 mg/kg) e uma dose de doxorubicina (DOX).....	45
Figura 8	Desenho experimental do tratamento de camundongos com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 20 mg/kg) ou ácido lipoico (AL, 200 mg/kg) e uma dose de doxorubicina (DOX).....	46
Figura 9	Desenho experimental do tratamento de camundongos com melanoma com quatro doses de ácido lipoico (AL, 200 mg/kg) 24 horas antes da doxorubicina (DOX, 6 mg/kg).....	47
Figura 10	Desenho experimental do tratamento de camundongos com melanoma com nove doses de ácido lipoico (AL, 120 mg/kg) e três doses de doxorubicina (DOX, 8 mg/kg).....	47
Figura 11	Percentual de atividade antioxidante do Mito-TEMPO (Mito-T) e ácido lipoico (AL) avaliada pelo método do DPPH.....	49
Figura 12	Curva concentração-resposta de doxorubicina (DOX) em células H9c2.....	50
Figura 13	Curva concentração-resposta do Mito-TEMPO (Mito-T) em células H9c2.....	51
Figura 14	Curva concentração-resposta do ácido lipoico (AL) em células H9c2.....	51
Figura 15	Peroxidação lipídica de células H9c2 tratadas com doxorubicina (DOX).....	52

Figura 16	Efeito do pré-tratamento com Mito-TEMPO (Mito-T) sobre a viabilidade de células H9c2 tratadas com doxorubicina (DOX).....	53
Figura 17	Efeito do pré-tratamento com ácido lipoico (AL) sobre a viabilidade de células H9c2 tratadas com doxorubicina (DOX).....	53
Figura 18	Peroxidação lipídica de células H9c2 pré-tratadas com Mito-TEMPO (Mito-T) ou ácido lipoico (AL) e tratadas com doxorubicina (DOX).....	54
Figura 19	Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com doxorubicina (DOX) por 24 e 48 horas.....	55
Figura 20	Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) 24 e 48 horas pós- doxorubicina (DOX).....	55
Figura 21	Peroxidação lipídica de tecido (A) e mitocôndrias cardíacas (B) 24 e 48 horas pós- doxorubicina (DOX).....	56
Figura 22	Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com doxorubicina (DOX).....	56
Figura 23	Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) 24 e 48 horas pós- doxorubicina (DOX, 24 mg/kg).....	57
Figura 24	Peroxidação lipídica de tecido (A) e mitocôndrias cardíacas (B) 24 e 48 horas pós- doxorubicina (DOX, 24 mg/kg).....	57
Figura 25	Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com Mito-TEMPO (Mito-T) e/ou doxorubicina (DOX).....	58
Figura 26	Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) de animais tratados com Mito-TEMPO (Mito-T, 5 mg/kg) e/ou doxorubicina (DOX, 24 mg/kg).....	59
Figura 27	Peroxidação lipídica do tecido cardíaco de animais tratados com Mito-TEMPO (Mito-T, 5 mg/kg) e/ou doxorubicina (DOX, 24 mg/kg).....	59
Figura 28	Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T) e/ou doxorubicina (DOX).....	60
Figura 29	Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) de animais tratados com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 5 mg/kg) e/ou doxorubicina (DOX, 24 mg/kg).....	60
Figura 30	Peroxidação lipídica de tecido (A) e mitocôndrias cardíacas (B) de animais tratados com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 5	

	mg/kg) e/ou doxorubicina (DOX, 24 mg/kg).....	61
Figura 31	Varição ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com três doses de Mito-TEMPO (Mito-T) ou ácido lipoico (AL) e/ou doxorubicina (DOX).....	62
Figura 32	Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) de animais tratados com três doses de Mito-TEMPO (Mito-T) ou ácido lipoico (AL) e/ou doxorubicina (DOX).....	62
Figura 33	Peroxidação lipídica do tecido cardíaco de animais tratados com três doses de Mito-TEMPO (Mito-T) ou ácido lipoico (AL) e/ou doxorubicina (DOX).....	63
Figura 34	Varição ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 20 mg/kg) ou ácido lipoico (AL, 200 mg/kg) e/ou doxorubicina (DOX).....	63
Figura 35	Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) de animais tratados com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 20 mg/kg) ou ácido lipoico (AL, 200 mg/kg) e/ou doxorubicina (DOX)..	64
Figura 36	Varição ponderal de camundongos com melanoma submetidos ao tratamento com quatro doses de ácido lipoico (AL) e/ou doxorubicina (DOX).....	65
Figura 37	Peso do tumor de camundongos com melanoma submetidos ao tratamento com quatro doses de ácido lipoico (AL) e/ou doxorubicina (DOX).....	66
Figura 38	Peso do tumor de camundongos com melanoma submetidos ao tratamento com nove doses de ácido lipoico (AL) e/ou três doses de doxorubicina (DOX).....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
Abs	Absorbância
AL	Ácido lipoico
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês, <i>Bovine serum albumin</i> )
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
CK	Creatina quinase
CuZnSOD	Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DHLA	Ácido dihidrolipoico (do inglês, <i>Dihydrolipoic acid</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
DOXol	Doxorrubicinol
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DZR	Dexrazoxano
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
GSH	Glutationa
GSH-Px	Glutationa peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
IC	Intervalo de confiança
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
kg	Quilograma
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
MitoQ	Mitoquinona
Mito-T	Mito-TEMPO
μL	Microlitro
mL	Mililitro
MLDA	Malondialdeído
μM	Micromolar
mM	Milimolar
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
NAC	N-acetilcisteína
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>Nitric oxide</i> )
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i> )
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (do inglês, <i>Reactive nitrogen species</i> )
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive oxygen species</i> )
SBF	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês,

TNF- $\alpha$  *Thiobarbituric acid reactive substances*  
Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *Tumor necrosis factor-alpha*)

TPP  
Trifenilfosfônio (do inglês, *Triphenylphosphonium*)

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1	Uso clínico e mecanismos de ação da doxorubicina	16
1.2	Cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina	20
1.3	Redução da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina	24
1.3.1	Ácido lipoico e Mito-TEMPO como cardioprotetores	27
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
2.1	Geral	33
2.2	Específicos	33
<b>3.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
3.1	Células	34
3.2	Animais	35
3.3	Ensaio do DPPH para avaliação comparativa da atividade antioxidante do Mito-T e AL	35
3.4	Ensaio do Alamar Blue para avaliação da viabilidade de células H9c2	36
3.4.1	Curva concentração-resposta das células cardíacas H9c2 ao tratamento com DOX, Mito-T e AL	38
3.4.2	Efeito protetor do Mito-T e AL sobre a viabilidade de células H9c2	38
3.5	Detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	39
3.5.1	Peroxidação lipídica em células H9c2 tratadas com DOX	39
3.5.2	Peroxidação lipídica de tecido e mitocôndrias cardíacas de camundongos C57BL/6 tratados com DOX	40
3.6	Quantificação da concentração de proteínas	41
3.7	Determinação quantitativa da atividade da creatina quinase (CK) no soro	41
3.8	Avaliação da cardiotoxicidade induzida pela DOX e do efeito cardioprotetor dos antioxidantes em camundongos C57BL/6	43
3.8.1	Determinação do tempo adequado para análise da cardiotoxicidade aguda induzida pela DOX	43
3.8.2	Avaliação do efeito cardioprotetor do Mito-T e AL	44
3.9	Modelo experimental de indução de melanoma	46
3.9.1	Tratamento quimioterápico com DOX e interferência do AL na atividade antineoplásica da DOX	46

3.10	Análise estatística .....	47
4.	RESULTADOS .....	49
4.1	Avaliação da atividade antioxidante do Mito-T e do AL pelo método do DPPH.....	49
4.2	Determinação da curva concentração-resposta das células cardíacas H9c2 ao tratamento com DOX, Mito-T e AL .....	49
4.3	Avaliação da peroxidação lipídica induzida pela DOX em células H9c2 por TBARS.....	51
4.4	Avaliação do efeito protetor do Mito-T e AL sobre a toxicidade da DOX em células H9c2.....	52
4.5	Determinação do tempo adequado para a avaliação da cardiotoxicidade aguda induzida pela DOX <i>in vivo</i> .....	54
4.6	Avaliação do efeito cardioprotetor do Mito-T e AL <i>in vivo</i> .....	58
4.7	Padronização do modelo experimental de indução de melanoma em camundongos C57BL/6 .....	64
4.8	Padronização do tratamento quimioterápico de camundongos C57BL/6 com DOX e avaliação da interferência do AL na atividade antineoplásica da DOX.....	65
5.	DISCUSSÃO .....	68
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	79
	REFERÊNCIAS .....	80
	ARTIGOS PUBLICADOS.....	96

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Uso clínico e mecanismos de ação da doxorubicina

A doxorubicina (DOX) é um quimioterápico da classe das antraciclina usado com sucesso para o tratamento de tumores malignos hematológicos e sólidos, a exemplo de linfoma, leucemia, câncer de mama, pulmão e bexiga (BRYANT et al., 2007; MAASE et al., 2000; ŠIMŮNEK et al., 2009; SMITH et al., 2010; SWAIN et al., 2003). Sua descoberta, no final da década de 60 (ARCAMONE et al., 1969), representou um dos grandes avanços na luta contra o câncer e a DOX continua sendo um dos agentes antitumorais mais amplamente utilizados, tanto individualmente quanto em associação com outros quimioterápicos. É uma droga citotóxica potente isolada a partir de colônias de bactérias *Streptomyces peucetius* que faz parte de vários regimes terapêuticos para o controle de neoplasias. Entretanto, seu uso clínico é limitado pela toxicidade sistêmica e, principalmente, pela indução de toxicidade cardíaca cumulativa e dose-dependente (BONADONNA et al., 1970; KANTROWITZ; BRISTOW, 1984; LEFRAK et al., 1973).

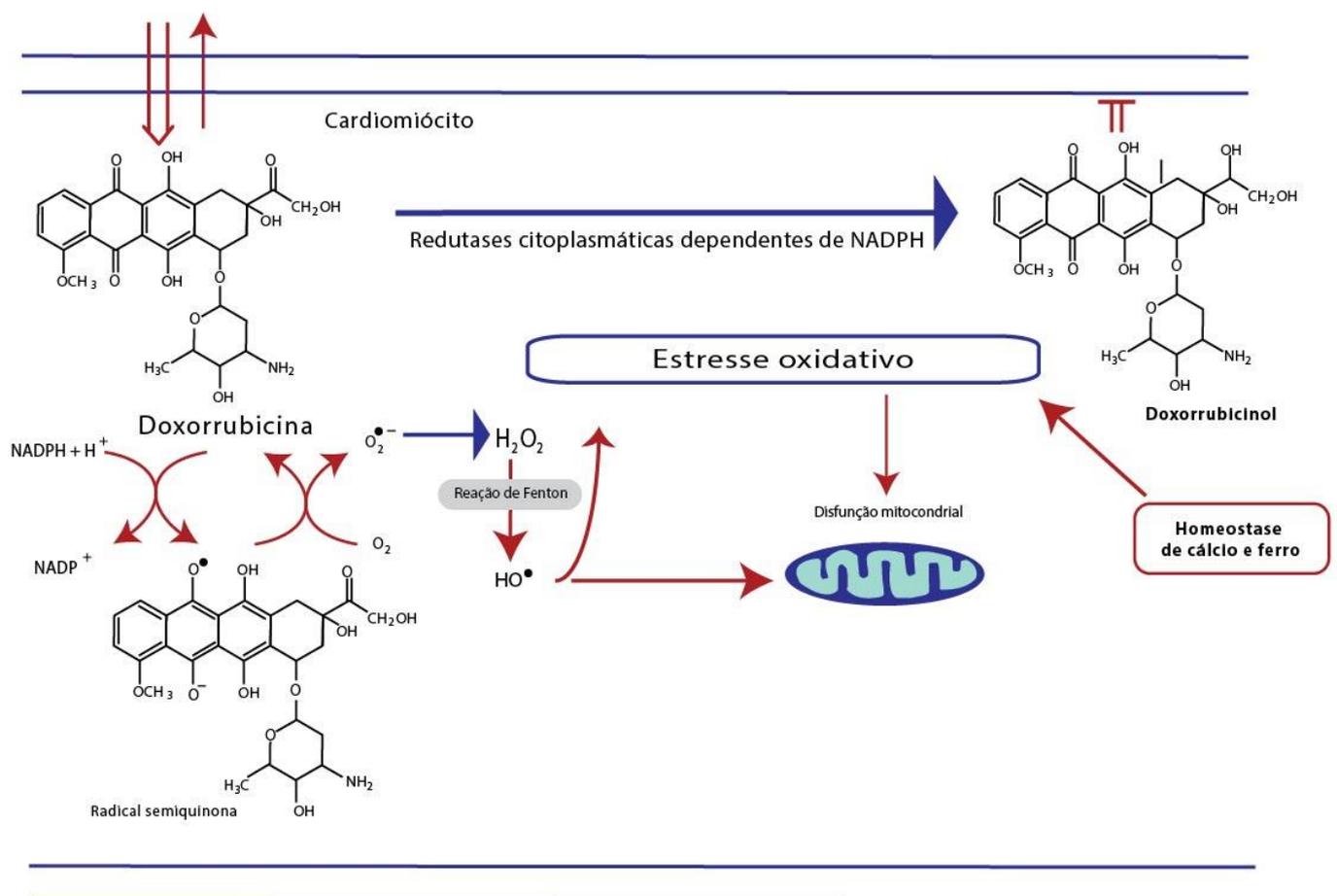
Apesar da ampla utilização para o tratamento de câncer há mais de 40 anos, os mecanismos de ação da DOX, tanto associados ao efeito antitumoral quanto ao efeito cardiotoxico, ainda não estão bem estabelecidos. Vários mecanismos são propostos para explicar a ação citotóxica da DOX, incluindo-se entre eles a intercalação no DNA inibindo a síntese de macromoléculas, a inibição da topoisomerase II que pode resultar em dano ao DNA, formação de metabólitos secundários, além do estresse oxidativo pela geração de radicais livres que causam danos a vários componentes celulares, incluindo proteínas e lipídios, e promovem disfunção mitocondrial (GEWIRTZ, 1999; MENNA et al., 2007; MINOTTI et al., 2004; MONSUEZ et al., 2010; ŠIMŮNEK et al., 2009; VEJPONGSA; YEH, 2014).

A intercalação no DNA e inibição da topoisomerase II são os mecanismos mais referidos na literatura como relacionados à atividade antitumoral da DOX (GEWIRTZ, 1999; MINOTTI et al., 2004). A DOX entra facilmente nas células por difusão passiva e, em geral, é encontrada na mitocôndria e no núcleo. Seu transporte para o núcleo é mediado por proteossomos presentes no citoplasma, aos quais a DOX se liga com alta afinidade. No núcleo, os complexos DOX-

proteossomos são desfeitos e a DOX associa-se ao DNA, uma vez que sua afinidade pelo DNA é maior do que aos proteossomos (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010). A intercalação de DOX no DNA pode promover o bloqueio dos processos de replicação de DNA e síntese de RNA impedindo a proliferação de células tumorais (KIYOMIYA et al., 2001). A inibição da topoisomerase II pode resultar em dano ao DNA seguido por parada do ciclo celular nas fases  $G_1$  e  $G_2$  que, conseqüentemente, leva a ocorrência de apoptose (MINOTTI et al., 2004; PEREGO et al., 2001).

Outros dois mecanismos de ação tóxica da DOX são a formação do metabólito secundário doxorubicinol (DOXol) e a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (COSTA et al., 2013). Esses dois mecanismos são mais referidos na literatura como relacionados ao desenvolvimento de cardiotoxicidade do que à atividade antitumoral.

A molécula de DOX é composta por uma estrutura tetracíclica que apresenta um anel quinona e um grupamento carbonila na cadeia lateral como componentes principais relacionados à ação cardiotóxica do quimioterápico (Figura 1).



**Figura 1. Estrutura química da doxorubicina (DOX, C<sub>27</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>11</sub>·HCl) e mecanismos de ação cardiotoxicos.** A DOX apresenta uma estrutura tetracíclica ligada a um grupamento carbonila e entra facilmente no cardiomiócito por difusão passiva. A redução do anel quinona resulta na formação de radicais semiquinona que podem gerar outras espécies reativas responsáveis pelo desenvolvimento de estresse oxidativo e ocorrência de disfunção mitocondrial. A redução do grupamento carbonila forma o metabólito secundário doxorubicinol que interfere na homeostase de cálcio e ferro podendo induzir estresse oxidativo. Adaptado de Costa e colaboradores (2013).

A redução do grupamento carbonila, mediada por redutases citoplasmáticas, converte a antraciclina em seu metabólito secundário, DOXol, que é muito menos efetivo do que a DOX na eliminação de células tumorais (HEIBEIN et al., 2012), entretanto exerce uma interferência maior na homeostase de ferro e cálcio nas células do miocárdio (MENNA et al., 2008; OCTAVIA et al., 2012). Spycher e colaboradores (1997) demonstraram que o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tem a habilidade de induzir redutases responsáveis pela formação de DOXol e, portanto, a formação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na fase inicial do tratamento com antraciclina pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da redução de DOX a DOXol na fase crônica do tratamento. Devido a sua lenta eliminação, esse metabólito tende a se acumular nos cardiomiócitos, sendo essa uma das explicações para o risco de cardiotoxicidade cumulativa das antraciclina (GIANNI et al., 2008; MENNA et al., 2008).

O papel dos metabólitos secundários de DOX na cardiotoxicidade é sustentado por evidências de que, em animais experimentais, o desenvolvimento de cardiomiopatia crônica usualmente coincide com o acúmulo de DOXol no coração (OLSON; MUSHLIN, 1990). Em trabalho com ratos, Cusack e colaboradores (2002) referem que o aumento da susceptibilidade a cardiomiopatias foi correlacionado com o aumento da conversão de antraciclina em metabólitos secundários. Além disso, camundongos superexpressando redutases cardíacas exibiram um aumento da conversão de DOX a DOXol que foi acompanhado por aceleração do curso de desenvolvimento de cardiomiopatia (FORREST et al., 2000), enquanto camundongos com deleção de tais redutases apresentaram menor formação de DOXol e reduzida cardiotoxicidade (OLSON et al., 2003). Corroborando as observações em animais, análises de amostras cardíacas de pacientes que faleceram após o tratamento com doses cumulativas de DOX revelaram que o DOXol foi o metabólito mais abundante retido no interior dos cardiomiócitos (STEWART et al., 1993).

A redução do anel quinona da DOX, catalisada por NADPH citocromo P450 redutase ou NADH desidrogenase mitocondrial, resulta na formação de

semiquinona, que é um radical relativamente estável na ausência de oxigênio, mas, em sua presença, pode formar superóxido e regenerar a molécula de DOX (MINOTTI et al., 2004). Através desse mecanismo redox, pequenas quantidades de DOX podem formar grandes quantidades de superóxido (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010). Em reação catalisada por enzimas superóxido dismutases (SOD), o superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, ou pode ainda reagir com o óxido nítrico (NO) formando peroxinitrito, um oxidante altamente citotóxico (MUKHOPADHYAY et al., 2009; PACHER et al., 2003). Ozben (2007) refere que a DOX é um agente antitumoral que gera grandes quantidades de ROS corroborando observações feitas desde o início da utilização do quimioterápico na clínica médica até trabalhos mais recentes como o de Li e colaboradores (2015) que observaram elevação na concentração de superóxido e peroxinitrito em células cardíacas H9c2 tratadas com DOX.

Além do dano celular induzido diretamente pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio formadas com a redução do anel quinona da DOX, seu ciclo redox pode promover liberação de ferro da ferritina, um dos principais estoques de ferro da célula. O aumento de ferro livre favorece a formação de complexos DOX-ferro que contribuem para a conversão de superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais hidroxil que podem reagir com proteínas, ácidos nucleicos e lipídios, iniciar peroxidação lipídica e promover oxidação do DNA causando dano às células expostas (COSTA et al., 2013; MINOTTI et al., 2004; VINCENT et al., 2013).

A degradação de ROS é realizada por enzimas antioxidantes endógenas como a superóxido dismutase, glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase e por antioxidantes não enzimáticos como glutathiona (GSH), ácido ascórbico, carotenoides, dentre outros (BOLISSETTY; JAIMES, 2013). Em condições fisiológicas há um equilíbrio entre a síntese e eliminação de ROS, mas o aumento na produção de ROS, a redução da capacidade antioxidante, ou a combinação de ambos, resulta em estresse oxidativo que tem um papel importante na patogênese da cardiotoxicidade induzida pela DOX (GU et al., 2015; KLAUNIG et al., 2011).

Considerando os dois mecanismos relacionados à indução de cardiotoxicidade pela DOX, a produção de ROS e de DOXol, Menna e colaboradores (2007) propõem que a elevada reatividade de ROS atuando em constituintes celulares pode induzir disfunções que resultam em cardiotoxicidade aguda,

enquanto a formação de DOXol pode culminar com o desenvolvimento de cardiotoxicidade crônica.

## **1.2 Cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina**

A cardiotoxicidade é um dos eventos adversos mais graves e de grande importância na sobrevivência de pacientes submetidos ao tratamento com antraciclinas, podendo desenvolver-se de forma aguda ou crônica. Muitos fatores de risco podem predispor um paciente a cardiotoxicidade, a exemplo da dose cumulativa total do quimioterápico que é administrada, via e frequência com que são realizadas as infusões, histórico de problema cardiovascular pré-existente, dentre outros (PAI; NAHATA, 2000).

A cardiotoxicidade aguda ocorre durante a administração da antraciclina ou imediatamente depois da infusão, e tipicamente envolve vasodilatação, hipotensão e distúrbios cardíacos transitórios (FERRANS et al., 1997). De maneira geral, esse tipo de cardiotoxicidade não representa um motivo justificável para a retirada do quimioterápico dos regimes de tratamento antitumoral (ZUCCHI; DANESI, 2003).

Outras três formas de manifestação da cardiotoxicidade crônica induzida por antraciclinas são referidas por Simunek e colaboradores (2009): a cardiotoxicidade subcrônica, crônica clássica e crônica de início tardio. A cardiotoxicidade subcrônica é incomum e caracterizada pela ocorrência de pericardite ou miocardite dentro de um a três dias após o tratamento (HALE; LEWIS, 1994). A cardiotoxicidade crônica clássica, por sua vez, ocorre mais tarde no decorrer do tratamento ou entre semanas e meses após o fim da quimioterapia. Caracteriza-se pelo desenvolvimento de cardiomiopatia dilatada, com posterior disfunção contrátil ventricular e insuficiência cardíaca congestiva (LIPSHULTZ et al., 2005; YU et al., 2014). Além disso, distensão do retículo sarcoplasmático dos cardiomiócitos, vacuolização citoplasmática, alterações mitocondriais e desestruturação e perda de miofibrilas são as alterações histopatológicas mais frequentemente observadas (DHINGRA et al., 2014; THOMPSON et al., 2010). Por fim, é referida a cardiotoxicidade crônica de início tardio que pode se manifestar até décadas após o fim do tratamento e foi descrita a partir do acompanhamento de pacientes que sobreviveram ao tratamento quimioterápico na infância (LIPSHULTZ et al., 1991; SCULLY; LIPSHULTZ, 2007).

Um dos primeiros registros de cardiotoxicidade induzida por antraciclinas foi efetuado por Lefrak e colaboradores (1973). Avaliando o padrão de dose dependência da cardiotoxicidade crônica induzida pelo tratamento com diferentes doses cumulativas de DOX os autores observaram o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva em aproximadamente 4%, 18% e 36% dos pacientes que receberam doses cumulativas de DOX de 500 a 550 mg/m<sup>2</sup>, 551 a 600 mg/m<sup>2</sup> e acima de 601 mg/m<sup>2</sup>, respectivamente. Resultado similar também foi obtido por Hoff e colaboradores (1979) que observaram o desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva em 7% dos pacientes tratados com doses superiores a 550 mg/m<sup>2</sup> de DOX.

Tem sido referido na literatura que a toxicidade cardíaca induzida pela DOX está associada ao aumento da concentração intracelular de cálcio e promoção de redução na velocidade de contração e relaxamento do músculo cardíaco (TURDI et al., 2008). Associação entre a redução do débito cardíaco em animais experimentais tratados com DOX e menor expressão de mRNA para muitas proteínas transportadoras de cálcio foi observada por Arai e colaboradores (1998). Adicionalmente, Wang e Korth (1995) constataram que o aumento da concentração citoplasmática de cálcio observado pouco tempo depois da administração de antraciclinas é consistente com o padrão hiperkinético apresentado nos exames ecocardiográficos dos pacientes durante a infusão do quimioterápico. Considerando a importância do cálcio para a transdução de sinal e regulação de reações intracelulares, a interferência da DOX em sua homeostase pode resultar em dano tecidual, morte celular e, conseqüentemente, promoção de disfunção cardíaca (FINSTERER; OHNSORGE, 2013).

Existem muitos estudos avaliando os mecanismos pelos quais a DOX causa cardiotoxicidade e o estresse oxidativo é o mecanismo mais referido como relacionado a esse efeito colateral do quimioterápico. A susceptibilidade particular do miocárdio às antraciclinas deve-se, entre outras razões, ao seu metabolismo oxidativo elevado, à grande quantidade de mitocôndrias, nas quais ocorre acúmulo de DOX e conseqüente produção de espécies reativas de oxigênio, e à presença de concentrações reduzidas de enzimas antioxidantes como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase nos cardiomiócitos (ABDELLA; FISHER, 1985; COSTA et al., 2013).

O coração é um órgão cujas funções mecânicas e eletrofisiológicas requerem fornecimento eficiente de energia para atender às demandas do corpo. Essa energia é obtida por processos que envolvem mecanismos redox resultando na formação de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que são moléculas redox consideradas de grande relevância biológica. Em concentrações endógenas basais, ROS e RNS atuam sobre alvos celulares específicos que contribuem para o desempenho ideal do coração. Entretanto, em concentrações elevadas, essas espécies podem afetar lipídios e proteínas comprometendo a função de enzimas e resultando em dano cardíaco (COSTA et al., 2011; ZIMA; BLATTER, 2006).

Dentro das células cardíacas, as espécies reativas são produzidas em múltiplos compartimentos, entretanto a cadeia respiratória mitocondrial é considerada a principal fonte de ROS dentro da célula (ROSS et al., 2005). O coração apresenta uma densidade elevada de mitocôndrias, que chegam a ocupar aproximadamente 45% do volume do miocárdio e são responsáveis pelo metabolismo de cerca de 90% do oxigênio tecidual, demonstrando que a função cardíaca é extremamente dependente da energia gerada na mitocôndria e que essa organela assume um importante papel na sinalização redox do órgão (SPEDDING et al., 1999; VLACHANTONI et al., 2011). Os dados obtidos por Mukhopadhyay e colaboradores (2009), tanto *in vitro* quanto *in vivo*, indicam que as mitocôndrias são a principal fonte de geração de superóxido após a exposição à DOX. Shan e colaboradores (1996) reportaram que a ocorrência de dano mitocondrial em animais pode ser observada poucas horas após a administração intravenosa de DOX.

A afinidade da DOX pela cardiolipina, um fosfolípido presente na membrana interna de mitocôndrias e altamente abundante nessas organelas, foi uma descoberta que contribuiu significativamente para o entendimento acerca da disfunção mitocondrial induzida por antraciclinas (MARCILLAT et al., 1989). Essa afinidade é considerada uma das principais razões para o acúmulo de antraciclinas no coração, uma vez que a concentração de DOX na mitocôndria pode ser de 10 a 500 vezes maior do que sua concentração em outros compartimentos celulares (COSTA et al., 2013). O acúmulo de DOX no interior da mitocôndria pode causar mudanças ultraestruturais e alterar a função mitocondrial (DANZ et al., 2009). É referido na literatura que ROS mitocondrial oxida a cardiolipina e que esse processo parece ser essencial para a permeabilização da membrana mitocondrial e liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol (KAGAN et al., 2009; PANCHUK et al., 2015).

Li e colaboradores (2015) ao avaliarem o aparecimento dos primeiros sinais de apoptose em células H9c2 tratadas com DOX observaram rápida liberação de citocromo c mitocondrial no citosol indicando que a cardiolipina pode ter um papel importante na regulação do início de apoptose das células expostas à DOX. Confirmando essas observações, Wang e colaboradores (2013) demonstraram que a prevenção da peroxidação da cardiolipina inibiu a apoptose.

Além da ação direta da DOX sobre a cardiolipina, seu acúmulo no interior da mitocôndria pode afetar a cadeia respiratória, reduzindo a produção de energia, oxidar o DNA mitocondrial e alterar o potencial da membrana mitocondrial, contribuindo significativamente para o aumento da disfunção mitocondrial (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010; MEYER et al., 2013). Investigação proteômica sobre a cardiotoxicidade crônica induzida por antraciclinas revelou que essa classe de quimioterápicos geralmente causa alterações em proteínas importantes para a fosforilação oxidativa, defesa antioxidante ou para o estresse oxidativo (ŠTĚRBA et al., 2011).

A hipótese do dano oxidativo como principal mecanismo de ação relacionado à cardiotoxicidade é sustentada tanto pelas mudanças ultraestruturais induzidas por antraciclinas no coração de animais experimentais envolverem as mitocôndrias, quanto pela reduzida capacidade antioxidante apresentada pelos cardiomiócitos (OLSON; MUSHLIN, 1990). Dessa forma, o acúmulo de DOX na mitocôndria associado ao aumento da produção de ROS torna os cardiomiócitos mais vulneráveis à toxicidade da DOX.

Considerando que as ROS atuam como mediadoras chave nos modelos de cardiotoxicidade, os mecanismos de defesa antioxidante assumem grande importância na manutenção da função celular normal (LI et al., 2015), principalmente devido ao limitado sistema de defesa antioxidante apresentado pelo coração. Já foi reportado que o músculo cardíaco apresenta 150 vezes menos catalase e quatro vezes menos SOD do que o fígado (DOROSHOW et al., 1980).

O sistema glutaciona, incluindo principalmente a GSH-Px, e as enzimas SOD e catalase, constituem os componentes chave de defesa celular contra o dano oxidativo, pois estão envolvidas na manutenção de concentrações reduzidas de superóxido e peróxido de hidrogênio que, conseqüentemente, reduzem a formação de outras espécies potencialmente mais danosas como o peroxinitrito e radicais hidroxil (DOROSHOW et al., 1980). A glutaciona intracelular cardíaca pode eliminar

ROS direta ou indiretamente através de reação catalisada pela GSH-Px (GRIFFITH, 1999; OSMAN et al., 2009). Sayed-Ahmed e colaboradores (2001) demonstraram que a DOX reduz glutathiona, aumenta a peroxidação lipídica e reduz a função respiratória em mitocôndrias de ratos. Catalase e glutathiona peroxidase estão envolvidas na eliminação de peróxido de hidrogênio e já foi demonstrado que a DOX induz tanto a redução da atividade quanto a expressão de mRNA da catalase e GSH-Px (HASSAN et al., 2014), reduzindo a capacidade antioxidante cardíaca e aumentando a susceptibilidade do órgão ao estresse oxidativo.

Cerca de 70% da atividade total de SOD do coração e até 90% da atividade de SOD nos miócitos cardíacos é realizada pela superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), presente na mitocôndria, e que atua no controle da quantidade de superóxido mitocondrial formado durante a fosforilação oxidativa (IKEGAMI et al., 2002). Muitos estudos têm reportado redução significativa da atividade da MnSOD em animais tratados com DOX (SINGH et al., 2008; SU et al., 2014). Li e colaboradores (2002) não observaram alteração significativa na expressão de mRNA para a MnSOD no miocárdio de ratos tratados com DOX, mas a concentração dessa proteína no tecido foi significativamente reduzida. Além disso, também reportaram que a DOX reduz a concentração e atividade de superóxido dismutase dependente de cobre e zinco (CuZnSOD) que é a forma primariamente citosólica da SOD.

Tecidos com menor desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, como o coração, são mais susceptíveis a qualquer mudança associada a estresse oxidativo e, portanto, ao dano por radicais de oxigênio induzidos por antraciclinas (TABACZAR et al., 2015; WALLACE, 2003).

### **1.3 Redução da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina**

Um dos principais desafios da terapia contra o câncer é reduzir o desenvolvimento de efeitos colaterais causados pela quimioterapia sem interferir em sua atividade antitumoral. É referido na literatura que a administração de DOX pode causar reações adversas variadas, a exemplo de supressão da medula óssea que pode resultar em leucopenia, mucosite e distúrbios gastrointestinais, promovendo náuseas e vômitos, mas a cardiotoxicidade é o evento adverso clinicamente mais

importante (LEFRAK et al., 1973; MONSUEZ et al., 2010; OUTOMURO et al., 2007). A possibilidade da disfunção cardíaca induzida pela DOX resultar em insuficiência cardíaca congestiva tem estimulado a realização de diversos trabalhos há mais de 40 anos. Objetivando principalmente a prevenção ou redução desse evento adverso, bem como o aumento da compreensão acerca dos mecanismos relacionados à indução de cardiotoxicidade pela DOX, muitas tentativas de alteração no tratamento têm sido realizadas.

As tentativas incluem a limitação da dose cumulativa total do quimioterápico aplicada no regime terapêutico (SWAIN et al., 2003; WOUTERS et al., 2005), emprego de formas especiais de administração, com variações na velocidade de infusão e no intervalo entre as infusões (BERRAK et al., 2001), desenvolvimento de novas formulações visando à obtenção de análogos menos cardiotóxicos (CELIK; ARINÇ, 2008), encapsulamento em lipossomas que, em geral, são mais eficazes para o tratamento de tumores sólidos (ALBERTS et al., 2004), co-administração com quelantes de ferro, impedindo a formação dos complexos ferro-antraciclina (VOEST et al., 1994) e uso de antioxidantes (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010; VINCENT et al., 2013). Além disso, a triagem dos fatores de risco e monitoramento dos sinais e sintomas durante e após a quimioterapia com a realização de eletrocardiograma, ecocardiografia e mensuração dos marcadores bioquímicos de dano cardíaco são ações extremamente importantes (SIMBRE et al., 2005).

Muitos antioxidantes têm sido testados quanto a sua capacidade de prevenir ou reduzir a cardiotoxicidade causada pela DOX, sendo resultados positivos e negativos relatados (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010). O foco empregado em muitas estratégias protetoras está na administração de substâncias que aumentem as defesas antioxidantes dos cardiomiócitos contra ROS induzidas pela DOX (MINOTTI et al., 2004). Essa abordagem é fortalecida por estudos demonstrando reduzida cardiotoxicidade aguda ou crônica em camundongos superexpressando enzimas antioxidantes (YEN et al., 1996) ou pela aplicação direta de substâncias antioxidantes (SINGAL et al., 2000).

Resultados promissores de proteção cardíaca conferida por vitamina E e N-acetilcisteína (NAC), por exemplo, foram obtidos em camundongos e ratos tratados com DOX. Entretanto, a eficácia cardioprotetora não foi observada em outros animais de maior porte, como cachorros, e nem reproduzida em estudos clínicos avaliando o desenvolvimento de cardiomiopatia em pacientes tratados com doses

cumulativas de antraciclina (LADAS et al., 2004; MIRANDA-VILELA et al., 2014). Redução da cardiotoxicidade e hepatotoxicidade por carotenoides sem afetar a atividade antitumoral da DOX foi observada por Nair e colaboradores (2014), que verificaram prevenção da depleção de antioxidantes, prevenção de dano tecidual e redução das alterações histológicas no tecido cardíaco e hepático, sem interferir nas alterações induzidas pela DOX no tecido tumoral. Em trabalho avaliando a possível ação cardioprotetora da vitamina C, Heaney e colaboradores (2008) sugerem que, apesar da suplementação reduzir os efeitos gerados por ROS por preservar o potencial de membrana mitocondrial, a suplementação antioxidante também pode afetar a resposta terapêutica durante o tratamento antitumoral.

Devido à quantidade limitada de estudos clínicos avaliando o efeito de antioxidantes na modulação do tratamento de câncer e a ausência de ensaios controlados que comprovem a eficácia e aplicabilidade do uso de antioxidantes durante a quimioterapia (MOSS, 2006), muitos oncologistas postulam que a suplementação antioxidante deve ser evitada durante o tratamento convencional pela possibilidade de interferência na atividade antitumoral do quimioterápico (AKBAS et al., 2006).

Apesar do constante esforço de muitos grupos de pesquisa na busca por formas efetivas de reduzir a cardiotoxicidade das antraciclina, apenas uma substância tem sido liberada para uso na clínica como adjuvante cardioprotetor para a quimioterapia com DOX, o dexrazoxano (DZR). Imondi e colaboradores (1996) demonstraram que a injeção intraperitoneal de DZR trinta minutos antes do tratamento com DOX reduz a cardiotoxicidade em ratos, camundongos e cães, entretanto, o tratamento não protege completamente o coração. Esse quelante de ferro também é referido na literatura por prevenir lesões histológicas e disfunção contrátil induzida por antraciclina em animais experimentais e ensaios com coração isolado, sem interferir na distribuição, metabolismo ou eliminação da DOX demonstrando, dessa forma, que parece não afetar a atividade antitumoral (HASINOFF; HERMAN, 2007).

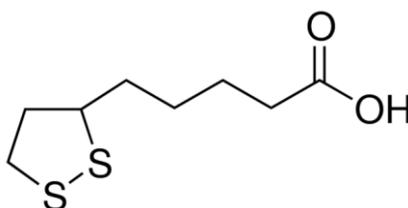
A Sociedade Americana de Oncologia Clínica, entretanto, só recomenda o uso do dexrazoxano em situações que requeiram a utilização de doses cumulativas de DOX superiores a 300 mg/m<sup>2</sup> (HENSLEY et al., 2009). Nesses casos, é recomendado o uso de uma dose 10 vezes maior de DZR em relação à dose de DOX. A restrição de uso do DZR foi baseada em ensaios clínicos que reportaram

casos de leucemia mieloide aguda e síndrome mielodisplásica em crianças tratadas com quimioterápicos associados ao cardioprotetor, e possível indução de leucopenia (TEBBI et al., 2007), além de existirem relatos de possível interferência do DZR na atividade antitumoral da DOX (DALEN et al., 2008).

### 1.3.1 Ácido lipoico e Mito-TEMPO como cardioprotetores

Moléculas e enzimas antioxidantes podem limitar o dano oxidativo, entretanto, muitas delas não são rapidamente internalizadas nas células do miocárdio ou não atingem os compartimentos corretos para exercer seu efeito protetor (DERES et al., 2005). Dessa forma, a utilização de antioxidantes que atravessem facilmente barreiras biológicas e/ou que sejam mais específicos ou direcionados para a mitocôndria pode ser uma estratégia mais promissora para reduzir a cardiotoxicidade induzida pela DOX.

Considerado um antioxidante multifuncional, o ácido lipoico (AL, Figura 2) é encontrado em tecidos ricos em mitocôndria, a exemplo do coração e músculo (UNAL et al., 2013), ou obtido da dieta através de suplementos alimentares ou drogas quimicamente sintetizadas (LEE et al., 2010). Está envolvido em muitos complexos enzimáticos que produzem energia (SHAY et al., 2009), regenera outros antioxidantes diretamente, a exemplo da vitamina C, ou indiretamente, como ocorre com a vitamina E (EVANS; GOLDFINE, 2000), pode eliminar radicais livres (XU et al., 2013), reparar o dano oxidativo celular e prevenir a peroxidação lipídica (PEDERZOLLI et al., 2010), tem habilidade em quelar metais (OU et al., 1995; TOKLU et al., 2010) e aumentar a concentração intracelular de glutathione (LAL et al., 2008).



**Figura 2. Estrutura química do ácido lipoico (AL, C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>S<sub>2</sub>).** Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

Além de atuar como potente antioxidante em sua forma natural, o AL pode ser reduzido pela lipoamida desidrogenase, que só é encontrada em mitocôndrias, e formar o ácido dihidrolipoico (DHLLA) que também tem sido reportado na literatura por exercer efeito citoprotetor frente ao dano induzido por radicais livres (BOLOGNESI et al., 2014; SHAY et al., 2009). A propriedade do AL como potente antioxidante foi demonstrada *in vitro*, em culturas de fibroblastos humanos expostos a excesso de ferro (LAL et al., 2008) e linfócitos humanos de sangue periférico expostos ao estresse oxidativo e apoptose induzidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (RAHIMIFARD et al., 2015).

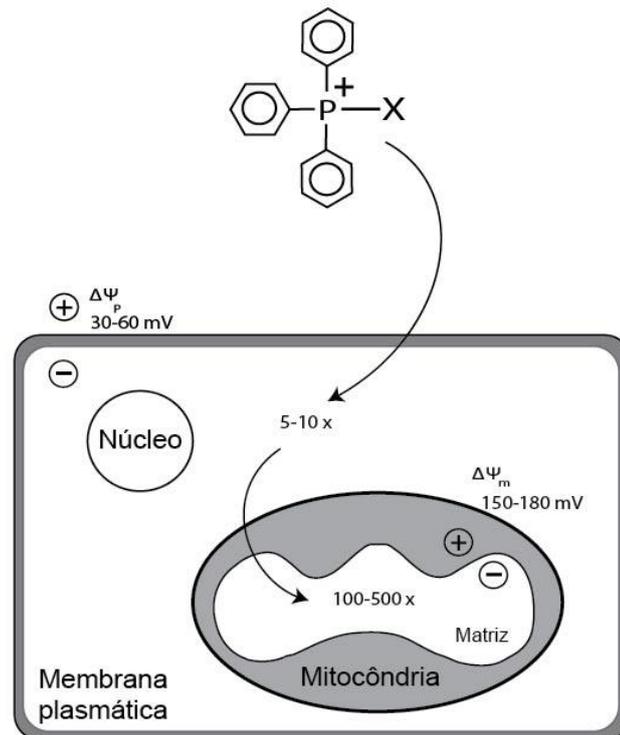
Seu efeito cardioprotetor em diferentes modelos de disfunção cardíaca também é referido na literatura. Avaliando o efeito cardioprotetor do AL frente à toxicidade induzida por cisplatina, Hussein e colaboradores (2012) observaram que o pré-tratamento de ratos com AL promoveu redução significativa na concentração sérica de lactato desidrogenase (LDH) e creatina quinase (CK), redução da peroxidação lipídica e aumento de enzimas antioxidantes no tecido cardíaco. Da mesma forma, Deng e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de AL reduziu significativamente a liberação de LDH e CK, a extensão de infarto do miocárdio e a apoptose de cardiomiócitos em ratos submetidos ao protocolo experimental de isquemia e reperfusão.

O efeito do AL sobre a toxicidade cardíaca induzida pela DOX também já foi avaliado em alguns estudos, principalmente utilizando ratos submetidos ao protocolo crônico de indução de cardiotoxicidade pela DOX, mas os resultados são controversos. Efeito cardioprotetor conferido pelo pré-tratamento com AL foi obtido por Balachandar e colaboradores (2003). A proteção foi representada pela redução significativa das concentrações séricas de CK e LDH, redução da peroxidação lipídica, bem como manutenção das concentrações das enzimas antioxidantes catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, normalmente reduzidas pela DOX, no tecido cardíaco. Avaliando o efeito preventivo e curativo do AL sobre a cardiotoxicidade induzida pela DOX, Ayaz e colaboradores (2005) também observaram que o pré-tratamento com AL reduziu a depleção de glutathiona e a peroxidação lipídica. O pós-tratamento com AL, por sua vez, apenas reduziu a peroxidação lipídica, não sendo capaz de aumentar as concentrações de glutathiona. Ausência de cardioproteção foi referida por Ghibu e colaboradores (2012) que

constatarem que o tratamento de ratos com AL e DOX não melhorou as alterações funcionais cardíacas associadas ao estresse oxidativo cardíaco e plasmático em comparação aos animais tratados apenas com DOX.

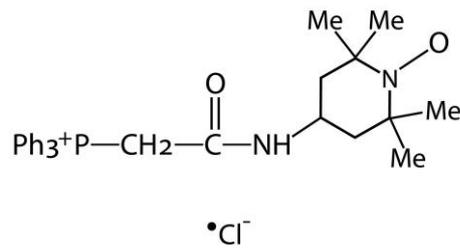
O AL é clinicamente aprovado para uso na terapia em seres humanos sendo empregado para melhorar doenças associadas a estresse oxidativo, a exemplo de doenças hepáticas (PACKER et al., 1995) e neuropatia diabética (COLEMAN et al., 2001). Por ser uma substância de baixo peso molecular e apresentar solubilidade em meio aquoso e lipídico, o AL pode alcançar uma biodistribuição diversa, tanto intracelular quanto extracelular, e essa característica constitui-se em mais uma vantagem para a sua utilização como substância possivelmente cardioprotetora (DENG et al., 2013).

Antioxidantes conjugados ao trifetilfosfônio (TEP), um cátion lipofílico, têm sido alvo de estudo por sua capacidade de se acumular em mitocôndrias reduzindo a disfunção mitocondrial induzida por estresse oxidativo. O TEP foi inicialmente utilizado para o estudo da biologia mitocondrial (LIBERMAN et al., 1969) e, desde então, essa molécula se tornou uma importante ferramenta para mensurar o potencial de membrana mitocondrial, compor sondas para avaliação do estresse oxidativo mitocondrial e direcionar substâncias potencialmente protetoras para as mitocôndrias. A ligação de um antioxidante ao TEP pode resultar em seu acúmulo na mitocôndria em proporções cerca de cem vezes maiores do que a apresentada pelo meio intracelular e por outras organelas. Esse direcionamento é facilitado pelo potencial extremamente negativo apresentado pela membrana interna mitocondrial que favorece o acúmulo seletivo de TEP no interior das mitocôndrias (Figura 3) podendo bloquear o dano oxidativo mitocondrial de forma mais efetiva do que a utilização de antioxidantes não direcionados (DIKALOVA et al., 2015; KELSO et al., 2002; MURPHY; SMITH, 2007; ROSS et al., 2005). A utilidade do TEP em terapias de proteção mitocondrial é sustentada por achados de que sua administração oral leva ao acúmulo do componente no coração, cérebro e músculo que são tecidos muito afetados pelo dano oxidativo mitocondrial (SMITH et al., 2003).



**Figura 3. Captação de componente direcionado para a mitocôndria.** A ligação de um componente X ao cátion trifenílfosfônio leva ao direcionamento do componente para o citoplasma, favorecido pelo potencial da membrana plasmática e, posteriormente, para o interior da mitocôndria, favorecido pelo potencial de membrana mitocondrial. Adaptado de Ross e colaboradores (2005).

Estudos mais recentes têm demonstrado o efeito protetor do Mito-TEMPO (Mito-T, Figura 4), composto formado pelo nitróxido tempol conjugado ao TPP, frente ao dano oxidativo em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*. Nitróxidos são reportados na literatura como substâncias capazes de atuar de maneira semelhante à SOD (KRISHNA et al., 1996). Devido à característica de não serem consumidos nas reações de dismutação de superóxido e por apresentarem baixa toxicidade, são considerados bons candidatos como antioxidantes a serem conjugados ao TPP (NAMIECINSKI et al., 2004; SOULE et al., 2007). O Mito-T, além de ser mais facilmente direcionado para as mitocôndrias por conter TPP, tem a vantagem de ser rapidamente captado e reciclado pela cadeia respiratória mitocondrial (TRNKA et al., 2009) podendo, dessa forma, ser eficaz em exercer efeito protetor em órgãos ricos em mitocôndrias, a exemplo do coração (ŠIMŮNEK et al., 2009).



**Figura 4. Estrutura química do Mito-TEMPO (Mito-T,  $\text{C}_{29}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_2\text{P}\cdot\text{Cl}$ ).** Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>

Já foi demonstrado que o Mito-T reduz a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por isoproterenol em cardiomiócitos de coelhos (BOVO et al., 2012) e inibe a apoptose de plaquetas induzida por hipertermia (WANG, Z. et al., 2013). Patil e colaboradores (2014) observaram redução da produção de superóxido, restauração da atividade da MnSOD, melhoria da microcirculação renal e aumento da taxa de sobrevivência de camundongos tratados com Mito-T em um modelo murino de sepse. Efeito benéfico sobre parâmetros relacionados a resposta inflamatória induzida por  $\text{TNF-}\alpha$  também foi referido por Pan e colaboradores (2015) que obtiveram redução da produção de ROS mitocondrial e da expressão de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo de IL-6 e  $\text{TNF-}\alpha$ , em células cardíacas H9c2 pré-tratadas com Mito-T.

Há poucos trabalhos avaliando o efeito do Mito-T sobre a toxicidade induzida pela DOX e o conhecimento é ainda mais limitado em relação ao efeito cardioprotetor. Wang e colaboradores (2015) observaram que o Mito-T bloqueou a produção de ROS intracelular e mitocondrial, reduziu a apoptose e inibiu a peroxidação de cardioplipina de plaquetas expostas a DOX. Avaliando a atividade antitumoral e cardiotóxica da DOX em ratos com tumor de mama e o efeito cardioprotetor do Mito-T, Dickey e colaboradores (2013) verificaram que a administração de Mito-T sozinho, na maior dose avaliada no estudo, resultou em aumento de marcadores de apoptose, a exemplo da atividade de caspase-3, entretanto, nos animais tratados com Mito-T e DOX a atividade de caspase-3 no tecido cardíaco foi menor do que a apresentada pelos animais tratados apenas com DOX. A avaliação histológica e análises por microscopia eletrônica de transmissão do tecido cardíaco revelaram cardioproteção, mas a avaliação de outros parâmetros, a exemplo da oxidação de DNA e proteínas não forneceu resultados conclusivos.

Um dos objetivos deste trabalho é verificar se o pré-tratamento com AL ou Mito-T é capaz de conferir cardioproteção em camundongos com melanoma submetidos ao tratamento quimioterápico com DOX. Este projeto pode contribuir para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos visando, sobretudo, a redução da cardiotoxicidade induzida pela DOX durante o tratamento quimioterápico para o controle de neoplasias. Isso teria um grande impacto na saúde e qualidade de vida da população brasileira e mundial, tendo em vista o crescente aumento da expectativa de vida do ser humano, o conseqüente aumento da incidência de neoplasias e a necessidade de utilização de quimioterápicos para o seu controle.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Avaliar o efeito cardioprotetor do Mito-TEMPO e do ácido lipoico e suas interferências na atividade antineoplásica da DOX.

### **2.2 Específicos**

Avaliar, *in vitro*, se o Mito-TEMPO e o ácido lipoico são capazes de proteger células cardíacas da ação tóxica da DOX;

Avaliar o efeito cardioprotetor do Mito-TEMPO e do ácido lipoico em camundongos tratados com DOX;

Avaliar a interferência do Mito-TEMPO e do ácido lipoico na atividade antineoplásica da DOX em camundongos com melanoma.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Células

Células de melanoma B16F10 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI - FIOCRUZ, Salvador, BA) e células de origem cardíaca H9c2 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ). Ambas foram mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Patologia e Biointervenção (LPBI – FIOCRUZ, Salvador, BA). Após descongeladas, as células foram mantidas em garrafas para cultura de células com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para B16F10, ou DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para H9c2. Os meios foram suplementados com soro fetal bovino (SBF - Cripion, Andradina, SP) a 10%, L-glutamina a 2 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ácido pirúvico a 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), HEPES a 10 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), gentamicina a 50 µg/mL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e bicarbonato de sódio a 0,2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), pH 7,4 (meio completo) e incubadas a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Quando as culturas atingiram confluência, o meio foi retirado e as células lavadas três vezes com solução de cloreto de sódio a 0,9% (Salina - Farmace, Barbalha, CE). As células foram retiradas do fundo da garrafa por incubação com solução de tripsina-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 0,1% (B16F10) ou 0,05% (H9c2) por 5 minutos a 37°C. O bloqueio da ação enzimática foi efetuado com a adição de meio completo e, após coletadas, as células foram centrifugadas a 300 G por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em meio completo, para posterior plaqueamento em placas de 96 ou 24 poços (H9c2) ou em solução salina para serem injetadas em camundongos (B16F10).

Células B16F10 foram utilizadas para o estabelecimento do modelo experimental de melanoma localizado em camundongos da linhagem C57BL/6. Apesar de serem mais comumente empregadas em modelo experimental de metástase pulmonar, essas células também são capazes de formar tumor localizado quando injetadas pela via subcutânea (DAI et al., 2012; SHI et al., 2014).

As células H9c2 foram utilizadas para os estudos *in vitro* de avaliação da cardiotoxicidade induzida pela DOX e da possível cardioproteção promovida pelos antioxidantes. São células derivadas do tecido ventricular de embriões de ratos e, apesar de não apresentarem a capacidade de contração espontânea, ainda mantém similaridades com culturas primárias de cardiomiócitos (WATKINS et al., 2011). Diante disso, essas células são um bom modelo para avaliação de dano e/ou proteção cardíaca (HESCHELER et al., 1991; MERTEN et al., 2006).

### **3.2 Animais**

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM - Fiocruz, Salvador, BA), sob o protocolo CEUA L-019/2012.

Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos (machos ou fêmeas) da linhagem C57BL/6 (*Mus musculus*), com idade entre seis e 10 semanas, fornecidos pelo biotério do CPqGM. Os animais foram mantidos em minisoladores com ciclo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , sem restrição hídrica ou alimentar e divididos randomicamente em grupos de seis a oito animais do mesmo sexo.

### **3.3 Ensaio do DPPH para avaliação comparativa da atividade antioxidante do Mito-T e AL**

Para avaliar comparativamente a atividade antioxidante (AA) do Mito-T e do AL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), foi utilizado o método colorimétrico do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) segundo Huang e colaboradores (2005). Este método permite verificar a capacidade de substâncias em inibir a formação de radicais livres e foi escolhido pelo DPPH ser um dos poucos radicais estáveis disponíveis comercialmente para esse tipo de avaliação. O DPPH é um radical estável em solução alcoólica e que apresenta cor violeta. Na presença de molécula com atividade antioxidante, o radical é reduzido e ocorre a descoloração da solução metanólica de DPPH, que muda para a cor

amarela. Essa reação pode ser monitorada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

Foram avaliadas cinco concentrações dos dois antioxidantes (25 a 400  $\mu\text{M}$ ), em diluição seriada na proporção 1:2, e o hidroxitolueno butilado (BHT - Cromoline Química Fina, Diadema, SP), substância com propriedade antioxidante reconhecida, foi utilizado como padrão do ensaio nas mesmas concentrações do Mito-T e AL. Um volume de 180  $\mu\text{L}$  de amostra, em cada uma das concentrações, foi misturado a 60  $\mu\text{L}$  de solução de DPPH a 0,004% em metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e foram realizadas leituras em espectrofotômetro de placa (SpectraMax 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) no comprimento de onda de 517 nm após 30, 60 e 90 minutos de incubação a temperatura ambiente. A mistura de 180  $\mu\text{L}$  de cada amostra com 60  $\mu\text{L}$  de metanol foi utilizada como branco e a mistura de 180  $\mu\text{L}$  de metanol com 60  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH a 0,004% foi utilizada como controle do ensaio realizado em triplicata.

O cálculo do percentual de atividade antioxidante (AA%) de cada substância foi determinado com base na seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \left[ \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{controle}} \times 100 \right]$$

Onde:

Abs branco = Absorbância da substância sem DPPH

Abs controle = Absorbância do metanol com DPPH

### 3.4 Ensaio do Alamar Blue para avaliação da viabilidade de células H9c2

A viabilidade das células cardíacas H9c2 foi determinada utilizando o Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) que é uma solução que contém um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedade redox e possibilita a mensuração quantitativa da viabilidade de células em cultura (NAKAYAMA et al., 1997). Este indicador é a resaziruna que em sua forma oxidada apresenta cor azul (indicando células não viáveis), mas na presença de células em proliferação esse indicador é reduzido e apresenta cor rósea (indicando células viáveis). A variação na conversão da forma oxidada para a forma reduzida, que é um indicador de viabilidade celular, pode ser mensurada pela quantificação da densidade óptica em espectrofotômetro.

Células H9c2 foram plaqueadas em placas para cultura de células de 96 poços na concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço, em triplicatas ou quadruplicatas, e após os diferentes tratamentos com os antioxidantes e/ou DOX (Glenmark Farmacêutica Ltda, São Paulo, SP), conforme descrito a seguir, o meio de cultura foi substituído por meio contendo 10% de Alamar Blue. Após seis horas de incubação, realizou-se a leitura da densidade óptica dos poços em espectrofotômetro de placa nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 600 nm (oxidado). O meio de cultura puro, sem adição de células, foi considerado como branco do ensaio e o meio contendo 10% de Alamar Blue foi o controle negativo.

O percentual de redução do Alamar Blue em cada poço da cultura foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Percentual reduzido} = \frac{(\epsilon_{\text{OX}})\lambda_2 A\lambda_1 - (\epsilon_{\text{OX}})\lambda_1 A\lambda_2}{(\epsilon_{\text{RED}})\lambda_1 A'\lambda_2 - (\epsilon_{\text{RED}})\lambda_2 A'\lambda_1} \times 100$$

Onde:

$\lambda_1 = 570$  nm e  $\lambda_2 = 600$  nm

$(\epsilon_{\text{ox}})\lambda_2 = 117,216$  e  $(\epsilon_{\text{ox}})\lambda_1 = 80,586$

$(\epsilon_{\text{red}})\lambda_1 = 155,677$  e  $(\epsilon_{\text{red}})\lambda_2 = 14,652$

$A\lambda_1$  = absorvância do poço teste (570 nm)

$A\lambda_2$  = absorvância do poço teste (600 nm)

$A'\lambda_2$  = absorvância do controle negativo (600 nm)

$A'\lambda_1$  = absorvância do controle negativo (570 nm)

O percentual de redução do Alamar Blue nos poços contendo células que não receberam tratamento foi considerado como 100% de viabilidade e a viabilidade dos demais poços foi representada como percentual em relação ao controle utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade em relação ao controle (\%)} = (\% \text{ teste} / \% \text{ controle}) \times 100$$

Onde:

% teste = percentual de redução do Alamar Blue nos poços tratados

% controle = percentual de redução do Alamar Blue nos poços sem tratamento

A determinação da concentração inibitória média capaz de promover redução de 50% na viabilidade ( $CI_{50}$ ), e seu respectivo intervalo de confiança (IC) de 95%, foi realizada a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

### 3.4.1 Curva concentração-resposta das células cardíacas H9c2 ao tratamento com DOX, Mito-T e AL

Para avaliar a citotoxicidade da DOX sobre a viabilidade de células cardíacas,  $2 \times 10^4$  células H9c2 foram plaqueadas, em triplicatas ou quadruplicatas, em placas para cultura de células de 96 poços. Após 24 horas de cultivo, as células foram incubadas com diferentes concentrações de DOX, diluídas na proporção 1:2 (1 a 512  $\mu\text{M}$ ), por 24 horas. Em seguida, a DOX foi retirada e foi acrescentado meio completo aos poços. A avaliação da viabilidade foi realizada 48 horas pós-DOX pelo ensaio do Alamar Blue.

O possível efeito tóxico dos antioxidantes, Mito-T e AL, sobre a viabilidade das células cardíacas também foi avaliado. Foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células H9c2, em triplicatas ou quadruplicatas, em placas para cultura de células de 96 poços e, após 24 horas de cultivo, as células foram incubadas com diferentes concentrações dos antioxidantes (25 a 200  $\mu\text{M}$ ) dissolvidos em DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), na proporção 1:2, por 24 horas. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Em seguida, os antioxidantes foram retirados e foi acrescentado meio completo aos poços. A avaliação da viabilidade foi realizada 72 horas após a administração dos antioxidantes pelo ensaio do Alamar Blue.

### 3.4.2 Efeito protetor do Mito-T e AL sobre a viabilidade de células H9c2

O efeito do pré-tratamento de células H9c2 com Mito-T ou AL sobre a viabilidade de tais células ao serem submetidas ao tratamento com DOX foi avaliado utilizando o ensaio do Alamar Blue.

Células H9c2 foram plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço, em triplicatas ou quadruplicatas, em placas para cultura de células de 96 poços e, após 24 horas de cultivo, foram incubadas com diferentes concentrações dos antioxidantes (25 a 1600  $\mu\text{M}$ ) dissolvidos em DMSO na proporção 1:2. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após uma hora, a DOX na concentração de 40  $\mu\text{M}$  foi adicionada aos poços e, após 24 horas, a avaliação da viabilidade foi realizada pelo ensaio do Alamar Blue.

### 3.5 Detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A avaliação de peroxidação lipídica pela detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) tem sido utilizada como um indicador de estresse oxidativo resultante da produção de radicais livres e redução de reservas antioxidantes (SINGAL et al., 2000). Para avaliar a capacidade da DOX em induzir peroxidação lipídica nas células cardíacas H9c2 e em tecido e mitocôndrias cardíacas de camundongos da linhagem C57BL/6, a concentração de malondialdeído (MLDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, foi determinada por TBARS. Uma curva de MLDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluída na proporção 1:2, foi utilizada como padrão, com concentração inicial de 0,78  $\mu\text{M}$  e final de 50  $\mu\text{M}$ .

As amostras (100  $\mu\text{L}$ ) foram incubadas a 90°C por trinta minutos com 185  $\mu\text{L}$  da mistura de ácido acético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído a 50% em água destilada, ácido tiobarbitúrico (Merck KGaA, Darmstadt, HES, Germany) a 1,3% em NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 0,3% e solução salina a 0,15 M tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS), na proporção 1:1,5:1,2. Após o tempo de incubação, os tubos contendo as amostras foram colocados sobre gelo e centrifugados a 1000 G (H9c2) ou 9000 G (tecido e mitocôndrias cardíacas) por 10 minutos a 4°C. A leitura da densidade óptica do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 532 nm.

#### 3.5.1 Peroxidação lipídica em células H9c2 tratadas com DOX

Para avaliar a capacidade da DOX de promover peroxidação lipídica em células cardíacas,  $10^5$  células H9c2 foram plaqueadas por poço, em duplicatas, em placas para cultura de células de 24 poços. Após 24 horas de cultivo, foi feita a incubação com diferentes concentrações de DOX (50 a 400  $\mu\text{M}$ ) por 18 horas. Em seguida, todo o conteúdo do poço (sobrenadante e células) foi coletado. As células foram retiradas do fundo do poço após lavagem com PBS, por duas vezes, e incubação com solução de tripsina-EDTA a 0,05% por 5 minutos a 37°C. O bloqueio da ação enzimática foi efetuado com a adição de meio completo e, após coletadas, as células foram colocadas no mesmo tubo contendo os sobrenadantes previamente

coletados e centrifugados a 300 G por 10 minutos a 4°C por duas vezes. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 200 µL de PBS, 100 µL para a avaliação da peroxidação lipídica por TBARS e 100 µL para a quantificação da concentração de proteína. A peroxidação lipídica foi representada pela concentração de MLDA, em micromolar (µM), por miligrama de proteína.

Para avaliar o possível efeito protetor dos antioxidantes sobre a peroxidação lipídica de células cardíacas tratadas com DOX, células H9c2 foram plaqueadas, conforme descrito acima, e tratadas com 500 ou 1000 µM de Mito-T ou AL uma hora antes do tratamento com DOX na concentração de 400 µM por 18 horas.

### 3.5.2 Peroxidação lipídica de tecido e mitocôndrias cardíacas de camundongos C57BL/6 tratados com DOX

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram submetidos a diferentes protocolos de tratamento com DOX e/ou antioxidantes conforme descrito na seção 3.8. Após a eutanásia, os corações dos camundongos foram retirados e mantidos em solução de Ringer (154 mM de NaCl, 3,4 mM de KCl e 1,7 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0 - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 4°C. Em seguida, os corações foram pesados, fragmentados e lavados duas vezes por centrifugação a 179 G por 2 minutos a 4°C para retirada do excesso de sangue. Aos fragmentos cardíacos foi acrescentado um volume de PBS de forma a manter a relação de 10% peso/volume (100 mg de tecido para cada 1 mL de PBS), os fragmentos foram triturados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Omni Internacional, Kennesaw, GA, EUA) e centrifugados a 1000 G por 5 minutos a 4°C. Uma amostra de 100 µL do sobrenadante foi coletada para a avaliação da peroxidação lipídica do tecido cardíaco e o restante do sobrenadante foi utilizado para obtenção de mitocôndrias cardíacas.

Mitocôndrias cardíacas foram isoladas segundo protocolo descrito por Fernández-Vizarra e colaboradores (2010), com pequenas modificações. Todas as etapas foram realizadas a 4°C. Ao sobrenadante do homogenato cardíaco foram acrescentados 600 µL de tampão de isolamento de mitocôndria [225 mM de manitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 75 mM de sacarose (Sigma-Aldrich, St. Louis,

MO, EUA), 10 mM de Tris-HCl (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ), 1 mM de ácido etilenoglicol tetracético - EGTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 0,1% de albumina sérica bovina - BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)], pH 7,4 e o sedimento bruto rico em mitocôndrias foi obtido por centrifugação a 9000 G por 10 minutos. Foram realizadas mais duas centrifugações a 15000 G por 2 minutos em tampão para isolamento de mitocôndrias e o sedimento foi suspenso em 350  $\mu$ L de PBS, sendo 200  $\mu$ L utilizados para a avaliação da peroxidação lipídica e 100  $\mu$ L para quantificação da concentração de proteínas na amostra.

### **3.6 Quantificação da concentração de proteínas**

A concentração de proteínas nas amostras de células H9c2 e de mitocôndrias cardíacas de camundongos C57BL/6, utilizadas para a detecção de peroxidação lipídica, foi determinada pelo método de Lowry e colaboradores (1951). Uma curva de BSA com concentração inicial de 0,1 mg/mL e final de 6,4 mg/mL, diluída na proporção 1:2, foi utilizada como padrão e PBS foi utilizado como branco do ensaio.

As amostras, em PBS, a curva padrão de BSA e o branco do ensaio (100  $\mu$ L) foram incubados com 1 mL da mistura de reagentes A+B+C [A: 50 mL de carbonato de sódio a 0,125 M com 0,2 g de hidróxido de sódio; B: 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio a 2% em água; C: 0,5 mL de sulfato de cobre a 1% em água (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)] por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L do reagente fenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) diluído em água na proporção 1:1 e os tubos foram mantidos protegidos da luz por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 750 nm.

### **3.7 Determinação quantitativa da atividade da creatina quinase (CK) no soro**

A avaliação da atividade sérica da creatina quinase (CK), dentre outros marcadores, tem sido utilizada clinicamente como parâmetro para o diagnóstico de doenças cardíacas (DAOSUKHO et al., 2007). A CK está presente no cérebro, músculo esquelético e no músculo cardíaco e existem três isoformas compostas de

duas subunidades cada: a CK-BB que está associada a lesão cerebral e pulmonar, CK-MM que está associada a lesões de músculo esquelético e a CK-MB, associada a lesões cardíacas (ADAMS et al., 1993; PACHER et al., 2003). Neste trabalho foi avaliada a atividade sérica de CK total, que indica lesão nas células de qualquer um dos tecidos listados acima, e de CK-MB, cuja elevação indica lesão de células cardíacas.

Para avaliar a atividade sérica da CK, amostras de sangue dos camundongos foram coletadas no momento da eutanásia, imediatamente após a retirada do coração dos animais. Após coletado, o sangue foi centrifugado a 1200 G, por 20 minutos, a 4°C. O soro foi coletado e armazenado a 4°C até o momento da análise, realizada sempre no mesmo dia da coleta. A atividade sérica da CK foi determinada por metodologia cinética UV com a utilização de dois kits da Gold Analisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, MG): CK total, para determinação da creatina quinase total e CK-MB, para determinação da isoenzima MB da creatina quinase.

No momento da análise as amostras foram diluídas em solução salina, na proporção 1:5 e misturadas ao tampão do kit, na proporção de uma parte de amostra para 50 partes de tampão (CK total) ou uma parte de amostra para 20 partes de tampão (CK-MB). A atividade sérica da CK foi avaliada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 340 nm a 37°C.

Para a quantificação da atividade de CK total foram realizadas quatro leituras de cada amostra, exatamente após 2, 3, 4 e 5 minutos de incubação do soro com o tampão a 37°C. Para o cálculo da atividade utilizou-se a fórmula:

$$\text{U/L de CK total} = \Delta A/\text{minuto médio} \times \text{Fator (CK total)}$$

Onde:

$\Delta A/\text{minuto}$  = variação média da absorvância por minuto

Fator (CK total) = valor fixo definido pela seguinte fórmula:

$$\text{Fator (CK total)} = \frac{V_t \times 1000}{\epsilon \times V_a \times d}$$

Onde:

$V_t$  = volume total do ensaio

1000 = conversão de U/mL para U/L

$\epsilon$  = absorvância milimolar do NADPH em 340 nm

$V_a$  = volume de amostra

$d$  = espessura da cubeta, via da luz

A quantificação da atividade de CK-MB foi determinada a partir da realização de duas leituras de cada amostra, exatamente após 5 e 10 minutos de incubação do soro com o tampão a 37°C. Para o cálculo da atividade utilizou-se a fórmula:

$$U/L \text{ de CK-MB} = \Delta A \text{ do teste} \times \text{Fator (CK-MB)}$$

Onde:

$\Delta A$  do teste = absorvância aos 10 minutos – absorvância aos 5 minutos

Fator (CK-MB) = valor fixo definido pela seguinte fórmula:

$$\text{Fator (CK-MB)} = \frac{V_t \times 1000}{\epsilon \times V_a \times d} \times \frac{2}{5}$$

Onde:

2 = a fração MB é o dobro da fração B dosada

5 = o fator é dividido por 5 para corrigir o tempo de reação de 5 para 1 minuto

### **3.8 Avaliação da cardiotoxicidade induzida pela DOX e do efeito cardioprotetor dos antioxidantes em camundongos C57BL/6**

Antes de avaliar o efeito cardioprotetor dos antioxidantes foi necessário determinar o tempo adequado para a avaliação dos parâmetros indicativos de cardiotoxicidade induzida pela DOX e a dose de DOX mais efetiva para induzir tal toxicidade.

#### **3.8.1 Determinação do tempo adequado para análise da cardiotoxicidade aguda induzida pela DOX**

A administração de dose única de DOX em camundongos tem sido referida na literatura por resultar em mortalidade a partir de três dias do tratamento com o quimioterápico (DHINGRA et al., 2014; LI et al., 2006). Diante disso, foram avaliados neste trabalho os tempos de 24 e 48 horas para definir o tempo mais adequado para a avaliação dos parâmetros indicativos de cardiotoxicidade em camundongos.

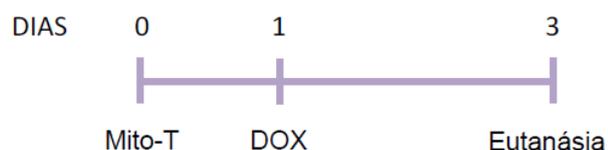
Camundongos foram pesados e receberam a dose de 20 mg/kg de DOX na cavidade peritoneal. Essa dose foi escolhida por ser uma das mais referidas na literatura como indutora de cardiotoxicidade, em dose única, em diversas linhagens

de camundongos (KIM et al., 2007; LI et al., 2006; RIAD et al., 2009). Após 24 e 48 horas, os animais foram novamente pesados e eutanasiados para detecção de peroxidação lipídica no tecido e em mitocôndrias cardíacas, e para determinação quantitativa da atividade sérica de creatina quinase (CK), indicativa de lesão cardíaca. A variação do peso corpóreo apresentada pelos animais ao longo do experimento também foi registrada, por ser uma variável constantemente utilizada como indicador do estado geral de saúde de animais submetidos ao tratamento com quimioterápicos (ROZADOS et al., 2008). O peso corpóreo dos animais no início do experimento foi considerado como 100% e foi calculado o percentual do peso dos animais no final do experimento em relação ao peso inicial (KANG et al., 2002). O efeito da administração da dose de 24 mg/kg de DOX também foi avaliado.

### 3.8.2 Avaliação do efeito cardioprotetor do Mito-T e AL

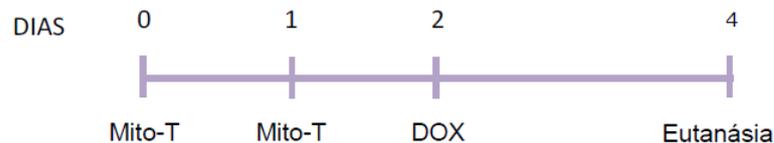
Inicialmente foi avaliado o efeito cardioprotetor do Mito-T e se este antioxidante sozinho causaria alguma toxicidade cardíaca aos animais. Doses variadas do antioxidante foram avaliadas, tanto em administração única, quanto em administração por até três dias seguidos, conforme descrito abaixo. O AL foi utilizado apenas nos protocolos de tratamento com administração por dias seguidos e doses elevadas e teve o óleo de amendoim (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como veículo para as administrações.

O primeiro protocolo de tratamento consistiu na administração da dose única de 5 mg/kg de Mito-T 24 horas antes do tratamento com DOX. Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou Mito-T na dose de 5 mg/kg e, após 24 horas, foram tratados com DOX na dose de 24 mg/kg pela mesma via. A eutanásia foi realizada 48 horas após o tratamento com DOX para avaliação da variação ponderal, atividade sérica de CK e peroxidação lipídica do tecido e mitocôndrias cardíacas (Figura 5).



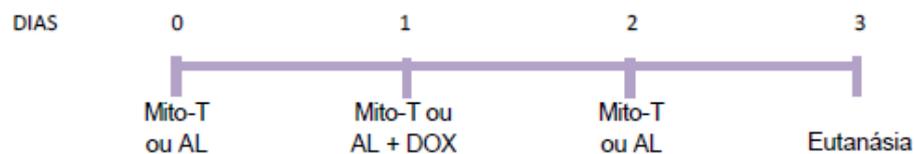
**Figura 5. Desenho experimental do tratamento de camundongos com a dose única de 5 mg/kg de Mito-TEMPO (Mito-T) e doxorrubicina (DOX).**

Como em alguns regimes de tratamento as substâncias cardioprotetoras são administradas mais de uma vez e/ou juntamente com o quimioterápico, um segundo protocolo foi avaliado consistindo na administração do Mito-T duas vezes, 48 e 24 horas antes do tratamento com DOX. Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou Mito-T na dose de 5 mg/kg por dois dias consecutivos e, 24 horas após a última injeção, foram tratados com DOX na dose de 24 mg/kg pela mesma via. A eutanásia foi realizada 48 horas após o tratamento com DOX (Figura 6).



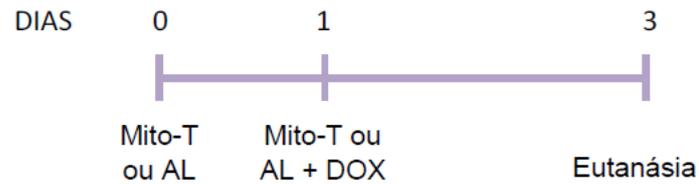
**Figura 6. Desenho experimental do tratamento de camundongos com duas doses de 5 mg/kg de Mito-TEMPO (Mito-T) e uma dose de doxorrubicina (DOX).**

O potencial cardioprotetor da administração do Mito-T na dose de 12,5 mg/kg e AL na dose de 120 mg/kg, por três vezes em dias seguidos, 24 horas antes, no mesmo dia e 24 horas após o tratamento com DOX também foi avaliado (Figura 7).



**Figura 7. Desenho experimental do tratamento de camundongos com três doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 12,5 mg/kg) ou ácido lipoico (AL, 120 mg/kg) e uma dose de doxorrubicina (DOX).**

O último protocolo consistiu no tratamento dos camundongos com as doses de 20 ou 200 mg/kg de Mito-T e AL, respectivamente, 24 horas antes e no mesmo dia da administração da DOX (Figura 8).



**Figura 8. Desenho experimental do tratamento de camundongos com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 20 mg/kg) ou ácido lipoico (AL, 200 mg/kg) e uma dose de doxorrubicina (DOX).**

### 3.9 Modelo experimental de indução de melanoma

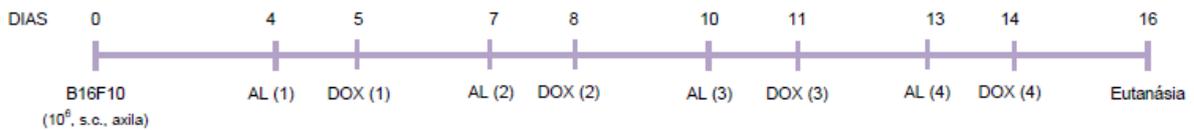
Foram avaliados três modelos de indução de melanoma utilizando células tumorais B16F10 em camundongos da linhagem C57BL/6. Todos os modelos consistiram na administração das células B16F10 pela via subcutânea diferindo apenas o local e a quantidade de células injetadas.

Um dos modelos consistiu na injeção de  $5 \times 10^5$  células de melanoma no dorso de cada animal (OTÁLORA et al., 2008), o outro na injeção de  $10^5$  células na pata esquerda (FELESZKO et al., 2002) e o terceiro na administração de  $10^6$  células na axila direita (COSTA et al., 2015). Os animais foram observados diariamente para o acompanhamento do crescimento tumoral e realização de eutanásia antes do primeiro óbito, caso fosse constatado grande desconforto dos animais em virtude do tamanho do tumor. Os animais foram pesados no início e final do experimento e o tumor dissecado e pesado após a eutanásia. O peso final dos animais foi calculado subtraindo-se o peso do tumor do peso do animal no final do experimento, conforme descrito por Zhang e colaboradores (2010).

#### 3.9.1 Tratamento quimioterápico com DOX e interferência do AL na atividade antineoplásica da DOX

Uma suspensão contendo  $10^6$  células de melanoma foi injetada na axila direita de camundongos C57BL/6 pela via subcutânea. Após cinco dias, os animais foram tratados com DOX na dose de 6 mg/kg, por quatro vezes, com intervalo de

três dias entre as administrações. A definição da dose de DOX para o tratamento com administrações fracionadas foi baseado na dose de 24 mg/kg, utilizada nos experimentos anteriores de indução de cardiotoxicidade no modelo agudo. Um tratamento com AL na dose de 200 mg/kg também foi realizado quatro vezes, 24 horas antes da DOX. A eutanásia foi realizada 48 horas após a última administração de DOX para avaliação da variação ponderal e crescimento tumoral (Figura 9).



**Figura 9.** Desenho experimental do tratamento de camundongos com melanoma com quatro doses de ácido lipoico (AL, 200 mg/kg) 24 horas antes da doxorubicina (DOX, 6 mg/kg).

Outro protocolo de tratamento consistiu na redução do número de injeções de DOX, com manutenção da dose cumulativa de 24 mg/kg, e aumento do número de injeções e da dose cumulativa de AL. Camundongos receberam uma injeção contendo  $10^6$  células de melanoma e após quatro dias, foram tratados com DOX na dose de 8 mg/kg, por três vezes, com intervalo de quatro dias entre as administrações. O tratamento com AL na dose de 120 mg/kg foi realizado 24 horas antes, no mesmo dia e 24 horas após cada administração de DOX (Figura 10).



**Figura 10.** Desenho experimental do tratamento de camundongos com melanoma com nove doses de ácido lipoico (AL, 120 mg/kg) e três doses de doxorubicina (DOX, 8 mg/kg).

### 3.10 Análise estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o programa Prisma versão 5.01. A significância das diferenças nos resultados obtidos foi estimada pelo teste de Kruskal-Wallis e a probabilidade das diferenças entre os resultados observados em

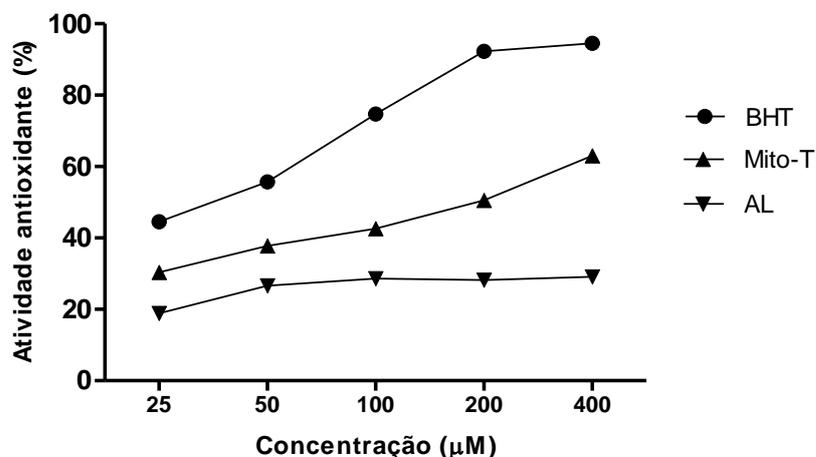
diferentes grupos serem devido ao acaso foi avaliada pelo teste de Dunn. Diferenças estatísticas foram consideradas significativas para  $p \leq 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Avaliação da atividade antioxidante do Mito-T e do AL pelo método do DPPH

A atividade antioxidante (AA) do Mito-T e do AL foi avaliada utilizando o método do DPPH que permite verificar a capacidade de substâncias em inibir a formação de radicais livres.

O Mito-T apresentou 63% de atividade antioxidante na concentração de 400  $\mu$ M enquanto o maior valor de atividade antioxidante do AL foi 29,1%. O BHT, utilizado como padrão para o ensaio do DPPH, apresentou atividade de 94,5% na maior concentração avaliada (Figura 11).

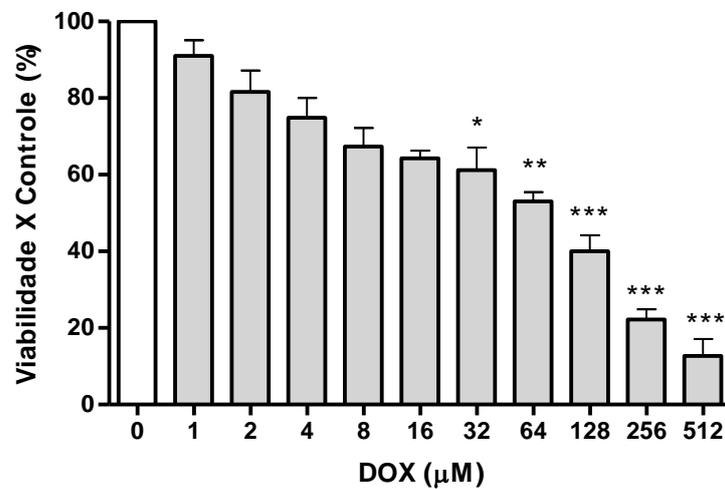


**Figura 11. Percentual de atividade antioxidante do Mito-TEMPO (Mito-T) e ácido lipoico (AL) avaliada pelo método do DPPH.** Percentual de atividade antioxidante do Mito-T e AL (25 - 400  $\mu$ M) após 90 minutos de incubação com solução metanólica de DPPH. BHT foi utilizado como padrão para o ensaio. Cada ponto representa a média da atividade antioxidante da triplicata.

### 4.2 Determinação da curva concentração-resposta das células cardíacas H9c2 ao tratamento com DOX, Mito-T e AL

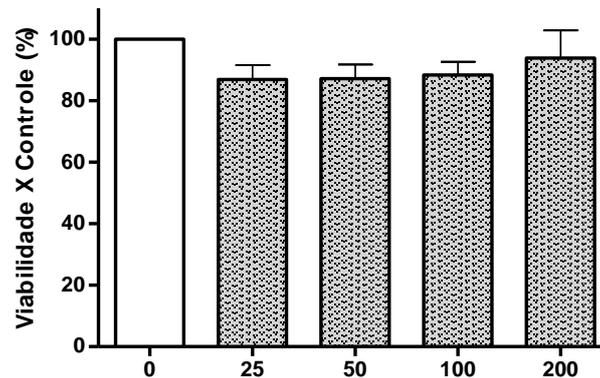
A capacidade da doxorrubicina em reduzir a viabilidade de células cardíacas da linhagem H9c2 foi avaliada utilizando o Alamar Blue que contém um indicador redox.

O efeito do tratamento com DOX pelo período de 24 horas sobre a viabilidade das células cardíacas é observado na Figura 12. A DOX apresentou toxicidade para as células cardíacas com valor de  $CI_{50}$  e intervalo de confiança de 95% de  $40,83 \mu\text{M}$  ( $28,64 - 58,21$ ).

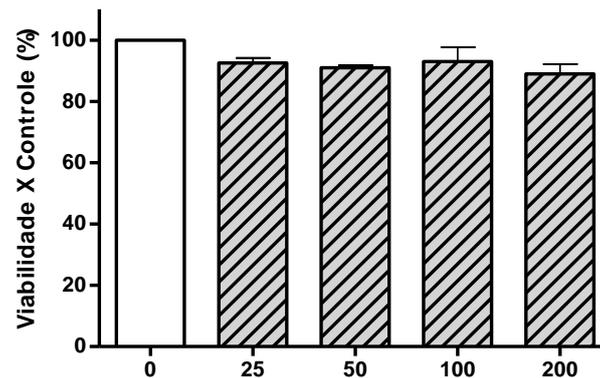


**Figura 12. Curva concentração-resposta de doxorrubicina (DOX) em células H9c2.** Cada coluna representa a viabilidade média da cultura celular em relação ao controle (células que não receberam DOX). A cada grupo foi administrada uma concentração diferente de DOX por 24 horas. Foi considerada como viabilidade celular máxima (100%) a viabilidade média dos poços que não receberam DOX. A viabilidade celular 48 horas após a administração da DOX foi avaliada utilizando o ensaio do Alamar Blue. Foram realizados quatro experimentos em triplicatas. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

Não foi observada diferença na viabilidade das células H9c2 tratadas com diferentes concentrações de Mito-T e AL, demonstrando que, nas condições avaliadas, os dois antioxidantes não são tóxicos para células cardíacas (Figuras 13 e 14).



**Figura 13. Curva concentração-resposta do Mito-TEMPO (Mito-T) em células H9c2.** Cada coluna representa a viabilidade média da cultura celular em relação ao controle (células que não receberam Mito-TEMPO). A cada grupo foi administrada uma concentração diferente de Mito-T por 24 horas. Foi considerada como viabilidade celular máxima (100%) a viabilidade média dos poços que não receberam Mito-T. A viabilidade celular 72 horas após a administração do Mito-T foi avaliada utilizando o ensaio do Alamar Blue. Foram realizados dois experimentos em quadruplicatas.



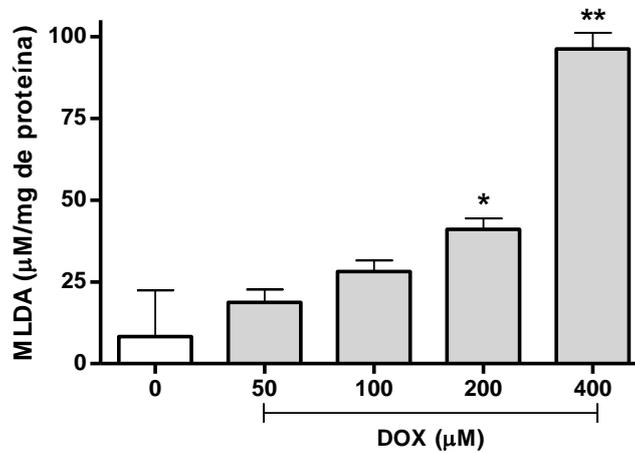
**Figura 14. Curva concentração-resposta do ácido lipoico (AL) em células H9c2.** Cada coluna representa a viabilidade média da cultura celular em relação ao controle (células que não receberam AL). A cada grupo foi administrada uma concentração diferente de AL por 24 horas. Foi considerada como viabilidade celular máxima (100%) a viabilidade média dos poços que não receberam AL. A viabilidade celular 72 horas após a administração do AL foi avaliada utilizando o ensaio do Alamar Blue.

#### 4.3 Avaliação da peroxidação lipídica induzida pela DOX em células H9c2 por TBARS

A capacidade da DOX de promover peroxidação lipídica em células cardíacas foi avaliada por TBARS.

A concentração de MLDA foi significativamente mais elevada nas células tratadas com 200 e 400  $\mu\text{M}$  de DOX indicando a ocorrência de peroxidação lipídica (Figura 15). Como o tratamento com 400  $\mu\text{M}$  apresentou resultados mais

reprodutíveis e maior diferença em comparação ao grupo controle, essa concentração foi escolhida para os demais experimentos.

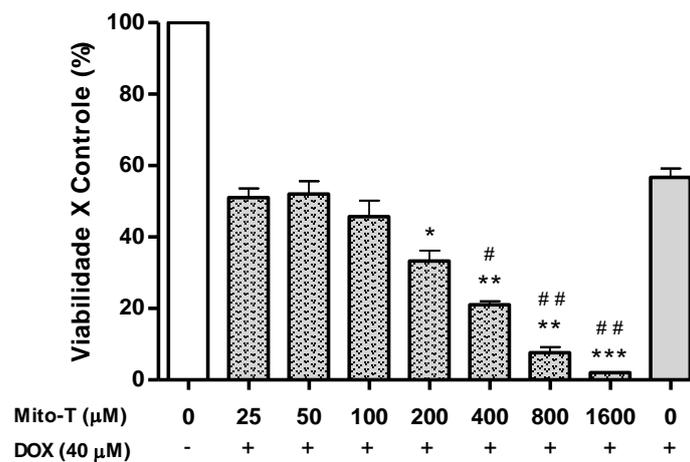


**Figura 15. Peroxidação lipídica de células H9c2 tratadas com doxorubicina (DOX).** Cada coluna representa a concentração de malondialdeído (MLDA) ajustada pela concentração de proteína. A cada grupo foi administrada uma concentração diferente de DOX por 18 horas. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

#### 4.4 Avaliação do efeito protetor do Mito-T e AL sobre a toxicidade da DOX em células H9c2

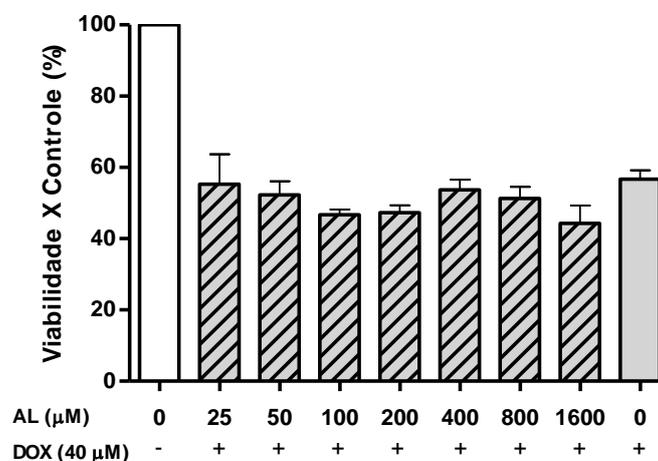
O efeito protetor do Mito-T e AL sobre a toxicidade induzida pela DOX foi avaliado utilizando os ensaios do Alamar Blue e TBARS.

O pré-tratamento das células cardíacas com Mito-T não resultou em aumento da viabilidade e aumentou a toxicidade da DOX a partir da concentração de 400 µM (Figura 16).



**Figura 16. Efeito do pré-tratamento com Mito-TEMPO (Mito-T) sobre a viabilidade de células H9c2 tratadas com doxorubicina (DOX).** Cada coluna representa a viabilidade média da cultura celular em relação ao controle (células que não receberam Mito-T nem DOX). A cada grupo foi administrada uma concentração diferente de Mito-T uma hora antes da DOX (40 μM) por 24 horas. Foi considerada como viabilidade celular máxima (100%) a viabilidade média dos poços que não receberam tratamento. A viabilidade celular 24 horas após a administração da DOX foi avaliada utilizando o ensaio do Alamar Blue. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle. #  $p < 0,05$  ##  $p < 0,01$  em relação ao grupo que recebeu apenas DOX (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

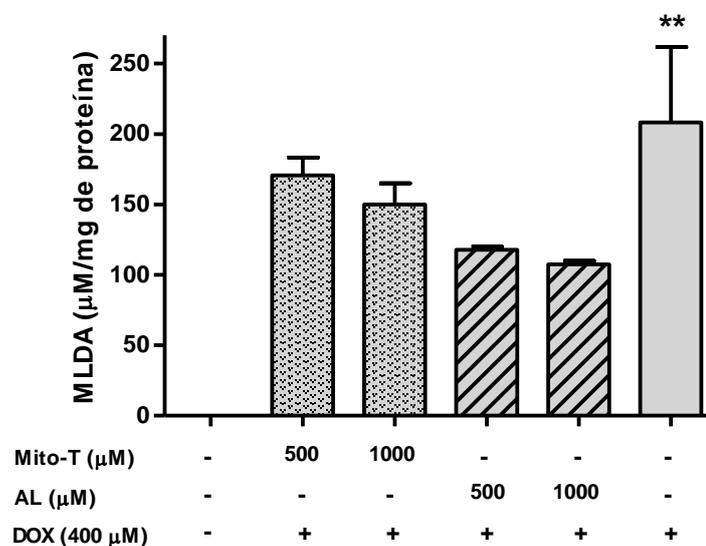
Por outro lado, não houve diferença na viabilidade das células cardíacas pré-tratadas com AL em relação ao tratamento apenas com DOX (Figura 17) demonstrando que, nas condições avaliadas, o AL não interferiu na toxicidade da DOX para tais células.



**Figura 17. Efeito do pré-tratamento com ácido lipoico (AL) sobre a viabilidade de células H9c2 tratadas com doxorubicina (DOX).** Cada coluna representa a viabilidade média da cultura celular em relação ao controle (células que não receberam AL nem DOX). A cada grupo foi administrada

uma concentração diferente de AL uma hora antes da DOX (40  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Foi considerada como viabilidade celular máxima (100%) a viabilidade média dos poços que não receberam tratamento. A viabilidade celular 24 horas após a administração da DOX foi avaliada utilizando o ensaio do Alamar Blue.

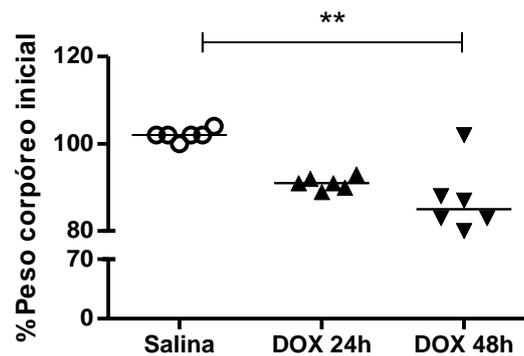
O efeito protetor dos antioxidantes sobre a peroxidação lipídica induzida pela DOX também foi avaliado. O pré-tratamento das células cardíacas com os dois antioxidantes não reduziu a peroxidação lipídica induzida pela DOX (Figura 18).



**Figura 18. Peroxidação lipídica de células H9c2 pré-tratadas com Mito-TEMPO (Mito-T) ou ácido lipoico (AL) e tratadas com doxorubicina (DOX).** Cada coluna representa a concentração de malondialdeído (MLDA) ajustada pela concentração de proteína. As células foram incubadas com Mito-T ou AL (500 ou 1000  $\mu\text{M}$ ) uma hora antes do tratamento com DOX (400  $\mu\text{M}$ ) por 18 horas. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo controle (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

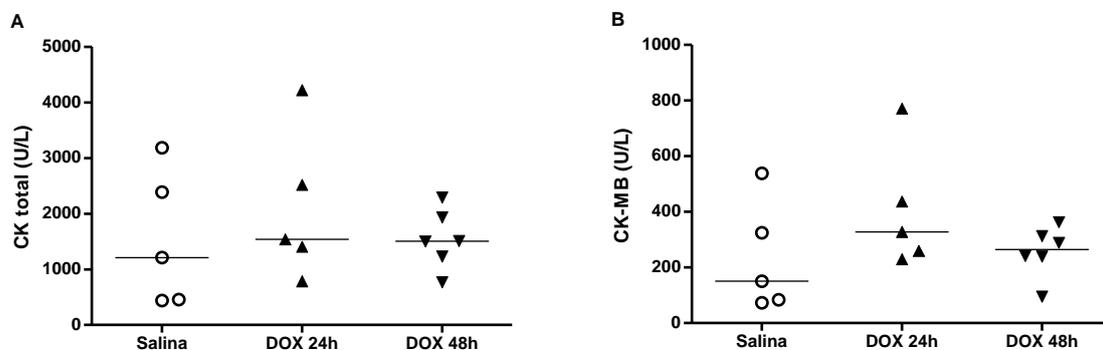
#### 4.5 Determinação do tempo adequado para a avaliação da cardiotoxicidade aguda induzida pela DOX *in vivo*

A toxicidade geral induzida pela DOX em camundongos tratados com a dose de 20 mg/kg foi inicialmente avaliada pela perda de peso dos animais. Os animais que receberam a droga apresentaram uma redução significativa de peso após 48 horas (Figura 19).



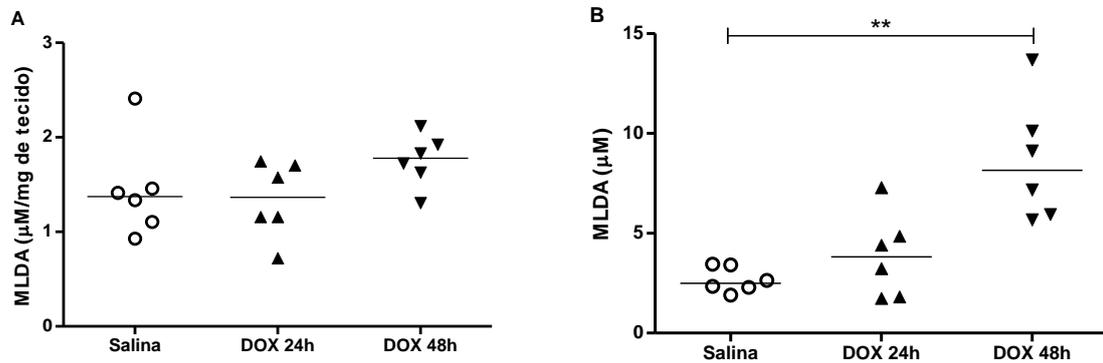
**Figura 19. Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com doxorubicina (DOX) por 24 e 48 horas.** Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou 20 mg/kg de DOX. Os animais foram pesados no dia da injeção e no momento da eutanásia (24 ou 48 horas pós-DOX). O peso dos animais no dia da injeção foi considerado como 100% e foi calculado o percentual do peso dos animais no final do experimento em relação ao peso inicial. Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

Nenhuma diferença na atividade sérica de CK total e CK-MB, mais específica para indicar lesão cardíaca, foi observada nos tempos avaliados (Figura 20).



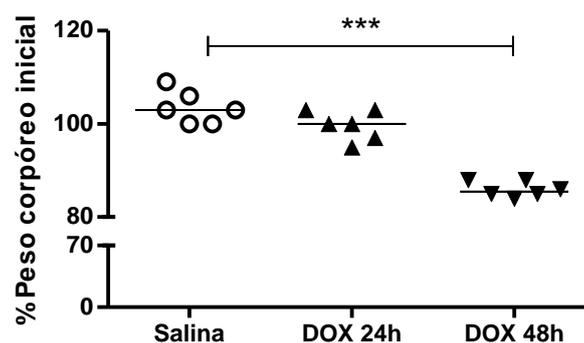
**Figura 20. Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) 24 e 48 horas pós-doxorrubicina (DOX).** Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou 20 mg/kg de DOX. Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo.

A capacidade da DOX de promover peroxidação lipídica no tecido e em mitocôndrias cardíacas foi avaliada pela técnica de TBARS. Não foi observado aumento na concentração de MLDA no tecido cardíaco, entretanto, a concentração deste produto de peroxidação lipídica foi significativamente mais elevada nas mitocôndrias cardíacas 48 horas pós-DOX (Figura 21).



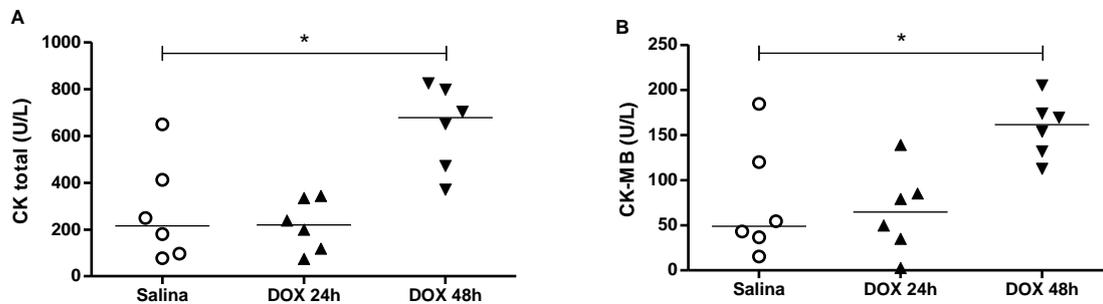
**Figura 21. Peroxidação lipídica de tecido (A) e mitocôndrias cardíacas (B) 24 e 48 horas pós-doxorrubicina (DOX).** Camundongos foram tratados pela via intraperitoneal com DOX (20 mg/kg) ou salina. Cada símbolo representa a concentração de malondialdeído (MLDA) nas amostras de cada animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

Em virtude das doses de DOX utilizadas na literatura serem muito variadas e da cardiotoxicidade não ter sido evidenciada em todos os parâmetros avaliados com a dose de 20 mg/kg, novos experimentos foram conduzidos utilizando a dose de 24 mg/kg. Houve redução significativa do peso corpóreo dos animais 48 horas após o tratamento com DOX na dose de 24 mg/kg (Figura 22).



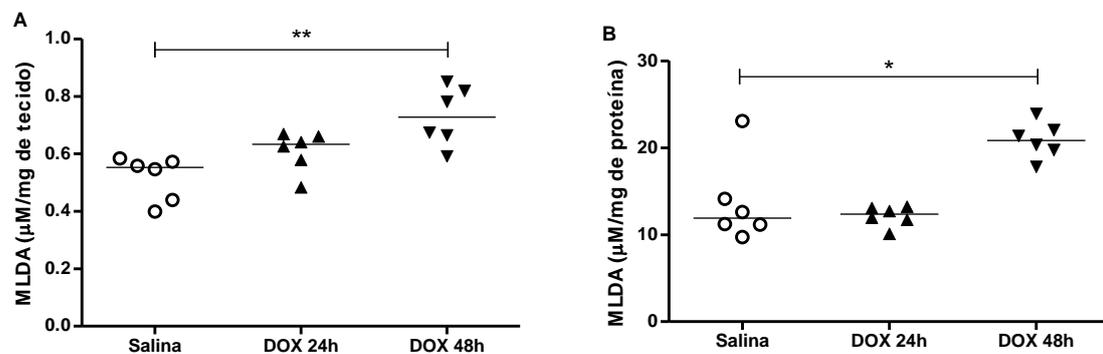
**Figura 22. Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com doxorrubicina (DOX).** Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou 24 mg/kg de DOX. Os animais foram pesados no dia da injeção e no momento da eutanásia (24 ou 48 horas pós-DOX). O peso dos animais no dia da injeção foi considerado como 100% e foi calculado o percentual do peso dos animais no final do experimento em relação ao peso inicial. Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

As atividades séricas de CK total e CK-MB foram superiores nos animais tratados com DOX após 48 horas, indicando lesão das células cardíacas (Figura 23).



**Figura 23. Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) 24 e 48 horas pós-doxorrubicina (DOX, 24 mg/kg).** Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou DOX. Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

A concentração de MLDA foi significativamente mais elevada no tempo de 48 horas, tanto no tecido quanto em mitocôndrias cardíacas (Figura 24).



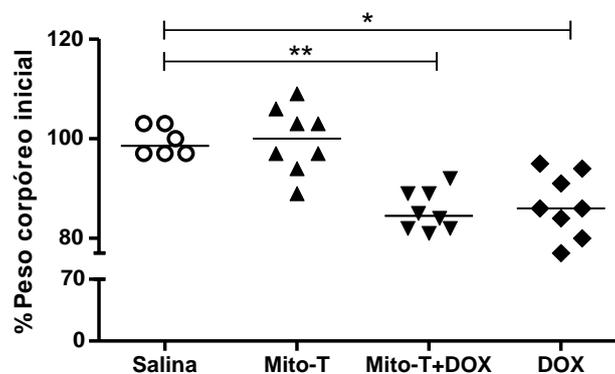
**Figura 24. Peroxidação lipídica de tecido (A) e mitocôndrias cardíacas (B) 24 e 48 horas pós-doxorrubicina (DOX, 24 mg/kg).** Camundongos foram tratados pela via intraperitoneal com DOX ou salina. Cada símbolo representa a concentração de malondialdeído (MLDA) nas amostras de cada animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

O aumento da dose de DOX em 20%, passando de 20 mg/kg para 24 mg/kg, resultou em redução significativa de peso dos animais, elevação da atividade sérica de CK-total e CK-MB e aumento da peroxidação lipídica do tecido e mitocôndrias

cardíacas 48 horas após o tratamento. Diante da confirmação da cardiotoxicidade induzida pela administração de DOX, o efeito cardioprotetor dos antioxidantes foi avaliado utilizando os mesmos parâmetros.

#### 4.6 Avaliação do efeito cardioprotetor do Mito-T e AL *in vivo*

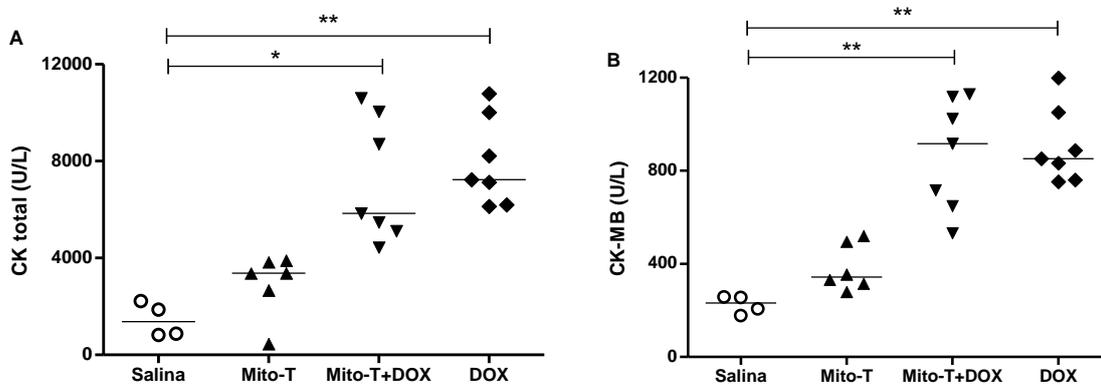
O efeito do Mito-T sobre os parâmetros indicativos de cardiotoxicidade em camundongos foi inicialmente avaliado a fim de verificar se este antioxidante causaria alguma toxicidade cardíaca ou conferiria cardioproteção em animais tratados com DOX. O pré-tratamento com a dose única de 5 mg/kg de Mito-T não impediu a redução de peso dos animais induzida pela DOX, entretanto, esse antioxidante também não causou alteração neste parâmetro quando foi feita a comparação entre os animais tratados apenas com Mito-T e os animais do grupo salina (Figura 25).



**Figura 25. Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com Mito-TEMPO (Mito-T) e/ou doxorubicina (DOX).** Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou 5 mg/kg de Mito-T e, após 24 horas, uma injeção intraperitoneal de salina ou 24 mg/kg de DOX. Os animais foram pesados no dia da injeção do Mito-T e no momento da eutanásia (48 horas pós-DOX). O peso dos animais no dia da injeção do Mito-T foi considerado como 100% e foi calculado o percentual do peso dos animais no final do experimento em relação ao peso inicial. Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

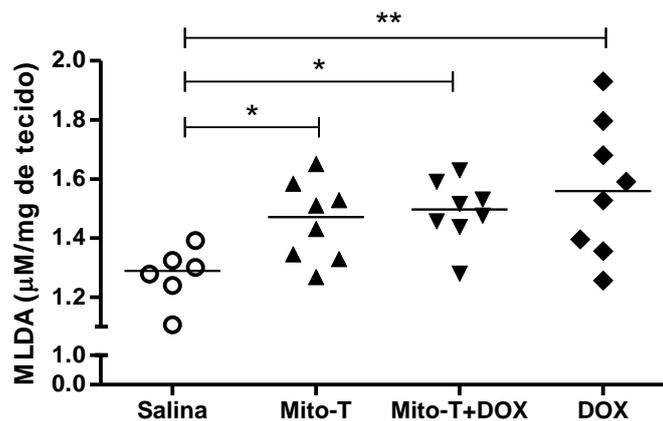
As atividades séricas de CK-total e CK-MB foram similares entre os animais do grupo controle e os que foram tratados apenas com o Mito-T e este parâmetro

também não foi alterado quando realizada a comparação entre os animais tratados com DOX e os que foram pré-tratados com Mito-T (Figura 26).



**Figura 26. Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) de animais tratados com Mito-TEMPO (Mito-T, 5 mg/kg) e/ou doxorrubicina (DOX, 24 mg/kg).** Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

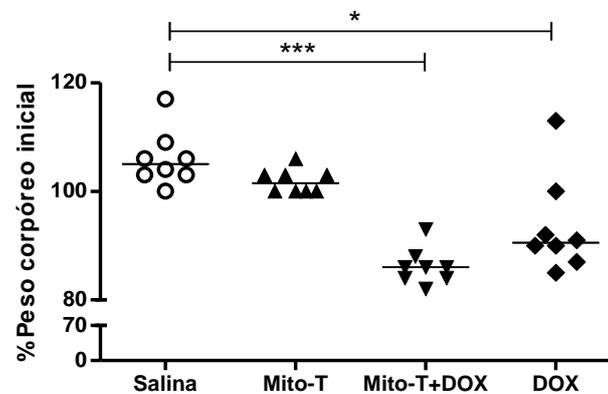
O Mito-T não reduziu a concentração de MLDA no tecido cardíaco dos animais tratados com DOX indicando ausência de proteção contra peroxidação lipídica (Figura 27).



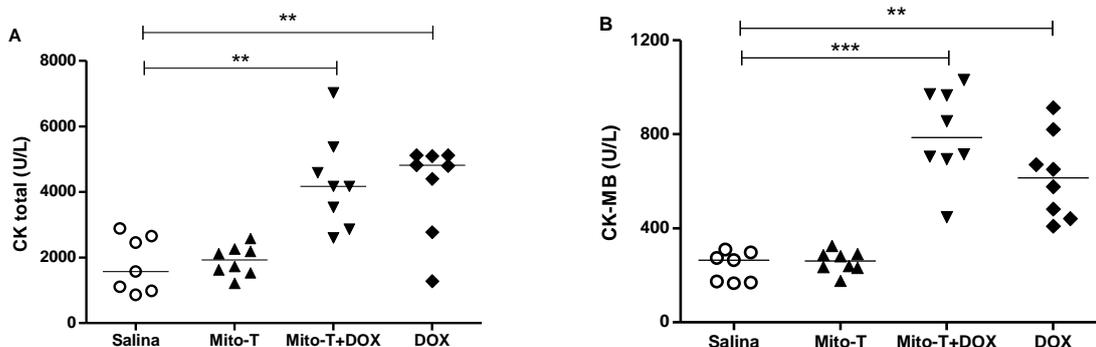
**Figura 27. Peroxidação lipídica do tecido cardíaco de animais tratados com Mito-TEMPO (Mito-T, 5 mg/kg) e/ou doxorrubicina (DOX, 24 mg/kg).** Cada símbolo representa a concentração de malondialdeído (MLDA) no tecido de cada animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

Visando verificar se seria possível observar-se uma ação cardioprotetora do Mito-T administrando-se mais de uma dose, o antioxidante foi injetado duas vezes, 24 horas antes e no mesmo dia do tratamento com DOX. Foram utilizadas as doses de 5 mg/kg de Mito-T e 24 mg/kg de DOX com eutanásia 48 horas pós-DOX.

Os animais que receberam duas doses de Mito-T apresentaram peso corpóreo e concentração de CK similares aos animais do grupo salina. Semelhantemente, não foi observada diferença nesses dois parâmetros entre os animais tratados com DOX e pré-tratados ou não com duas doses de Mito-T (Figuras 28 e 29).

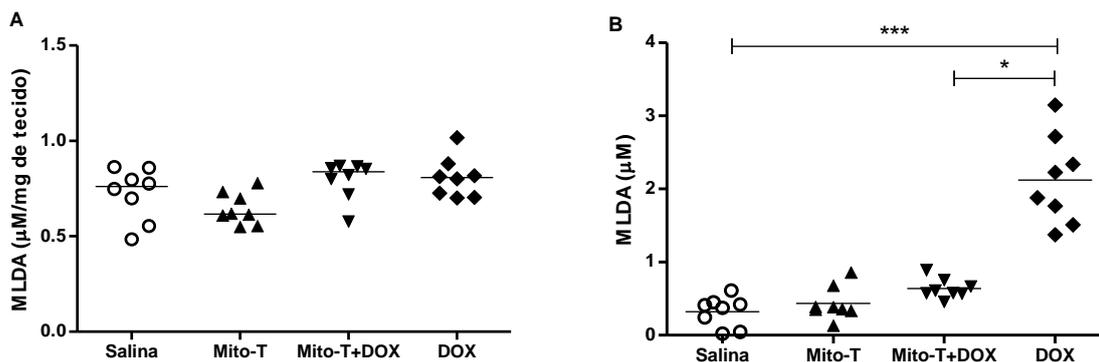


**Figura 28. Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T) e/ou doxorrubicina (DOX).** Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina ou Mito-T (5 mg/kg) durante dois dias consecutivos e, 24 horas após a última dose, uma injeção intraperitoneal de salina ou DOX (24 mg/kg). Os animais foram pesados no dia da primeira injeção do Mito-TEMPO e no momento da eutanásia (48 horas pós-DOX). O peso dos animais no início do experimento foi considerado como 100% e foi calculado o percentual do peso dos animais no final do experimento em relação ao peso inicial. Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).



**Figura 29. Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) de animais tratados com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 5 mg/kg) e/ou doxorubicina (DOX, 24 mg/kg).** Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

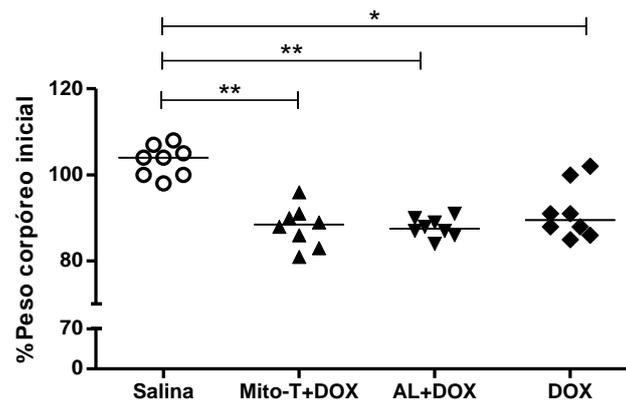
A administração de duas doses de Mito-T promoveu redução da peroxidação de mitocôndrias cardíacas induzida pela DOX (Figura 30).



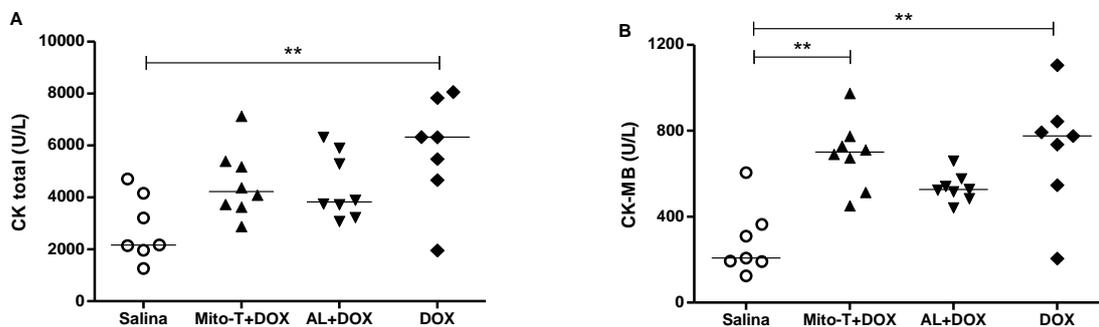
**Figura 30. Peroxidação lipídica de tecido (A) e mitocôndrias cardíacas (B) de animais tratados com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 5 mg/kg) e/ou doxorubicina (DOX, 24 mg/kg).** Cada símbolo representa a concentração de malondialdeído (MLDA) nas amostras de cada animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

Diante da utilização de doses superiores a 5 mg/kg de Mito-T para promover redução do estresse oxidativo em outros modelos experimentais descritos na literatura (DICKEY et al. 2013; PATIL et al. 2014), outros protocolos de tratamento utilizando doses elevadas de Mito-T foram avaliados neste trabalho. Além disso, o efeito cardioprotetor do ácido lipoico também foi avaliado.

O tratamento dos animais com três administrações de Mito-T ou AL nas doses de 12,5 e 120 mg/kg, respectivamente, não foi capaz de impedir a redução de peso corpóreo e nem a elevação da atividade sérica de CK induzidas pela DOX (Figuras 31 e 32).

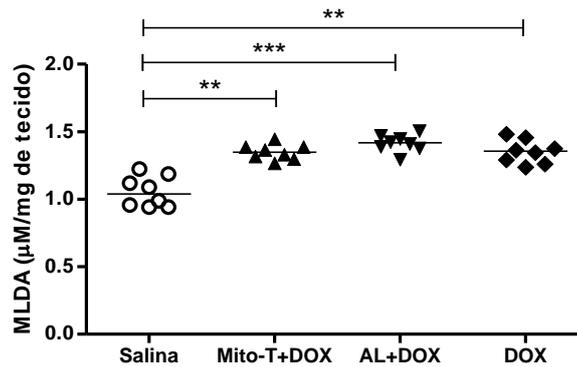


**Figura 31. Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com três doses de Mito-TEMPO (Mito-T) ou ácido lipoico (AL) e/ou doxorrubicina (DOX).** Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina, Mito-T (12,5 mg/kg) ou AL (120 mg/kg), 24 horas antes, no mesmo dia e 24 horas após a administração de DOX (24 mg/kg). Os animais foram pesados no dia da primeira injeção e no momento da eutanásia (48 horas pós-DOX). O peso dos animais no início do experimento foi considerado como 100% e foi calculado o percentual do peso dos animais no final do experimento em relação ao peso inicial. Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).



**Figura 32. Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) de animais tratados com três doses de Mito-TEMPO (Mito-T) ou ácido lipoico (AL) e/ou doxorrubicina (DOX).** Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

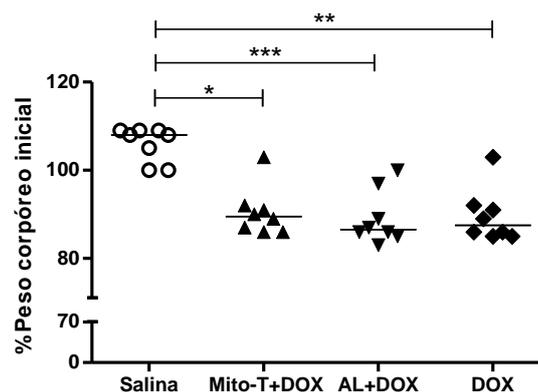
Todos os animais tratados com DOX apresentaram peroxidação lipídica do tecido cardíaco similar, independente do tratamento com Mito-T ou AL (Figura 33).



**Figura 33. Peroxidação lipídica do tecido cardíaco de animais tratados com três doses de Mito-TEMPO (Mito-T) ou ácido lipoico (AL) e/ou doxorrubicina (DOX).** Cada símbolo representa a concentração de malondialdeído (MLDA) no tecido de cada animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

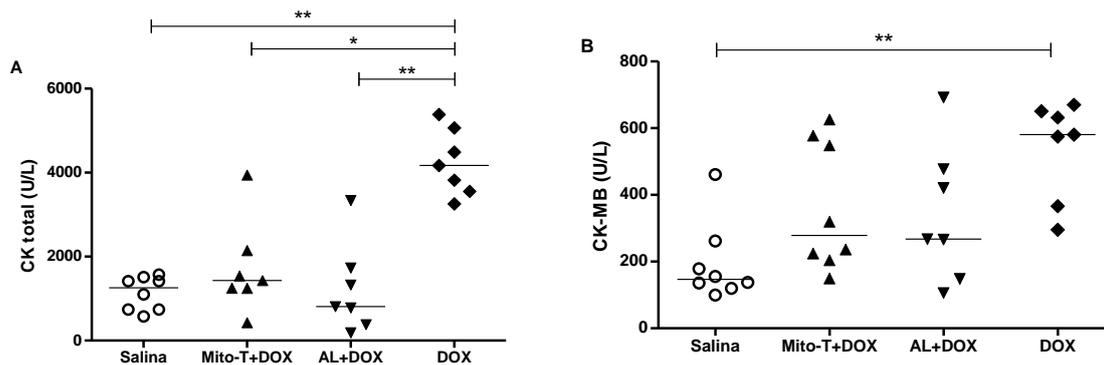
A dose dos antioxidantes foi aumentada mais uma vez e os mesmos parâmetros foram avaliados em animais tratados com Mito-T e AL nas doses de 20 mg/kg e 200 mg/kg, respectivamente. O tratamento foi realizado 24 horas antes e no mesmo dia da administração da DOX e os animais foram eutanasiados 48 horas pós-DOX.

Não foi observada diferença no peso corpóreo dos animais tratados com DOX independente da administração dos antioxidantes (Figura 34).



**Figura 34. Variação ponderal de camundongos submetidos ao tratamento com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 20 mg/kg) ou ácido lipoico (AL, 200 mg/kg) e/ou doxorrubicina (DOX).** Camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de salina, Mito-T ou AL, 24 horas antes e no mesmo dia da administração de DOX (24 mg/kg). Os animais foram pesados no dia da primeira injeção e no momento da eutanásia (48 horas pós-DOX). O peso dos animais no início do experimento foi considerado como 100% e foi calculado o percentual do peso dos animais no final do experimento em relação ao peso inicial. Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

O tratamento com os dois antioxidantes impediu a elevação da atividade sérica de CK total indicando possível efeito cardioprotetor destes antioxidantes (Figura 35).



**Figura 35. Atividade sérica de creatina quinase (CK) total (A) e CK-MB (B) de animais tratados com duas doses de Mito-TEMPO (Mito-T, 20 mg/kg) ou ácido lipoico (AL, 200 mg/kg) e/ou doxorrubicina (DOX). Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).**

#### 4.7 Padronização do modelo experimental de indução de melanoma em camundongos C57BL/6

Os modelos subcutâneos de indução de melanoma no dorso e na pata de camundongos da linhagem C57BL/6 foram inicialmente testados, mas não apresentaram resultados reprodutíveis. A administração das células tumorais no dorso resultou, em muitos animais, no espalhamento do tumor ao longo da região dificultando a dissecação e mensuração do peso do tumor. Por outro lado, nem todos os animais que receberam as células de melanoma na pata desenvolveram o tumor. Diante disso, foi padronizado outro modelo com administração das células tumorais pela via subcutânea na axila dos camundongos.

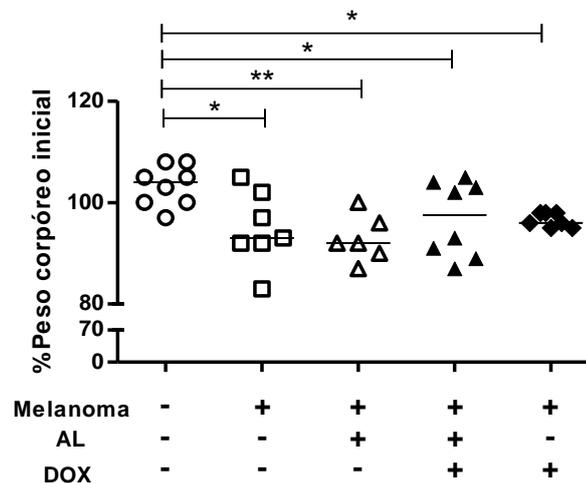
A administração de uma suspensão contendo  $10^6$  células de melanoma B16F10 na axila dos camundongos resultou no desenvolvimento de tumor localizado em todos os animais. O acompanhamento do crescimento tumoral foi realizado por observação diária dos animais para verificação da ocorrência de óbitos ou grande

desconforto em virtude do tamanho do tumor. Não foi necessário realizar eutanásia precoce e nem ocorreram óbitos até o décimo sexto dia de experimento, tempo necessário para a realização do tratamento quimioterápico com DOX nos dois protocolos testados neste trabalho.

#### 4.8 Padronização do tratamento quimioterápico de camundongos C57BL/6 com DOX e avaliação da interferência do AL na atividade antineoplásica da DOX

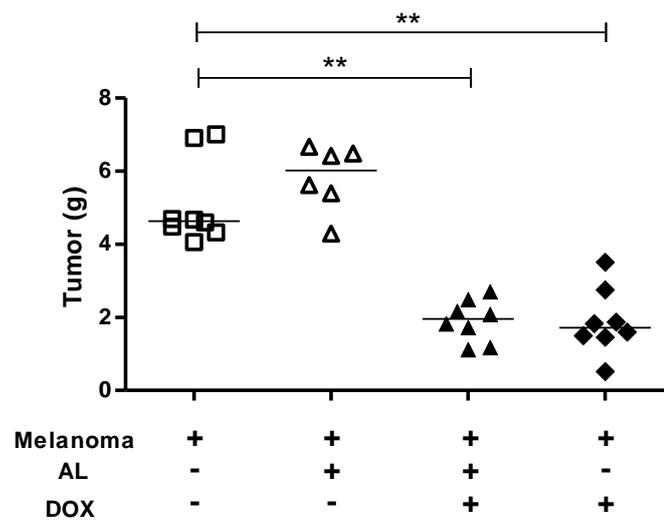
Com o estabelecimento do modelo experimental de melanoma localizado, foi avaliado um protocolo de tratamento com DOX com administração em doses fracionadas e se o AL interfere na atividade antineoplásica do quimioterápico. Por questões técnicas, não foi possível realizar os experimentos para avaliação da interferência do Mito-T na atividade antineoplásica da DOX.

Todos os camundongos que receberam a suspensão de células de melanoma apresentaram redução significativa de peso corpóreo ao final do experimento quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 36).



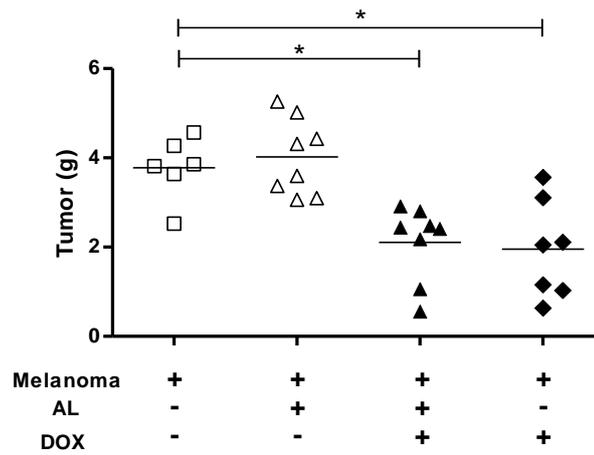
**Figura 36. Variação ponderal de camundongos com melanoma submetidos ao tratamento com quatro doses de ácido lipoico (AL) e/ou doxorrubicina (DOX).** Camundongos receberam uma injeção subcutânea com  $10^6$  células de melanoma na axila direita e foram tratados com AL e/ou DOX conforme descrito na metodologia. Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

O tratamento dos animais com quatro injeções de DOX na dose de 6 mg/kg promoveu redução significativa da massa tumoral em comparação ao peso do tumor apresentado pelos animais que não foram tratados com o quimioterápico. O pré-tratamento com AL na dose de 200 mg/kg, 24 horas antes da administração da DOX, não interferiu na atividade antineoplásica, uma vez que o peso do tumor foi similar nos animais tratados com DOX, independente do pré-tratamento com AL (Figura 37).



**Figura 37. Peso do tumor de camundongos com melanoma submetidos ao tratamento com quatro doses de ácido lipoico (AL) e/ou doxorrubicina (DOX).** Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*\*  $p < 0,01$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

Resultado similar de redução significativa da massa tumoral dos animais tratados com DOX e ausência de interferência do AL na atividade antineoplásica do quimioterápico foi observado com a utilização de outro protocolo de tratamento com as duas substâncias (Figura 38).



**Figura 38. Peso do tumor de camundongos com melanoma submetidos ao tratamento com nove doses de ácido lipoico (AL) e/ou três doses de doxorrubicina (DOX).** Camundongos receberam uma injeção subcutânea com  $10^6$  células de melanoma na axila direita e foram tratados com AL e/ou DOX conforme descrito na metodologia. Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. \*  $p < 0,05$  (Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

## 5. DISCUSSÃO

A busca por novas substâncias e estratégias terapêuticas capazes de reduzir a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina continua. Apesar de ser utilizada com sucesso para o tratamento de diversos tipos de câncer, o emprego da DOX na clínica médica tem sido limitado, desde os primeiros relatos de cardiotoxicidade associada ao quimioterápico há mais de 40 anos (LEFRACK et al., 1973; MORDENTE et al., 2015; OCTAVIA et al., 2012). Visando contribuir para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos que reduzam tal efeito colateral, foram avaliados, neste trabalho, os efeitos do Mito-TEMPO e do ácido lipoico sobre a toxicidade cardíaca induzida pela DOX, *in vitro* e *in vivo*, e se o ácido lipoico interfere na atividade antineoplásica da DOX em um modelo experimental de melanoma de camundongo.

A avaliação comparativa da atividade antioxidante do Mito-T e AL foi verificada inicialmente pela capacidade das duas substâncias em reduzir a formação de radicais livres pelo método do DPPH. Garcia e colaboradores (2012), ao avaliarem a atividade antioxidante de algumas soluções, pelo mesmo método, consideraram como elevada, intermediária e reduzida atividade antioxidante as soluções com valores de AA acima de 70%, entre 20 e 70% e abaixo de 20%, respectivamente. Com base nesse critério, o Mito-T (AA = 63%) e AL (AA = 29,1%) são substâncias que apresentam atividade antioxidante intermediária.

A ação antioxidante do Mito-T sobre o DPPH não é referida na literatura, entretanto, Akiyama e colaboradores (2009) ao utilizarem o mesmo método de análise para avaliar a atividade antioxidante do tempol, que tem características similares ao Mito-T, mas não é direcionado para mitocôndrias, não observaram efeito deste antioxidante sobre o radical DPPH. Resultado similar quanto à atividade antioxidante do AL foi obtido por Bolognesi e colaboradores (2014) que constataram que somente concentrações superiores a 100  $\mu$ M seriam responsáveis pelo efeito do antioxidante sobre o radical DPPH. Os autores também avaliaram a atividade antioxidante do DHLA, que é considerado a forma ativa do AL, e observaram potente efeito sobre o radical DPPH, comparável à AA apresentada pelo padrão utilizado no ensaio.

Diante da atividade antioxidante apresentada pelo Mito-T e AL, verificada pelo método do DPPH, ser um indicativo de potencial efeito cardioprotetor das duas

substâncias, a avaliação dos seus efeitos sobre a toxicidade induzida pela DOX *in vitro* e *in vivo* foi realizada.

Antes de avaliar se os antioxidantes reduzem a toxicidade induzida pela DOX, foi verificado se eles sozinhos alteram a viabilidade de células cardíacas da linhagem H9c2 e determinada a curva concentração-resposta da DOX sobre tais células.

A toxicidade da DOX para as células cardíacas foi confirmada pela redução da viabilidade e o valor de  $CI_{50}$  determinado para o período de incubação de 24 horas foi de 40,83  $\mu\text{M}$ . Valor menor de  $CI_{50}$  da DOX, 20,95  $\mu\text{M}$ , foi obtido por Feridooni e colaboradores (2013) na avaliação do tratamento das mesmas células pelo tempo de 72 horas. A diferença entre os valores de  $CI_{50}$  determinados nos dois estudos pode ser atribuída ao menor tempo de incubação das células com a DOX, empregado neste trabalho.

O tratamento de células H9c2 com a concentração de até 200  $\mu\text{M}$  de Mito-T não resultou em redução da viabilidade, indicando a possível ausência de toxicidade da substância. Há poucos trabalhos na literatura utilizando o tratamento de células H9c2 com Mito-T, mas em trabalho recentemente publicado, o pré-tratamento das células com 25  $\mu\text{M}$  de Mito-T resultou em redução da morte celular induzida por peróxido de hidrogênio (SAWICKI et al., 2015). Ausência de toxicidade do AL sobre células H9c2 também foi verificada por Yao e colaboradores (2012), que não observaram redução de viabilidade após o tratamento por 24 horas com concentrações variando de 300 a 2000  $\mu\text{M}$  de AL, demonstrando que a concentração de AL, limitada inicialmente a 200  $\mu\text{M}$  nos experimentos deste trabalho, pode ser elevada em análises futuras com possibilidade reduzida de toxicidade.

A redução da viabilidade de cardiomiócitos causada pela DOX pode estar relacionada, dentre outros fatores, à ocorrência de peroxidação lipídica, que é referida na literatura como uma das consequências do estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico (HOSSEINI et al., 2014). A avaliação da ocorrência de peroxidação lipídica revelou que o tratamento das células cardíacas com DOX foi capaz de elevar significativamente a concentração de MLDA, um dos produtos finais da peroxidação lipídica. Esse resultado é corroborado por outros trabalhos publicados na literatura (WANG et al., 2013; XIN et al., 2009).

Após a definição da  $CI_{50}$ , nas análises de viabilidade, e da concentração de DOX capaz de promover peroxidação lipídica, o efeito cardioprotetor dos antioxidantes em células H9c2 tratadas com DOX foi avaliado. O pré-tratamento das células cardíacas com os antioxidantes não reduziu o dano induzido pela DOX (Figuras 16 a 18).

Ao contrário do esperado, concentrações elevadas de Mito-T, a partir de 400  $\mu$ M, potencializaram a redução de viabilidade das células cardíacas induzida pela DOX. Tal efeito pode estar associado à ação pró-oxidante apresentada por algumas substâncias direcionadas para mitocôndrias, sob certas condições *in vitro* (RODRIGUEZ-CUENCA et al., 2010). Skulachev e colaboradores (2009) avaliando o efeito de antioxidantes direcionados para a mitocôndria sobre o envelhecimento e doenças associadas ao envelhecimento referem que a mitoquinona (MitoQ) pode apresentar propriedades pró e antioxidantes dependendo da concentração utilizada. Avaliando o efeito do MitoQ em mitocôndrias de músculo cardíaco de rato, os autores observaram que um pequeno aumento na concentração de MitoQ, de 300 para 500 nM, é responsável pela mudança da atividade da substância de antioxidante para pró-oxidante, respectivamente. Diferença maior entre a concentração associada à atividade anti e pró-oxidante (25 e 800 nM) foi observada, pelo mesmo grupo, para o plastoquinonil, substância similar ao MitoQ, mas cuja ubiquinona foi substituída por plastoquinona. Avaliando a toxicidade induzida por isoniazida em hepatócitos, Lee e colaboradores (2013) também não observaram redução da citotoxicidade com o pré-tratamento das células com Mito-T. Gouni-Berthold e colaboradores (2013), entretanto, demonstraram que a redução da viabilidade de células de músculo esquelético humano, induzida por sinvastatina, foi revertida pelo pré-tratamento com 100  $\mu$ M de Mito-T uma hora antes da exposição. Essa variedade de resultados revelando ou não atividade protetora do Mito-T e de substâncias semelhantes, indica que os mecanismos de ação relacionados à toxicidade de antioxidantes direcionados para mitocôndrias são diferentes e dependem das condições experimentais *in vitro*.

O pré-tratamento com AL, apesar de não proteger as células da redução de viabilidade promovida pela DOX, confirmou a ausência de toxicidade deste antioxidante, pois, nem a concentração mais elevada (1600  $\mu$ M) foi capaz de interferir na viabilidade das células tratadas com DOX. Ausência de alterações

morfológicas em células H9c2 tratadas com 500  $\mu\text{M}$  de AL também foi observada por Jiang e colaboradores (2014) ao avaliarem o efeito do antioxidante sobre a apoptose provocada pela produção excessiva de NO. Além disso, efeito protetor do AL contra a oxidação, apoptose e inflamação induzida por peróxido de hidrogênio foi verificado por Rahimifard e colaboradores (2015) em linfócitos humanos pré-tratados com diferentes concentrações do antioxidante. Os autores observaram que o tratamento das células com concentrações de até 1000  $\mu\text{M}$  de AL, 24 horas antes da exposição ao peróxido de hidrogênio, elevou a viabilidade e reduziu a peroxidação lipídica. Aumento da viabilidade e redução da morte de células H9c2 pré-tratadas com 300  $\mu\text{M}$  de AL e submetidas à condição de hipóxia e reoxigenação, também é referido na literatura (CAO et al., 2013).

A susceptibilidade dos fosfolípidios presentes nas membranas às espécies reativas de oxigênio pode resultar no desenvolvimento de peroxidação lipídica (WANG et al., 2015), que foi avaliada, neste trabalho, pela detecção de MLDA, um indicador de peroxidação lipídica mediado por ROS. Visando reduzir a possível toxicidade do Mito-T, o tempo total de incubação das células H9c2 com o antioxidante foi reduzido em seis horas, nos experimentos de avaliação da peroxidação lipídica, em comparação ao tempo utilizado nos experimentos de análise da viabilidade. Nas condições avaliadas, o pré-tratamento com Mito-T e AL não reduziu significativamente a peroxidação lipídica induzida pela DOX. A concentração de MLDA nas células pré-tratadas com AL, entretanto, foi visualmente menor do que a apresentada pelas células pré-tratadas com Mito-T nas duas concentrações avaliadas.

A ausência de proteção do Mito-T para células H9c2 é corroborada pelo trabalho de Wang e colaboradores (2015) que referem que o pré-tratamento de plaquetas com Mito-T inibiu apenas parcialmente o aumento da concentração de MLDA induzido pela DOX. Diferentemente da ausência de proteção observada nesses trabalhos, Alfonso-Loeches e colaboradores (2014), avaliando outros parâmetros, observaram que o tratamento de culturas de astrócitos com 500  $\mu\text{M}$  de Mito-T reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (mROS) e de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS ou ATP.

Redução da produção de ROS por células H9c2 pré-tratadas com 100  $\mu\text{M}$  de AL foi observada por Kim e colaboradores (2006) em trabalho avaliando a influência

da DOX na homeostase de cálcio e sua relação com a cardiotoxicidade. Proteção similar, representada por menor produção de ROS e redução de peroxidação lipídica, foi conferida a linfócitos pré-tratados com AL e incubados com peróxido de hidrogênio (RAHIMIFARD et al., 2015). Por outro lado, Bolognesi e colaboradores (2014) verificaram que a redução em 50% da produção de ROS por células de glioma humano submetidas a estresse oxidativo só foi evidenciada com a utilização de concentração de AL próxima da concentração tóxica para tais células.

Com base nos resultados dos experimentos *in vitro*, foi evidenciada a toxicidade da DOX para células cardíacas H9c2, tanto pela redução significativa da viabilidade quanto pelo aumento da peroxidação lipídica, representada pela elevação na concentração de MLDA. Entretanto, nas condições avaliadas, não foi observada ação cardioprotetora dos dois antioxidantes testados. Diante disso, e com base nos dados da literatura acerca dos efeitos do Mito-T e AL *in vitro*, torna-se evidente a necessidade de realização de novos estudos visando entender melhor os mecanismos de ação das duas substâncias frente ao estresse oxidativo, já que a proteção conferida por ambas depende de muitos fatores, a exemplo do tipo de estresse induzido, das células utilizadas, concentração das substâncias potencialmente protetoras e indutoras de dano, bem como do tempo de incubação das células com tais substâncias.

Paralelamente aos experimentos *in vitro*, foram conduzidos experimentos *in vivo* visando confirmar ou não a falta de proteção dos antioxidantes, uma vez que já foi demonstrado na literatura o efeito distinto de algumas substâncias comparando-se resultados de experimentos *in vitro* com o que ocorre *in vivo* (RODRIGUEZ-CUENCA et al., 2010).

Ratos e camundongos são os modelos experimentais mais utilizados para avaliação da cardiotoxicidade induzida pela DOX (MILANO et al., 2014; SINGLA, 2014; SU et al., 2014; TABACZAR et al., 2012) e há grande variação nas doses de DOX utilizadas e no tempo para análise dos parâmetros após a administração das substâncias potencialmente cardioprotetoras e do quimioterápico. Dessa forma, antes de avaliar o possível efeito cardioprotetor do Mito-T e AL, o tempo adequado para avaliação dos parâmetros indicativos de cardiotoxicidade e a dose de DOX mais efetiva para induzir tal toxicidade foram determinados. Em todos os experimentos foi avaliada a variação do peso corpóreo dos animais, como parâmetro indicativo de toxicidade geral, a atividade sérica da creatina quinase e ocorrência de

peroxidação lipídica no tecido e mitocôndrias cardíacas, como parâmetros relacionados à cardiotoxicidade.

Estudos avaliando a cardiotoxicidade induzida pela administração de dose única de DOX em camundongos revelam taxas de mortalidade variadas dependendo da dose administrada. Em virtude dos registros de óbitos ocorrerem a partir do terceiro dia (DHINGRA et al., 2014), foram avaliados, neste trabalho, os tempos de 24 e 48 horas após o tratamento com DOX.

O tratamento de camundongos de diferentes linhagens com a dose de 20 mg/kg de DOX, administrada uma única vez, é referido na literatura como suficiente para induzir cardiotoxicidade (MORI et al., 2010; RIAD et al., 2009). Entretanto, diferentemente do que é referido na literatura, não foi observada alteração indicativa de toxicidade nos animais tratados com essa dose de DOX, nos experimentos deste trabalho, considerando-se a maioria dos parâmetros avaliados (Figuras 19 a 21). Diante disso, novos experimentos foram conduzidos aumentando a dose do quimioterápico em 20%, ou seja, de 20 para 24 mg/kg, já que em alguns trabalhos nos quais os autores avaliaram a cardiotoxicidade crônica da DOX, os animais foram tratados com a dose cumulativa de 24 mg/kg (MILANO et al., 2014; WANG et al., 2013). O tratamento dos animais com essa dose de DOX promoveu alterações indicativas de toxicidade em todos os parâmetros avaliados, uma vez que foi observada redução significativa do peso corpóreo, aumento da atividade sérica de CK total e CK-MB, bem como elevação da concentração de MLDA no tecido e mitocôndrias cardíacas no tempo de 48 horas (Figuras 22 a 24).

Após a confirmação da dose de DOX indutora de cardiotoxicidade e do tempo para avaliação dos parâmetros propostos, o efeito cardioprotetor do Mito-T e do AL foi avaliado. Em virtude do Mito-T, em concentrações elevadas, ter reduzido a viabilidade de células H9c2 nos experimentos *in vitro*, seu efeito sobre os parâmetros indicativos de cardiotoxicidade em camundongos foi inicialmente avaliado.

A administração da dose única de 5 mg/kg de Mito-T 24 horas antes do tratamento dos animais com DOX não conferiu proteção em nenhum dos parâmetros avaliados (Figuras 25 a 27).

O efeito protetor evidenciado pelo tratamento de diversas disfunções orgânicas com antioxidantes, em geral é demonstrado com a administração de mais de uma dose das substâncias potencialmente protetoras (KARIMI et al., 2005;

MARTÍNEZ-REVELLES et al., 2013; SANTOS et al., 2007). Diante disso, foi verificado se a possível ação cardioprotetora do Mito-T também dependeria de mais de uma administração.

Não foi evidenciada proteção contra a redução do peso corpóreo e elevação da atividade sérica de CK em animais pré-tratados com duas doses de 5 mg/kg de Mito-T e posteriormente tratados com DOX. Em contrapartida, a administração de duas doses do antioxidante reduziu significativamente a concentração de MLDA em mitocôndrias cardíacas, confirmando a capacidade de direcionamento e acúmulo deste antioxidante nas mitocôndrias, conforme referido por Dikalova e colaboradores (2010). A peroxidação lipídica é considerada por Costa e colaboradores (2013) um dos principais indicadores de cardiotoxicidade da DOX, principalmente em condição de exposição aguda.

Em trabalho avaliando o efeito da administração de três diferentes doses de Mito-T (3, 10 e 30 mg/kg) sobre a disfunção mitocondrial renal em um modelo murino de sepse, Patil e colaboradores (2014) constataram que o tratamento com a dose de 10 mg/kg de Mito-T resultou em menor produção de superóxido nos túbulos renais. Os autores sugeriram que a falta de proteção conferida pela dose de 30 mg/kg pode estar relacionada ao acúmulo do antioxidante na mitocôndria e consequente despolarização da membrana da organela. Além disso, verificaram que a proteção renal foi evidenciada tanto pelo tratamento com o Mito-T no momento da indução do estresse oxidativo, quanto após, e que o antioxidante também aumentou a sobrevivência dos animais. Apesar de Patil e colaboradores (2014) não terem evidenciado efeito protetor do Mito-T com a administração da dose de 30 mg/kg, tem sido descrita na literatura a redução do estresse oxidativo em outros modelos experimentais com a utilização de protocolos de tratamento com doses acima de 5 mg/kg de Mito-T (DICKY et al., 2013). Diante disso, outros protocolos de tratamento utilizando doses mais elevadas de Mito-T foram avaliados e, nesses experimentos utilizando protocolos de tratamento com doses elevadas, o efeito cardioprotetor do AL também foi verificado.

A administração de Mito-T (12,5 mg/kg) ou AL (120 mg/kg) por três vezes, 24 hora antes, no mesmo dia e 24 horas após o tratamento com DOX, não conferiu proteção cardíaca aos animais. O peso corpóreo e a concentração de MLDA no tecido cardíaco dos animais de todos os grupos que receberam DOX foram similares, independente do tratamento com os antioxidantes (Figuras 31 e 33),

entretanto, apesar da ausência de diferença estatística significativa, os valores de atividade sérica de CK total e CK-MB apresentados pelos animais pré-tratados com os antioxidantes, principalmente com AL, foram inferiores aos apresentados pelos animais tratados apenas com DOX (Figura 32).

A avaliação dos mesmos parâmetros com a administração de duas doses de 20 mg/kg de Mito-T ou de 200 mg/kg de AL, 24 horas antes e no mesmo dia do tratamento com DOX, resultou no mesmo tipo de resposta quando foi avaliada a variação do peso corpóreo (Figura 34). Por outro lado, a atividade sérica de CK total foi significativamente menor nos animais pré-tratados com os antioxidantes em comparação aos animais tratados apenas com DOX, sendo que a redução foi mais significativa com o tratamento com AL do que com Mito-T (Figura 35 A). Resultado similar foi observado para a avaliação de CK-MB, entretanto, provavelmente pela elevada dispersão dentro de cada grupo, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa na comparação dos grupos entre si (Figura 35 B).

Al-Majed e colaboradores (2002) observaram redução significativa da atividade sérica de CK em ratos tratados com 100 mg/kg de AL, por via oral, durante cinco dias antes e dois dias após a administração de DOX, além de redução da concentração de MLDA no tecido cardíaco. Por outro lado, em trabalho avaliando a influência da suplementação com AL nos marcadores de estresse oxidativo em pacientes com esquizofrenia, Vidović e colaboradores (2014) verificaram que a suplementação com 500 mg do antioxidante por dia, durante 90 dias, não teve efeito sobre o estresse oxidativo apresentado pelos pacientes, mas reduziu a concentração de MLDA nos indivíduos do grupo controle, quando foi realizada a comparação com os valores basais apresentados antes do início da suplementação.

Os resultados obtidos com a administração do Mito-T e AL antes, durante e após o tratamento com DOX foram similares aos apresentados pelos animais que receberam os antioxidantes apenas antes e durante o tratamento com o quimioterápico. Shen e colaboradores (2013) avaliando a biodistribuição da DOX nas primeiras quatro horas de administração em camundongos da linhagem BALB/c em um modelo experimental de sarcoma, verificaram que a DOX se localizou principalmente no músculo cardíaco e tecido renal e hepático, na primeira hora após a administração. Após o período de quatro horas, a distribuição de DOX foi homogênea no coração, fígado, pulmão, baço e rim, mas sua concentração no tumor foi reduzida. Em trabalho com camundongos suíços, Osman e colaboradores (2009)

obtiveram resultados similares quanto ao acúmulo de DOX inicialmente no coração, rim e fígado e o pico de concentração plasmática foi registrado meia hora após a administração do quimioterápico. Esses dados podem explicar a cardiotoxicidade e eliminação relativamente rápida da droga, bem como o fato da administração dos antioxidantes após o tratamento não ter alterado os parâmetros avaliados neste trabalho.

Outros protocolos de tratamento e parâmetros adicionais precisam ser avaliados a fim de confirmar ou não o potencial cardioprotetor do Mito-T e AL, já que a proteção observada neste estudo não foi reproduzida em todos os experimentos, nem nos mesmos parâmetros por experimento. Entretanto, foi observada cardioproteção quando a maior dose de antioxidantes foi administrada. Além disso, os resultados do pré-tratamento com AL, nas condições aplicadas neste trabalho, indicaram que esse antioxidante não causou toxicidade em nenhuma das condições avaliadas, confirmando a segurança da sua utilização.

É referido na literatura que, em certas condições, a administração de substâncias com propriedades antioxidantes pode interferir na atividade antineoplásica de quimioterápicos (LI et al., 2014; VINCENT et al., 2013). Diante disso, foi investigado nesta tese se o AL causa alguma interferência na atividade antineoplásica da DOX em camundongos com melanoma. Para tanto, foi necessário padronizar o modelo experimental de melanoma localizado utilizando a administração subcutânea de células B16F10 em camundongos da linhagem C57BL/6. Foram avaliados três modelos que diferiram na quantidade de células injetadas e no local da injeção, sendo avaliada a administração das células tumorais no dorso (ZHAO et al., 2011), pata (RODRIGUES et al., 2010) e axila (CHEN et al., 2009; COSTA et al., 2015) dos animais. O modelo mais reprodutível, considerando a possibilidade de dissecação, mensuração do peso do tumor e a ocorrência de óbitos ao final do experimento, foi o que consistiu na administração das células na axila. Este modelo, portanto, foi selecionado para a análise da interferência do AL na atividade antineoplásica da DOX. A interferência do Mito-T na atividade antineoplásica da DOX não foi avaliada por limitações técnicas relacionadas à compra de reagentes.

A administração das células de melanoma resultou em perda significativa de peso de todos os animais em comparação àqueles do grupo controle (Figura 36),

confirmando que o modelo reproduz a perda de peso apresentada por muitos pacientes com câncer (TISDALE, 2009).

O fracionamento da dose de 24 mg/kg de DOX em quatro (Figura 37) ou três (Figura 38) injeções reduziu significativamente o peso do tumor, demonstrando que os protocolos de tratamento com DOX foram eficazes no controle tumoral. Esses resultados são corroborados por trabalhos na literatura que demonstram a eficácia do tratamento com DOX para o controle tumoral em diferentes modelos experimentais de carcinoma em camundongos (HASSAN et al., 2014; SONG et al., 2014; YUAN et al., 2013).

Adicionalmente, o tratamento com AL antes de cada injeção de DOX (Figura 37), ou antes, durante e depois (Figura 38), não interferiu na atividade antitumoral do quimioterápico. A identificação de substâncias que reduzam a toxicidade dos quimioterápicos sem afetar sua eficácia terapêutica motiva a realização de diversos trabalhos na literatura, porém, ainda não há um consenso para a indicação da terapia adjuvante em virtude da variação nos resultados obtidos.

Heaney e colaboradores (2008) verificaram redução da citotoxicidade da DOX para células tumorais em camundongos tratados com vitamina C duas horas antes da administração de DOX. Os autores observaram tamanho tumoral cerca de quatro vezes maior nesses animais do que nos camundongos tratados apenas com o quimioterápico. Por outro lado, ao avaliarem os efeitos modulatórios do meloxicam sobre a atividade antitumoral e cardiotoxicidade da DOX em um modelo murino de carcinoma mamário, Hassan e colaboradores (2014) referiram proteção cardíaca sem interferência na atividade antitumoral com a administração do meloxicam uma hora antes do tratamento com DOX. Resultado similar também foi obtido por Indu e colaboradores (2015) com a administração oral de carotenoides em camundongos com tumor 24 horas após o tratamento com a dose única de 25 mg/kg de DOX. Adicionalmente, Alkreathy e colaboradores (2012) referiram que o tratamento de camundongos suíços com extrato de alho por seis dias antes do tratamento com DOX, além de conferir proteção cardíaca, aumentou a atividade citotóxica da DOX sobre células tumorais em um modelo murino de carcinoma de Ehrlich.

A falta de interferência do AL sobre a atividade antitumoral da DOX, apresentada neste trabalho, levanta a possibilidade de utilização desse antioxidante como um adjuvante cardioprotetor durante a quimioterapia com DOX. O efeito cardioprotetor do AL nesse modelo de tratamento com doses fracionadas de DOX

em camundongos com melanoma, entretanto, ainda precisa ser avaliado. Além disso, outros parâmetros para confirmar a falta de interferência do antioxidante na atividade antitumoral da DOX precisam ser avaliados.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A atividade antioxidante do Mito-T sobre o radical DPPH foi evidenciada pela primeira vez e pareceu mais elevada do que a atividade apresentada pelo AL que é reconhecido na literatura como um potente antioxidante;
- Nenhum dos dois antioxidantes avaliados neste trabalho protegeu células H9c2 da toxicidade induzida pela DOX *in vitro*;
- O direcionamento do Mito-T para mitocôndrias foi confirmado pela redução da peroxidação lipídica de mitocôndrias cardíacas em animais tratados com duas doses de Mito-T, indicando provável efeito cardioprotetor do antioxidante;
- A administração de duas doses de Mito-T e AL conferiu proteção cardíaca constatada pela redução da atividade sérica de CK total nos animais;
- O AL não interferiu na atividade antitumoral da DOX contra melanoma *in vivo*, indicando que esse antioxidante pode ser candidato a adjuvante cardioprotetor durante a quimioterapia com DOX. Esse efeito e a ação cardioprotetora, entretanto, precisam ser ratificados com a realização de novos estudos avaliando outros parâmetros.

## REFERÊNCIAS

- ABDELLA, B. R.; FISHER, J. A chemical perspective on the anthracycline antitumor antibiotics. **Environmental Health Perspectives**, v. 64, p. 4–18, 1985.
- ADAMS, J. E.; ABENDSCHEIN, D. R.; JAFFE, A. S. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s? **Circulation**, v. 88, n. 2, p. 750–763, 1993.
- AKBAS, H. S.; TIMUR, M.; OZBEN, T. Concurrent use of antioxidants in cancer therapy: an update. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 2, n. 6, p. 931–939, 2006.
- AKIYAMA, N.; UMEDA, I. O.; SOGO, S.; et al. 5-S-GAD, a novel radical scavenging compound, prevents lens opacity development. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 4, p. 511–519, 2009.
- ALBERTS, D. S.; MUGGIA, F. M.; CARMICHAEL, J.; et al. Efficacy and safety of liposomal anthracyclines in Phase I/II clinical trials. **Seminars in Oncology**, v. 31, n. SUPPL. 13, p. 53–90, 2004.
- ALFONSO-LOECHES, S.; UREÑA-PERALTA, J. R.; MORILLO-BARGUES, M. J.; OLIVER-DE LA CRUZ, J.; GUERRI, C. Role of mitochondria ROS generation in ethanol-induced NLRP3 inflammasome activation and cell death in astroglial cells. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, n. August, p. 1–18, 2014.
- ALKREATHY, H. M.; DAMANHOURI, Z. A.; AHMED, N.; SLEVIN, M.; OSMAN, A.-M. M. Mechanisms of Cardioprotective Effect of Aged Garlic Extract Against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Integrative Cancer Therapies**, v. 11, n. 4, p. 364–370, 2012.
- AL-MAJED, A. A.; GADO, A. M.; AL-SHABANAH, O. A.; MANSOUR, M. A. Alpha-lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. **Pharmacological Research**, v. 46, n. 6, p. 499–503, 2002.
- ARAI, M.; TOMARU, K.; TAKIZAWA, T.; et al. Sarcoplasmic Reticulum Genes are Selectively Down-regulated in Cardiomyopathy Produced by Doxorubicin in Rabbits. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 30, n. 2, p. 243–254, 1998.
- ARCAMONE, F.; FRANCESCHI, G.; PENCO, S.; SELVA, A. Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. **Tetrahedron Letters**, v. 10, n. 13, p. 1007–1010, 1969.
- AYAZ, S. A.; BHANDARI, U.; PILLAI, K. K. Influence of DL  $\alpha$ -lipoic acid and vitamin-E against doxorubicin-induced biochemical and histological changes in the cardiac tissue of rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 37, n. 5, p. 294–299, 2005.

BALACHANDAR, A.; MALARKODI, K.; VARALAKSHMI, P. Protective role of DL $\alpha$ -lipoic acid against adriamycin-induced cardiac lipid peroxidation. **Human & Experimental Toxicology**, v. 22, n. 5, p. 249–254, 2003.

BERRAK, S.; EWER, M.; JAFFE, N.; et al. Doxorubicin cardiotoxicity in children: Reduced incidence of cardiac dysfunction associated with continuous-infusion schedules. **Oncology Reports**, v. 8, n. 3, p. 611–614, 2001.

BOLISETTY, S.; JAIMES, E. A. Mitochondria and reactive oxygen species: Physiology and pathophysiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 6306–6344, 2013.

BOLOGNESI, M. L.; BERGAMINI, C.; FATO, R.; et al. Synthesis of new lipoic acid conjugates and evaluation of their free radical scavenging and neuroprotective activities. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 83, n. 6, p. 688–696, 2014.

BONADONNA, G.; MONFARDINI, S.; LENA, M. DE; FOSSATI-BELLANI, F.; BERETTA, G. Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin (NSC 123127). **Cancer Research**, v. 30, n. 10, p. 2572–2582, 1970.

BOVO, E.; LIPSIUS, S. L.; ZIMA, A. V. Reactive oxygen species contribute to the development of arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> waves during  $\beta$ -adrenergic receptor stimulation in rabbit cardiomyocytes. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 14, p. 3291–3304, 2012.

BRYANT, J.; PICOT, J.; LEVITT, G.; et al. Cardioprotection against the toxic effects of anthracyclines given to children with cancer: a systematic review. **Health Technology Assessment (Winchester, England)**, 2007.

CAO, X.; CHEN, A.; YANG, P.; et al. Alpha-lipoic acid protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by inhibiting autophagy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 441, n. 4, p. 935–940, 2013.

CELIK, H.; ARINÇ, E. Bioreduction of idarubicin and formation of ROS responsible for DNA cleavage by NADPH-cytochrome P450 reductase and its potential role in the antitumor effect. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 68–82, 2008.

CHEN, L.; SUN, B.; ZHANG, S.; et al. Influence of microenvironments on microcirculation patterns and tumor invasion-related protein expression in melanoma. **Oncology Reports**, v. 21, n. 4, p. 917–923, 2009.

COLEMAN, M. D.; EASON, R. C.; BAILEY, C. J. The therapeutic use of lipoic acid in diabetes: A current perspective. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 167–172, 2001.

COSTA, E. V.; MENEZES, L. R. A.; ROCHA, S. L. A.; et al. Antitumor Properties of the Leaf Essential Oil of *Zornia brasiliensis*. **Planta Medica**, v. 81, n. 7, p. 563–567, 2015.

COSTA, V. M.; CARVALHO, F.; BASTOS, M. L.; et al. Contribution of catecholamine reactive intermediates and oxidative stress to the pathologic features of heart diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 2272–2314, 2011.

COSTA, V. M.; CARVALHO, F.; DUARTE, J. A.; BASTOS, M. D. L.; REMIÃO, F. The Heart As a Target for Xenobiotic Toxicity: The Cardiac Susceptibility to Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 9, p. 1285–1311, 2013.

CUSACK, B. J.; YOUNG, S. P.; GABRIEL, H.; OLSON, R. D. Effect of aging on cardiac contractility in a rat model of chronic daunorubicin cardiotoxicity. **Cardiovascular Toxicology**, v. 2, n. 2, p. 99–109, 2002.

DAI, W.; YANG, T.; WANG, Y.; et al. Peptide PHSCNK as an integrin  $\alpha 5\beta 1$  antagonist targets stealth liposomes to integrin-overexpressing melanoma. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 7, p. 1152–1161, 2012.

DALEN, E. C. VAN; CARON, H. N.; DICKINSON, H. O.; KREMER, L. C. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, p. 1–74, 2008.

DANZ, E. D. B.; SKRAMSTED, J.; HENRY, N.; et al. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1589–1597, 2009.

DAOSUKHO, C.; CHEN, Y.; NOEL, T.; et al. Phenylbutyrate, a histone deacetylase inhibitor, protects against adriamycin-induced cardiac injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 12, p. 1818–1825, 2007.

DENG, C.; SUN, Z.; TONG, G.; et al.  $\alpha$ -Lipoic Acid Reduces Infarct Size and Preserves Cardiac Function in Rat Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury through Activation of PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58371, 2013.

DERES, P.; HALMOSI, R.; TOTH, A.; et al. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 45, n. 1, p. 36–43, 2005.

DHINGRA, R.; MARGULETS, V.; CHOWDHURY, S. R.; et al. Bnip3 mediates doxorubicin-induced cardiac myocyte necrosis and mortality through changes in mitochondrial signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 51, p. E5537–E5544, 2014.

DICKEY, J. S.; GONZALEZ, Y.; ARYAL, B.; et al. Mito-Tempol and Dexrazoxane Exhibit Cardioprotective and Chemotherapeutic Effects through Specific Protein Oxidation and Autophagy in a Syngeneic Breast Tumor Preclinical Model. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70575, 2013.

DIKALOVA, A. E.; BIKINEYEVA, A. T.; BUDZYN, K.; et al. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. **Circulation Research**, v. 107, n. 1, p. 106–116, 2010.

DIKALOVA, A. E.; KIRILYUK, I. A.; DIKALOV, S. I. Antihypertensive effect of mitochondria-targeted proxyl nitroxides. **Redox Biology**, v. 4, p. 355–362, 2015.

DOROSHOW, J. H.; LOCKER, G. Y.; MYERS, C. E. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites. Alterations produced by doxorubicin. **Journal of Clinical Investigation**, v. 65, n. 1, p. 128–135, 1980.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D. Alpha-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Technology & Therapeutics**, v. 2, n. 3, p. 401–413, 2000.

FELESZKO, W.; MLYNARCZUK, I.; OLSZEWSKA, D.; et al. Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicin in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism. **International Journal of Cancer**, v. 100, p. 111–118, 2002.

FERIDOONI, T.; DONALD, C. MAC; SHAO, D.; YEUNG, P.; AGU, R. U. Cytoprotective potential of anti-ischemic drugs against chemotherapy-induced cardiotoxicity in H9c2 myoblast cell line. **Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)**, v. 63, n. 4, p. 493–503, 2013.

FERNÁNDEZ-VIZARRA, E.; FERRÍN, G.; PÉREZ-MARTOS, A.; et al. Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. **Mitochondrion**, v. 10, n. 3, p. 253–262, 2010.

FERRANS, V. J.; CLARK, J. R.; ZHANG, J.; YU, Z. X.; HERMAN, E. H. Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy. **Tsitologiya**, v. 39, n. 10, p. 928–937, 1997.

FINSTERER, J.; OHNSORGE, P. Influence of mitochondrion-toxic agents on the cardiovascular system. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 67, n. 3, p. 434–445, 2013.

FORREST, G. L.; GONZALEZ, B.; TSENG, W.; LI, X.; MANN, J. Human carbonyl reductase overexpression in the heart advances the development of doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. **Cancer Research**, v. 60, n. 18, p. 5158–5164, 2000.

GARCIA, E. J.; CADORIN OLDONI, T. L.; ALENCAR, S. M. DE; et al. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n. 1, p. 22–27, 2012.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 98, p. 727–741, 1999.

GHIBU, S.; DELEMASURE, S.; RICHARD, C.; et al. General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid. **Biochimie**, v. 94, n. 4, p. 932–939, 2012.

GIANNI, L.; HERMAN, E. H.; LIPSHULTZ, S. E.; et al. Anthracycline Cardiotoxicity: From Bench to Bedside. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 22, p. 3777–3784, 2008.

GOUNI-BERTHOLD, I.; BERTHOLD, H. K.; HUH, J. Y.; et al. Effects of lipid-lowering drugs on irisin in human subjects in vivo and in human skeletal muscle cells ex vivo. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72858, 2013.

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, C. L.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, MC. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1425–1438, 2010.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 922–935, 1999.

GU, J.; HU, W.; ZHANG, D. Resveratrol, a polyphenol phytoalexin, protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, p. n/a–n/a, 2015.

HALE, J. P.; LEWIS, I. J. Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. **Archives of Disease in Childhood**, v. 71, n. 5, p. 457–462, 1994.

HASINOFF, B. B.; HERMAN, E. H. Dexrazoxane: How it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug? **Cardiovascular Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 140–144, 2007.

HASSAN, M. H.; EL-BESHBISHY, H. A.; ALY, H.; et al. Modulatory effects of meloxicam on cardiotoxicity and antitumor activity of doxorubicin in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 74, n. 3, p. 559–569, 2014.

HEANEY, M. L.; GARDNER, J. R.; KARASAVVAS, N.; et al. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. **Cancer Research**, v. 68, n. 19, p. 8031–8038, 2008.

HEIBEIN, A. D.; GUO, B.; SPROWL, J. A.; MACLEAN, D. A.; PARISSENTI, A. M. Role of aldo-keto reductases and other doxorubicin pharmacokinetic genes in doxorubicin resistance, DNA binding, and subcellular localization. **BMC Cancer**, v. 12, n. 381, p. 1–14, 2012.

HENSLEY, M. L.; HAGERTY, K. L.; KEWALRAMANI, T.; et al. American society of clinical oncology 2008 clinical practice guideline update: Use of chemotherapy and radiation therapy protectants. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 1, p. 127–145, 2009.

HESCHELER, J.; MEYER, R.; PLANT, S.; et al. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. **Circulation Research**, v. 69, n. 6, p. 1476–1486, 1991.

HOFF, D. D. VON; LAYARD, M. W.; BASA, P.; et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. **Annals of Internal Medicine**, v. 91, n. 5, p. 710–717, 1979.

HOSSEINI, A.; SHAFIEE-NICK, R.; MOUSAVI, S. H. Combination of *Nigella sativa* with *Glycyrrhiza glabra* and *Zingiber officinale* augments their protective effects on doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cells. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 12, p. 993–1000, 2014.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841–1856, 2005.

HUSSEIN, A.; AHMED, A. A E.; SHOUMAN, S. A.; SHARAWY, S. Ameliorating effect of DL- $\alpha$ -lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and cardiotoxicity in experimental animals. **Drug Discoveries & Therapeutics**, v. 6, n. 3, p. 147–156, 2012.

IKEGAMI, T.; SUZUKI, Y.; SHIMIZU, T.; et al. Model mice for tissue-specific deletion of the manganese superoxide dismutase (MnSOD) gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 296, n. 3, p. 729–736, 2002.

IMONDI, A R.; TORRE, P. DELLA; MAZUÉ, G.; et al. Dose-response relationship of dexrazoxane for prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice, rats, and dogs. **Cancer Research**, v. 56, n. 18, p. 4200–4204, 1996.

KAGAN, V. E.; BAYIR, A.; BAYIR, H.; et al. Mitochondria-targeted disruptors and inhibitors of cytochrome c /cardiolipin peroxidase complexes: A new strategy in anti-apoptotic drug discovery. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. 1, p. 104–114, 2009.

KANG, Y. J.; SUN, X.; CHEN, Y.; ZHOU, Z. Inhibition of doxorubicin chronic toxicity in catalase-overexpressing transgenic mouse hearts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 1–6, 2002.

KANTROWITZ, N. E.; BRISTOW, M. R. Cardiotoxicity of antitumor agents. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 27, n. 3, p. 195–200, 1984.

KARIMI, G.; RAMEZANI, M.; ABDI, A. Protective effects of lycopene and tomato extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 10, p. 912–914, 2005.

KELSO, G. F.; PORTEOUS, C. M.; HUGHES, G.; et al. Prevention of mitochondrial oxidative damage using targeted antioxidants. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 959, p. 263–274, 2002.

KIM, K.-H.; OUDIT, G. Y.; BACKX, P. H. Erythropoietin Protects against Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-Dependent Pathway. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, n. 1, p. 160–169, 2007.

KIM, S. Y.; KIM, S. J.; KIM, B. J.; et al. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 38, n. 5, p. 535–545, 2006.

KIYOMIYA, K. I.; MATSUO, S.; KUREBE, M. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: The mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex. **Cancer Research**, v. 61, n. 6, p. 2467–2471, 2001.

KLAUNIG, J. E.; WANG, Z.; PU, X.; ZHOU, S. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 254, n. 2, p. 86–99, 2011.

KRISHNA, M. C.; RUSSO, A.; MITCHELL, J. B.; et al. Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O<sub>2</sub> or as SOD mimics? **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 42, p. 26026–26031, 1996.

LADAS, E. J.; JACOBSON, J. S.; KENNEDY, D. D.; et al. Antioxidants and cancer therapy: A systematic review. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 3, p. 517–528, 2004.

LAL, A.; ATAMNA, W.; KILLILEA, D. W.; SUH, J. H.; AMES, B. N. Lipoic acid and acetyl-carnitine reverse iron-induced oxidative stress in human fibroblasts. **Redox Report**, v. 13, n. 1, p. 2–10, 2008.

LEE, H. S.; NA, M. H.; KIM, W. K.  $\alpha$ -Lipoic acid reduces matrix metalloproteinase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Nutrition Research**, v. 30, n. 6, p. 403–409, 2010.

LEE, K. K.; FUJIMOTO, K.; ZHANG, C.; et al. Isoniazid-induced cell death is precipitated by underlying mitochondrial complex I dysfunction in mouse hepatocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 584–594, 2013.

LEFRAK, E. A.; PIŤHA, J.; ROSENHEIM, S.; GOTTLIEB, J. A. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. **Cancer**, v. 32, n. 2, p. 302–314, 1973.

LI, B.; KIM, D.; YADAV, R.; KIM, H.; CHAE, H. Sulforaphane prevents doxorubicin-induced oxidative stress and cell death in rat H9c2 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 36, n. 1, p. 53–64, 2015.

LI, K.; SUNG, R. Y. T.; HUANG, W. Z.; et al. Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. **Circulation**, v. 113, p. 2211–2220, 2006.

LI, N.; SUN, C.; ZHOU, B.; et al. Low Concentration of Quercetin Antagonizes the Cytotoxic Effects of Anti-Neoplastic Drugs in Ovarian Cancer. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e100314, 2014.

LI, T.; DANELISEN, I.; SINGAL, P. K. Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 232, n. 1-2, p. 19–26, 2002.

LIBERMAN, E. A.; TOPALY, V. P.; TSOFINA, L. M.; JASAITIS, A. A.; SKULACHEV, V. P. Mechanism of coupling of oxidative phosphorylation and the membrane potential of mitochondria. **Nature**, v. 222, n. 5198, p. 1076–1078, 1969.

LIPSHULTZ, S. E.; COLAN, S. D.; GELBER, R. D.; et al. Late Cardiac Effects of Doxorubicin Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Childhood. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 12, p. 808–815, 1991.

LIPSHULTZ, S. E.; LIPSITZ, S. R.; SALLAN, S. E.; et al. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 12, p. 2629–2636, 2005.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MAASE, H. VON DER; HANSEN, S. W.; ROBERTS, J. T.; et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: Results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 17, p. 3068–3077, 2000.

MARCILLAT, O.; ZHANG, Y.; DAVIES, K. J. Oxidative and non-oxidative mechanisms in the inactivation of cardiac mitochondrial electron transport chain components by doxorubicin. **The Biochemical Journal**, v. 259, n. 1, p. 181–189, 1989.

MARTÍNEZ-REVELLES, S.; AVENDAÑO, M. S.; GARCÍA-REDONDO, A. B.; et al. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 1, p. 51–65, 2013.

MENNA, P.; MINOTTI, G.; SALVATORELLI, E. In vitro modeling of the structure-activity determinants of anthracycline cardiotoxicity. **Cell Biology and Toxicology**, v. 23, n. 1, p. 49–62, 2007.

MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; MINOTTI, G. Cardiotoxicity of antitumor drugs. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 978–989, 2008.

MERTEN, K. E.; JIANG, Y.; FENG, W.; KANG, Y. J. Calcineurin Activation Is Not Necessary for Doxorubicin- Induced Hypertrophy in H9c2 Embryonic Rat Cardiac Cells: Involvement of the Phosphoinositide 3-Kinase-Akt Pathway. **Pharmacology**, v. 319, n. 2, p. 934–940, 2006.

MEYER, J. N.; LEUNG, M. C. K.; ROONEY, J. P.; et al. Mitochondria as a target of environmental toxicants. **Toxicological Sciences**, v. 134, n. 1, p. 1–17, 2013.

MILANO, G.; RAUCCI, A.; SCOPECE, A.; et al. Doxorubicin and trastuzumab regimen induces biventricular failure in mice. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 27, n. 5, p. 568–579, 2014.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines : Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 2, p. 185–229, 2004.

MIRANDA-VILELA, A. L.; GRISOLIA, C. K.; LONGO, J. P. F.; et al. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: Hematological, toxicological and histopathological evaluations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1161–1176, 2014.

MONSUEZ, J. J.; CHARNIOT, J. C.; VIGNAT, N.; ARTIGOU, J. Y. Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. **International Journal of Cardiology**, v. 144, n. 1, p. 3–15, 2010.

MORDENTE, A.; SILVESTRINI, A.; MARTORANA, G. E.; TAVIAN, D.; MEUCCI, E. Inhibition of Anthracycline Alcohol Metabolites Formation in Human Heart Cytosol: a Potential Role for Several Promising Drugs. **Drug Metabolism and Disposition**, 2015.

MORI, H.; NAKAMACHI, T.; OHTAKI, H.; et al. Cardioprotective Effect of Endogenous Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide on Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Mice. **Circulation Journal**, v. 74, n. 6, p. 1183–1190, 2010.

MOSS, R. W. Should Patients Undergoing Chemotherapy and Radiotherapy Be Prescribed Antioxidants? **Integrative Cancer Therapies**, v. 5, n. 1, p. 63–82, 2006.

MUKHOPADHYAY, P.; RAJESH, M.; BATKAI, S.; et al. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, v. 296, n. 5, p. H1466–H1483, 2009.

MURPHY, M. P.; SMITH, R. A. J. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 629–656, 2007.

NAIR, C. K.; INDU, R.; AZHAR, T.; NAIR, A. Amelioration of doxorubicin induced cardio-and hepato-toxicity by carotenoids. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, n. 1, p. 62–67, 2014.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, p. 205–208, 1997.

NAMIECINSKI, M.; PULASKI, L.; KOCHMAN, A.; et al. Cytotoxicity, cytoprotection and neurotoxicity of novel deprenyl-related propargylmaines, stable nitroxide free radicals, in vitro and in vivo. **In Vivo**, v. 18, n. 2, p. 171–180, 2004.

OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C. G.; GABRIELSON, K. L.; et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 6, p. 1213–1225, 2012.

OLSON, L. E.; BEDJA, D.; ALVEY, S. J.; et al. Protection from Doxorubicin-Induced Cardiac Toxicity in Mice with a Null Allele of Carbonyl Reductase. **Cancer Research**, v. 63, n. 20, p. 6602–6606, 2003.

OLSON, R. D.; MUSHLIN, P. S. Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 13, p. 3076–3086, 1990.

OSMAN, A. M. M.; NEMNEM, M. M.; ABOU-BAKR, A. A.; NASSIER, O. A.; KHAYYAL, M. T. Effect of methimazole treatment on doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 10, p. 2425–2430, 2009.

OTÁLORA, B. B.; MADRID, J. A.; ALVAREZ, N.; VICENTE, V.; ROL, M. A. Effects of exogenous melatonin and circadian synchronization on tumor progression in melanoma-bearing C57BL6 mice. **Journal of Pineal Research**, v. 44, n. 3, p. 307–315, 2008.

OU, P.; TRITSCHLER, H. J.; WOLFF, S. P. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant? **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 123–126, 1995.

OUTOMURO, D.; GRANA, D. R.; AZZATO, F.; MILEI, J. Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem? **International Journal of Cardiology**, v. 117, n. 1, p. 6–15, 2007.

OZBEN, T. Oxidative stress and apoptosis: Impact on cancer therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 9, p. 2181–2196, 2007.

PACHER, P.; LIAUDET, L.; BAI, P.; et al. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction. **Circulation**, v. 107, n. 6, p. 896–904, 2003.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 2, p. 227–250, 1995.

PAI, V. B.; NAHATA, M. C. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. **Drug Safety: an international journal of medical toxicology and drug experience**, v. 22, n. 4, p. 263–302, 2000.

PAN, S.; WANG, N.; BISETTO, S.; YI, B.; SHEU, S.-S. Downregulation of adenine nucleotide translocator 1 exacerbates tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated cardiac inflammatory responses. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 308, n. 1, p. H39–48, 2015.

PANCHUK, R. R.; PRYLUTSKA, S. V.; CHUMAK, V. V.; et al. Application of C60 Fullerene-Doxorubicin Complex for Tumor Cell Treatment In Vitro and In Vivo. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 11, n. 7, p. 1139–1152, 2015.

PATIL, N. K.; PARAJULI, N.; MACMILLAN-CROW, L. A.; MAYEUX, P. R. Inactivation of renal mitochondrial respiratory complexes and manganese superoxide dismutase during sepsis: mitochondria-targeted antioxidant mitigates injury. **AJP: Renal Physiology**, v. 306, n. 7, p. F734–F743, 2014.

PEDERZOLLI, C. D.; ROSA, A. P.; OLIVEIRA, A. S. DE; et al. Neuroprotective role of lipoic acid against acute toxicity of N-acetylaspartic acid. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 344, n. 1-2, p. 231–239, 2010.

PEREGO, P.; CORNA, E.; CESARE, M. DE; et al. Role of Apoptosis and Apoptosis-Related Genes in Cellular Response and Antitumor Efficacy of Anthracyclines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 31–37, 2001.

RAHIMIFARD, M.; NAVAEI-NIGJEH, M.; BAEERI, M.; MAQBOOL, F.; ABDOLLAHI, M. Multiple protective mechanisms of alpha-lipoic acid in oxidation, apoptosis and inflammation against hydrogen peroxide induced toxicity in human lymphocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 403, n. 1-2, p. 179–186, 2015.

RIAD, A.; BIEN, S.; WESTERMANN, D.; et al. Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of doxorubicin in mice. **Cancer Research**, v. 69, n. 2, p. 695–699, 2009.

RODRIGUES, D. B.; CHAMMAS, R.; MALAVASI, N. V.; et al. Anti-tumor therapy with macroencapsulated endostatin producer cells. **BMC Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2010.

RODRIGUEZ-CUENCA, S.; COCHEMÉ, H. M.; LOGAN, A.; et al. Consequences of long-term oral administration of the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ to wild-type mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 1, p. 161–172, 2010.

ROSS, M. F.; KELSO, G. F.; BLAIKIE, F. H.; et al. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, p. 222–230, 2005.

ROZADOS, V. R.; HINRICHSEN, L. I.; BINDA, M. M.; et al. Lovastatin enhances the antitumoral and apoptotic activity of doxorubicin in murine tumor models. **Oncology Reports**, v. 19, p. 1205–1211, 2008.

SANTOS, R. V. T.; BATISTA JR, M. L.; CAPERUTO, E. C.; ROSA, L. F. B. P. C. Chronic supplementation of creatine and vitamins C and E increases survival and improves biochemical parameters after doxorubicin treatment in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, p. 1294–1299, 2007.

SAWICKI, K. T.; SHANG, M.; WU, R.; et al. Increased Heme Levels in the Heart Lead to Exacerbated Ischemic Injury. **Journal of the American Heart Association**, v. 4, n. 8, p. e002272, 2015.

SAYED-AHMED, M. M.; SALMAN, T. M.; GABALLAH, H. E.; et al. Propionyl- L - Carnitine as protector against adriamycin-induced Cardiomyopathy. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 6, p. 513–520, 2001.

SCULLY, R. E.; LIPSHULTZ, S. E. Anthracycline cardiotoxicity in long-term survivors of childhood cancer. **Cardiovascular Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 122–128, 2007.

SHAN, K.; LINCOFF, A. M.; YOUNG, J. B. Anthracycline-induced cardiotoxicity. **Annals of Internal Medicine**, 1. Jul. 1996. Disponível em: <<http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-125-1-199607010-00008>>. .

SHAY, K. P.; MOREAU, R. F.; SMITH, E. J.; SMITH, A. R.; HAGEN, T. M. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1790, n. 10, p. 1149–1160, 2009.

SHEN, J. M.; GAO, F. Y.; YIN, T.; et al. CRGD-functionalized polymeric magnetic nanoparticles as a dual-drug delivery system for safe targeted cancer therapy. **Pharmacological Research**, v. 70, n. 1, p. 102–115, 2013.

SHI, S.; SHI, K.; TAN, L.; et al. The use of cationic MPEG-PCL-g-PEI micelles for co-delivery of Msurvivin T34A gene and doxorubicin. **Biomaterials**, v. 35, n. 15, p. 4536–4547, 2014.

SIMBRE, V. C.; DUFFY, S. A.; DADLANI, G. H.; MILLER, T. L.; LIPSHULTZ, S. E. Cardiotoxicity of cancer chemotherapy: Implications for children. **Pediatric Drugs**, v. 7, n. 3, p. 187–202, 2005.

ŠIMŮNEK, T.; ŠTĚRBA, M.; POPELOVÁ, O.; et al. Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 1, p. 154–171, 2009.

SINGAL, P. K.; LI, T.; KUMAR, D.; DANELISEN, I.; ILISKOVIC, N. Adriamycin-induced heart-failure: mechanism and modulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 207, p. 77–85, 2000.

SINGH, G.; SINGH, A. T.; ABRAHAM, A.; et al. Protective effects of Terminalia arjuna against Doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 123–129, 2008.

SINGLA, D. K. Akt-mTOR Pathway Inhibits Apoptosis and Fibrosis in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Following Embryonic Stem Cell Transplantation. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 6, p. 1031–1042, 2015.

SKULACHEV, V. P.; ANISIMOV, V. N.; ANTONENKO, Y. N.; et al. An attempt to prevent senescence: A mitochondrial approach. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1787, n. 5, p. 437–461, 2009.

SMITH, L. A.; CORNELIUS, V. R.; PLUMMER, C. J.; et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2010.

SMITH, R. A. J.; PORTEOUS, C. M.; GANE, A. M.; MURPHY, M. P. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 9, p. 5407–5412, 2003.

SONG, Q.; TAN, S.; ZHUANG, X.; et al. Nitric Oxide Releasing  $\alpha$ -Tocopheryl Polyethylene Glycol Succinate for Enhancing Antitumor Activity of Doxorubicin. **Molecular Pharmaceutics**, v. 11, n. 11, p. 4118–4129, 2014.

SOULE, B. P.; HYODO, F.; MATSUMOTO, K. I.; et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1632–1650, 2007.

SPEEDING, M.; TILLEMENT, J. P.; MORIN, D.; RIDANT, A. LE. Medicines interacting with mitochondria: anti-ischemic effects of trimetazidine. **Therapie**, v. 54, n. 5, p. 627–635, 1999.

SPYCHER, S. E.; TABATABA-VAKILI, S.; O'DONNELL, V. B.; PALOMBA, L.; AZZI, A. Aldose reductase induction: a novel response to oxidative stress of smooth muscle cells. **The FASEB Journal**, v. 11, n. 2, p. 181–188, 1997.

ŠTĚRBA, M.; POPELOVÁ, O.; LENČO, J.; et al. Proteomic insights into chronic anthracycline cardiotoxicity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 50, n. 5, p. 849–862, 2011.

STEWART, D. J.; GREWAAL, D.; GREEN, R. M.; et al. Concentrations of doxorubicin and its metabolites in human autopsy heart and other tissues. **Anticancer Research**, v. 13, n. 6 A, p. 1945–1952, 1993.

SU, S.; LI, Q.; LIU, Y.; et al. Sesamin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity: Involvement of Sirt1 and Mn-SOD pathway. **Toxicology Letters**, v. 224, n. 2, p. 257–263, 2014.

SWAIN, S. M.; WHALEY, F. S.; EWER, M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. **Cancer**, v. 97, n. 11, p. 2869–2879, 2003.

TABACZAR, S.; DOMERADZKA, K.; CZEPAS, J.; et al. Anti-tumor potential of nitroxyl derivative Pirolin in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model: A comparison with quercetin. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 3, p. 527–534, 2015.

TABACZAR, S.; KOCEVA-CHYLA, A.; CZEPAS, J.; et al. Nitroxide pirolin reduces oxidative stress generated by doxorubicin and docetaxel in blood plasma of rats bearing mammary tumor. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 2, p. 153–163, 2012.

TEBBI, C. K.; LONDON, W. B.; FRIEDMAN, D.; et al. Dexrazoxane-associated risk for acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome and other secondary malignancies in pediatric Hodgkin's disease. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 5, p. 493–500, 2007.

THOMPSON, K. L.; ROSENZWEIG, B. A.; ZHANG, J.; et al. Early alterations in heart gene expression profiles associated with doxorubicin cardiotoxicity in rats. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v. 66, n. 2, p. 303–314, 2010.

TISDALE, M. J. Mechanisms of Cancer Cachexia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 381–410, 2009.

TOKLU, H. Z.; HAKAN, T.; CELIK, H.; et al. Neuroprotective effects of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury in rats. **The Journal of Spinal Cord Medicine**, v. 33, n. 4, p. 401–409, 2010.

TRNKA, J.; BLAIKIE, F. H.; LOGAN, A.; SMITH, R. A J.; MURPHY, M. P. Antioxidant properties of MitoTEMPOL and its hydroxylamine. **Free radical research**, v. 43, n. 1, p. 4–12, 2009.

TURDI, S.; XU, P.; LI, Q.; et al. Amidization of doxorubicin alleviates doxorubicin-induced contractile dysfunction and reduced survival in murine cardiomyocytes. **Toxicology Letters**, v. 178, p. 197–201, 2008.

UNAL, F.; TANER, G.; YUZBASIOGLU, D.; YILMAZ, S. Antigenotoxic effect of lipoic acid against mitomycin-C in human lymphocyte cultures. **Cytotechnology**, v. 65, n. 4, p. 553–565, 2013.

VEJPONGSA, P.; YEH, E. T. H. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 64, n. 9, p. 938–945, 2014.

VIDOVIĆ, B.; MILOVANOVIĆ, S.; DORĐEVIĆ, B.; et al. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative stress markers and antioxidative defense in patients with schizophrenia. **Psychiatria Danubina**, v. 26, n. 3, p. 205–213, 2014.

VINCENT, D. T.; IBRAHIM, Y. F.; ESPEY, M. G.; SUZUKI, Y. J. The role of antioxidants in the era of cardio-oncology. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 72, n. 6, p. 1157–1168, 2013.

VLACHANTONI, D.; BRAMALL, A. N.; MURPHY, M. P.; et al. Evidence of severe mitochondrial oxidative stress and a protective effect of low oxygen in mouse models of inherited photoreceptor degeneration. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 2, p. 322–335, 2011.

VOEST, E. E.; ACKER, S. A VAN; VIJGH, W. J. VAN DER; ASBECK, B. S. VAN; BAST, A. Comparison of different iron chelators as protective agents against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 26, n. 9, p. 1179–1185, 1994.

WALLACE, K. B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. **Pharmacology & Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 105–115, 2003.

WANG, X.-L.; WANG, X.; XIONG, L.-L.; et al. Salidroside Improves Doxorubicin-induced Cardiac Dysfunction by Suppression of Excessive Oxidative Stress and Cardiomyocyte Apoptosis. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 512–523, 2013.

WANG, Y. X.; KORTH, M. Effects of doxorubicin on excitation-contraction coupling in guinea pig ventricular myocardium. **Circulation Research**, v. 76, n. 4, p. 645–653, 1995.

WANG, Z.; CAI, F.; CHEN, X.; et al. The Role of Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species in Hyperthermia-Induced Platelet Apoptosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–14, 2013.

WANG, Z.; WANG, J.; XIE, R.; LIU, R.; LU, Y. Mitochondria-Derived Reactive Oxygen Species Play an Important Role in Doxorubicin-Induced Platelet Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 11087–11100, 2015.

WATKINS, S. J.; BORTHWICK, G. M.; ARTHUR, H. M. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 2, p. 125–131, 2011.

WOUTERS, K. A.; KREMER, L. C. M.; MILLER, T. L.; HERMAN, E. H.; LIPSHULTZ, S. E. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. **British Journal of Haematology**, v. 131, n. 5, p. 561–578, 2005.

XIN, H.; LIU, X. H.; ZHU, Y. Z. Herba leonurine attenuates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 612, n. 1-3, p. 75–79, 2009.

XU, J.; GAO, H.; SONG, L.; et al. Flaxseed oil and alpha-lipoic acid combination ameliorates hepatic oxidative stress and lipid accumulation in comparison to lard. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 58, p. 1–7, 2013.

YAO, Y.; LI, R.; MA, Y.; et al.  $\alpha$ -Lipoic acid increases tolerance of cardiomyoblasts to glucose/glucose oxidase-induced injury via ROS-dependent ERK1/2 activation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 4, p. 920–929, 2012.

YEN, H. C.; OBERLEY, T. D.; VICHITBANDHA, S.; HO, Y. S.; ST CLAIR, D. K. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 5, p. 1253–1260, 1996.

YU, A. F.; STEINGART, R. M.; FUSTER, V. Cardiomyopathy Associated with Cancer Therapy. **Journal of Cardiac Failure**, v. 20, n. 11, p. 841–852, 2014.

YUAN, A.; WU, J.; SONG, C.; et al. A novel self-assembly albumin nanocarrier for reducing doxorubicin-mediated cardiotoxicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1626–1635, 2013.

ZHANG, Y. FEI; WANG, J. C.; BIAN, D. Y.; ZHANG, X.; ZHANG, Q. Targeted delivery of RGD-modified liposomes encapsulating both combretastatin A-4 and doxorubicin for tumor therapy: In vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 74, n. 3, p. 467–473, 2010.

ZHAO, L.; ZHU, L.; LIU, F.; et al. pH triggered injectable amphiphilic hydrogel containing doxorubicin and paclitaxel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 410, n. 1-2, p. 83–91, 2011.

ZIMA, A. V.; BLATTER, L. A. Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. **Cardiovascular Research**, v. 71, n. 2, p. 310–321, 2006.

ZUCCHI, R.; DANESI, R. Cardiac Toxicity of Antineoplastic Anthracyclines. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 3, n. 2, p. 151–171, 2003.

## ARTIGOS PUBLICADOS

**Artigo 1:** ROCHA, V. C.; FRANÇA, L. S.; de ARAÚJO, C. F.; NG, A. M.; de ANDRADE, C. M.; et al. Protective effects of mito-TEMPO against doxorubicin cardiotoxicity in mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 77, n. 3, p. 659-662, 2015. doi: 10.1007/s00280-015-2949-7.

**Artigo 2:** PITANGA, T. N.; de ARAGÃO FRANÇA, L.; ROCHA, V. C.; MEIRELLES, T.; BORGES, V. M.; et al. Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. **BMC Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 21, 2014. doi: 10.1186/1471-2121-15-21.

**Artigo 3:** de ARAÚJO, C. F.; SILVA, V. M.; CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; ARAGÃO-FRANÇA, L. S.; ROCHA, V. C.; et al. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* amastigote extracts differ in their enhancement effect on *Leishmania* infection when injected intradermally. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 70, 2014. doi: 10.1186/1756-0500-7-70.

**Artigo 4:** CRONEMBERGER-ANDRADE, A.; ARAGÃO-FRANÇA, L.; de ARAUJO, C. F.; ROCHA, V. J.; et al. Extracellular vesicles from *Leishmania*-infected macrophages confer an anti-infection cytokine-production profile to naïve macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3161, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0003161.