



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Lívia Maria Beraldo Simões Mathias**

**Avaliação dos efeitos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)  
sobre a cardiotoxicidade aguda induzida pela  
doxorubicina em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Bertha Furlan Polegato

**Botucatu  
2017**

**Lívia Maria Beraldo Simões Mathias**

**Avaliação dos efeitos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.)  
sobre a cardiotoxicidade aguda induzida pela  
doxorubicina em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual  
Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”,  
Campus de Botucatu, para obtenção do  
título de mestre em Fisiopatologia em  
Clínica Médica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu  
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Mathias, Livia Maria Beraldo Simões.

Avaliação dos efeitos do açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) sobre a cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos / Livia Maria Beraldo Simões Mathias. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Bertha Furlan Polegato  
Capes: 20702027

1. Açaí - Uso terapêutico. 2. Cardiotoxicidade. 3. Agentes anti-inflamatórios. 4. Doxorubicina. 5. Antioxidantes. 6. Metabolismo energético. 7. Stress oxidativo. 8. Apoptose.

Palavras-chave: Açaí; Doxorubicina; Estresse oxidativo; Metabolismo energético.

# Dedicatória

Aos meus pais José Claudio e Édna Valéria por todo amor, educação e incentivo durante toda minha vida. Gostaria de agradecer em especial minha mãe por cuidar da minha filha durante a realização desse trabalho, pois sem ela nada disso seria possível.

Ao meu marido Ludovico, pelo amor, paciência, incentivo, apoio e por sempre acreditar em minha capacidade.

A minha filha Mirêla por despertar em mim a vontade de sempre buscar o melhor e ser minha inspiração e força para nunca desistir.

# Agradecimento especial

À minha orientadora Prof. Dra Bertha Furlan Polgato, por  
toda paciência, confiança, disponibilidade e empenho  
durante toda a realização desse trabalho. Muito Obrigada!

# Agradecimentos



Primeiramente a Deus por todas as bênçãos em minha vida.

A todos os docentes do departamento de clínica médica pelas realizações dos procedimentos e pelas contribuições durante todo o projeto, em especial à Dra Silméia Garcia Zanati Bazan, Dr Marcos F. Minicucci, Dr Leonardo A.M. Zornoff, Dr Sérgio A.R. de Paiva e Dra Paula S.A. Gaiola.

A professora Dra. Ana Angélica H. Fernandes do Instituto de Biociências - UNESP, pela realização das análises bioquímicas.

A equipe de laboratório Andréia, Renata, Renan, Fernanda, Tatiana, Amanda, Pamela, Priscila, Bruna Rafacho, Bruna Pereira e Bruna Camargo, Angélica, Diego por toda colaboração e ensinamento, em especial à minha grande e inseparável amiga Patrícia pela amizade desde a graduação e por estarmos juntas até hoje.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudos.

## Lista de abreviações

|                   |                                                                        |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------|
| AE                | diâmetro do átrio esquerdo                                             |
| Ao                | diâmetro da aorta                                                      |
| CAT               | catalase                                                               |
| + dP/dt           | primeira derivada positiva de pressão                                  |
| -dP/dt            | primeira derivada negativa de pressão                                  |
| E/A               | razão entre as ondas E e A                                             |
| EROs              | espécies reativas de oxigênio                                          |
| ERPP              | espessura relativa da parede                                           |
| FADH <sub>2</sub> | Dinucleotídeo de flavina e adenina                                     |
| FC                | frequência cardíaca                                                    |
| Fenc              | fração de encurtamento do ventrículo esquerdo                          |
| GAPDH             | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                               |
| GSH-Px            | glutathione peroxidase                                                 |
| MMP               | metaloproteinase de matriz                                             |
| NADH              | Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo                                     |
| NO                | óxido nítrico                                                          |
| onda A            | pico de velocidade do enchimento diastólico tardio                     |
| onda E            | pico de velocidade do enchimento diastólico inicial                    |
| PC                | peso corporal                                                          |
| PP                | espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo        |
| PSmáx             | pressão sistólica máxima atingida                                      |
| SIV               | espessura diastólica do septo                                          |
| SOD               | superóxido dismutase                                                   |
| TIMP              | inibidor tecidual de metaloproteinase                                  |
| TRIVc             | tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca |
| VD                | ventrículo direito                                                     |
| VE                | ventrículo esquerdo                                                    |
| VED               | diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo                             |
| VES               | diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo                              |

# Sumário

|                         |    |
|-------------------------|----|
| RESUMO .....            | 5  |
| ABSTRACT .....          | 8  |
| INTRODUÇÃO .....        | 11 |
| OBJETIVO.....           | 17 |
| MATERIAL E MÉTODO ..... | 19 |
| RESULTADOS .....        | 29 |
| DISCUSSÃO.....          | 34 |
| CONCLUSÃO .....         | 45 |
| REFERÊNCIAS.....        | 55 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1. Dados morfométricos.....                                                        | 47 |
| TABELA 2. Variáveis estruturais ao Ecocardiograma .....                                   | 47 |
| TABELA 3. Dados funcionais ao Ecocardiograma .....                                        | 48 |
| TABELA 4. Estudo do coração Isolado .....                                                 | 48 |
| TABELA 5. Metaloproteinase de matriz no miocárdio .....                                   | 48 |
| TABELA 6. Atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo .....                  | 49 |
| TABELA 7. Atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo energético do miocárdio ..... | 49 |
| TABELA 8. Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial .....                 | 49 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1. Delineamento experimental .....                                      | 50 |
| FIGURA 2. Evolução do Peso Corporal .....                                      | 50 |
| FIGURA 3. Ingestão de ração e água após a administração de doxorrubicina ..... | 51 |
| FIGURA 4. Expressão proteica de Bcl-2 no miocárdio.....                        | 51 |
| FIGURA 5. Expressão proteica de caspase-3.....                                 | 52 |
| FIGURA 6. Metaloproteinase de matriz no miocárdio .....                        | 53 |
| FIGURA 7. Concentração miocárdica de Hidroperóxido de Lipídeo .....            | 53 |
| FIGURA 8. Atividade da enzima Glutathione Peroxidase .....                     | 54 |
| FIGURA 9. Concentração sérica dos derivados do óxido nítrico.....              | 54 |

# Resumo

**Introdução:** a doxorubicina é um quimioterápico amplamente utilizado, mas apresenta a cardiotoxicidade como mais grave efeito colateral. A lesão miocárdica se inicia imediatamente após a infusão da droga e é mediada por lesão oxidativa, aumento de apoptose e ativação de metaloproteinases. O açaí é um fruto rico em antocianinas, que apresenta elevado efeito antioxidativo e anti-inflamatório. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do açaí na prevenção da disfunção ventricular e a influência no estresse oxidativo, na apoptose e na atividade das metaloproteinases de matriz no modelo experimental de cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos.

**Material e métodos:** Foram utilizados 64 ratos Wistar machos, alocados em 4 grupos: controle (C), açaí (A), doxorubicina (D) e açaí-doxorubicina (DA). Os ratos receberam dieta padrão (grupos C e D) ou dieta padrão suplementada com açaí a 5% (grupos A e DA) por 4 semanas. Após esse período receberam injeção de doxorubicina 20mg/kg (grupos D e DA) ou salina (grupos C e A). Quarenta e oito horas após a injeção, foi realizado ecocardiograma e estudo do coração isolado e em seguida foi realizada eutanásia. Foi coletado tecido cardíaco para realização de zimografia, Western blot, avaliação do estresse oxidativo e metabolismo energético, além da dosagem da concentração dos metabólitos de óxido nítrico (NO) no soro.

Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias e foi considerada significância estatística de 5%.

**Resultados:** Os animais que receberam doxorubicina apresentaram diminuição do peso corporal e diminuição da ingestão de água e ração após a injeção da droga e o açaí não interferiu nesses resultados. Quarenta e oito horas após a injeção da doxorubicina, os animais que receberam apresentaram aumento do átrio esquerdo, aumento do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, diminuição da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e diminuição da onda E' septal ao doppler tissular. Quando os ratos receberam doxorubicina e foram suplementados com açaí, houve melhora da fração de encurtamento e do E' septal. A doxorubicina reduziu a  $+dP/dt$ , a  $-dP/dt$  e a pressão sistólica máxima, sugerindo piora tanto na função sistólica,

quanto diastólica, no entanto o açaí não foi capaz de prevenir a disfunção ventricular no estudo do coração isolado. A doxorrubicina também ativou MMP-2, aumentou o estresse oxidativo, provocou alterações no metabolismo energético, com predomínio do metabolismo glicídico e causou aumento na apoptose, evidenciado por aumento na expressão proteica da caspase-3 ativa. Quando o açaí foi administrado conjuntamente, observamos melhora do metabolismo energético cardíaco, porém sem efeito na atividade de metaloproteinases de matriz, no estresse oxidativo ou na apoptose. Não observamos diferenças nas dosagens séricas dos metabólitos do NO entre os grupos.

**Conclusão:** A doxorrubicina induziu alterações na estrutura e função cardíaca, além de aumento do estresse oxidativo, mudanças no metabolismo energético, ativação de MMP-2 e aumento da apoptose. O açaí preveniu o aparecimento de disfunção cardíaca e atenuou as mudanças no metabolismo energético.

**Palavras chave:** estresse oxidativo, doxorrubicina, açaí, metabolismo energético



# ABSTRACT

**Introduction:** the doxorubicin is a widely used chemotherapeutic, but it presents cardiotoxicity as a most severe side effect. The myocardial injury immediately begins after the infusion of the drug and is mediated by oxidative injury, increased apoptosis and Metalloproteinases activation. The *açaí* berry is a fruit rich in anthocyanins, which provides high antirust and anti-inflammatory effect. The goal of this study is to evaluate the effect of the *açaí* berry in the prevention of ventricular dysfunction and the influence on oxidative stress, in the apoptosis and in the of matrix Metalloproteinases activity in the experimental model of acute cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats.

**Material and methods:** 64 male Wistar rats were used, allocated in four (4) groups: control (C), *açaí* (A), doxorubicin (D) and *açaí*-doxorubicin (AD). The rats received standard diet (groups C and D) or standard diet supplemented with *açaí* berry to 5% (groups A and AD) for 4 weeks. After this period the rats received doxorubicin injection 20 mg/kg (groups D and AD) or saline (groups C and A). Forty-eight hours after the injection, an Echocardiogram was performed and a study of the isolated heart, and the following procedure was the euthanasia performance. The cardiac tissue of the rats were collected for zymography, Western blot, oxidative stress and energy metabolism evaluation, as well as the metabolic concentration dosage determination of nitric oxide (NO) in the blood serum. The results were analyzed by a two-way ANOVA and there was a statistical significance of 5%.

**Results:** the rats who received doxorubicin showed decreased body weight and decreased water intake and feed after the drug injection and also the *açaí* berry did not interfere in the results. Forty-eight hours after the doxorubicin injection, the animals which were injected presented an increased left atrium, increased left ventricle systolic diameter, left ventricle systolic diameter decrease, left ventricle shortening and E' wave to doppler tissular decrease. When the rats received doxorubicin and were supplemented with *açaí* berry, there was an improvement of the shortening fraction an the E'. The doxorubicin reduced the  $+dP/dt$ ,  $-dP/dt$  and the maximum systolic pressure, suggesting a worsening in both systolic and diastolic function, however the *açaí* berry was not capable of preventing de ventricular

dysfunction on the study of the isolated heart. We did not observe any differences in the NO metabolites dosage between the groups. The doxorubicin also activated MMP-2, increased oxidative stress, caused changes in energetic metabolism, with predominance of the glycidic metabolism and caused an increase in the apoptosis, evidenced by the increase in the active caspase 3 expression. When the *açaí* berry was administered jointly, we observed an improvement of the cardiac energetic metabolism, with no effect in the metalloproteinases of matrix or in the apoptosis.

**Conclusion:** The doxorubicin induced alterations in the structure and cardiac functions, besides the increase of the oxidative stress, energetic metabolism changes, MMP-2 activation and increase in apoptosis. The *açaí* berry prevented cardiac dysfunction and attenuated the energetic metabolism changes.

**Keywords:** oxidative stress, doxorubicin, *açaí*, energy metabolism

# Introdução

A doxorubicina é um quimioterápico derivado do fungo *Streptomyces peucetius*, que é utilizado no tratamento de neoplasias hematológicas e tumores sólidos desde a década de 60 (1). Apesar de não serem totalmente conhecidos, os efeitos antineoplásicos da doxorubicina ocorrem por inibição da DNA topoisomerase II, inibição da síntese de macromoléculas por se inserir entre os pares de base do DNA, indução de apoptose e formação de radicais livres durante sua metabolização (2).

Apresenta efeitos colaterais como náuseas, vômitos, alopecia e neutropenia, mas o efeito colateral mais grave é a cardiotoxicidade, sendo muitas vezes limitante no tratamento. A cardiotoxicidade pode ser dividida clinicamente em 4 formas: cardiotoxicidade aguda, subaguda, crônica e tardia, a depender do tempo decorrido entre o uso da droga e o aparecimento de sintomas (3).

A cardiotoxicidade crônica é a mais estudada e se manifesta semanas a meses após a infusão da droga. Pode ocorrer em até 23% dos pacientes tratados e cursa com miocardiopatia dilatada e quadro clínico de insuficiência cardíaca. A incidência da cardiotoxicidade crônica é dependente da dose total utilizada de doxorubicina, sendo 500 a 550 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal a dose crítica para seu surgimento. Doses menores que essa podem causar insuficiência cardíaca em 0,1 a 0,2 % dos pacientes. A incidência chega próximo de 50% quando a dose total utilizada atinge 1000 mg/m<sup>2</sup> de superfície corporal (3).

Mesmo quando a dose utilizada é considerada segura, o paciente pode evoluir anos após o tratamento com insuficiência cardíaca. É chamada de cardiotoxicidade tardia e ocorre em 5 % dos pacientes tratados (4). A cardiotoxicidade subaguda é mais rara e manifesta-se, normalmente, como miocardite ou pericardite, em dias a semanas após o tratamento (5).

A cardiotoxicidade aguda é mais difícil de ser diagnosticada porque apresenta quadro clínico menos específico, sendo as alterações eletrocardiográficas as manifestações mais frequentes. Estima-se que 11% dos pacientes podem desenvolver o quadro de cardiotoxicidade aguda, que ocorre horas a dias após o uso da droga (5,6). Ainda é possível observar, neste período agudo, a ocorrência de morte súbita em 1 % dos pacientes, provavelmente devido a arritmias cardíacas.

Alguns fatores de risco contribuem para a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina. Entre eles podemos destacar: idade, sexo, terapia combinada, quimioterapia prévia, história de distúrbios cardiovasculares preexistentes, hipertensão, doenças hepáticas e desequilíbrios eletrolíticos como a hipocalemia (7).

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina são diversos e ainda não estão completamente elucidados. Acredita-se que ocorra, entre outras alterações, indução de apoptose, aumento do estresse oxidativo, ativação de metaloproteinases de matriz (MMP) e modificações no metabolismo energético do miocárdio.

Apesar da manifestação clínica ocorrer mais frequentemente semanas após o uso da droga, há evidências de que o mecanismo de agressão miocárdica tem início imediatamente após a infusão da doxorrubicina. Agudamente, a doxorrubicina é capaz de provocar disfunção ventricular esquerda sistólica e diastólica (8,9), aumento do estresse oxidativo (10) e aumento de atividade de MMP (11,12). As MMP são enzimas proteolíticas zinco-dependentes, produzidas na forma inativa e secretadas para o meio externo onde são ativadas. São essenciais para a manutenção normal dos tecidos, pois degradam componentes da matriz extracelular (13). Podem ser excessivamente ativadas sob qualquer estresse tecidual, seja químico ou mecânico, o que leva à quebra do colágeno tecidual e promove remodelação cardíaca. Mais recentemente, descobriu-se que as metaloproteinases podem ser ativadas também no interior das células e tem afinidade por uma série de proteínas, incluindo proteínas contráteis das células musculares (10,14), sendo um possível mecanismo contribuinte para a disfunção ventricular esquerda observada nesse modelo experimental. Um dos principais mediadores da ativação intracelular é o aumento do estresse oxidativo (15).

Com relação ao estresse oxidativo, a geração de espécies reativas de oxigênio mediada pela doxorrubicina ocorre por duas vias: 1) via enzimática, através do citocromo p450. Há redução da doxorrubicina pela NADPH redutase e formação de radical semiquinona, que em contato com  $O_2$  e  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) gera os radicais livres superóxido e hidroxil. 2) via não-enzimática, durante as reações da doxorrubicina envolvendo o ferro (2). Em consequência do aumento do estresse oxidativo, ocorre aumento da

peroxidação lipídica, que tem papel fundamental na lesão da membrana celular, vacuolização mitocondrial e perda de miofibrilas induzida pela doxorubicina (2). A administração de dose única de doxorubicina em ratos foi capaz de depletar os níveis cardíacos de glutathione peroxidase, que é uma enzima antioxidante, e aumentar os níveis de malondialdeído, que é um produto da peroxidação lipídica (16,17). O miocárdio é mais susceptível à lesão oxidativa porque apresenta baixos níveis de catalase e superóxido dismutase em comparação a outros órgãos, além da glutathione peroxidase ser rapidamente inativada quando exposta à doxorubicina (18,19).

O aumento do estresse oxidativo, por si só, é capaz de produzir lesão do miócito e provocar ativação de metaloproteinases, conforme anteriormente citado, mas também é um forte mecanismo indutor de apoptose. A doxorubicina promove ativação da p38 proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) e inibição da serina/treonina quinase (Akt), proteína citosólica que fornece sinal antiapoptótico (18). A apoptose também pode ser mediada por outras vias, além do estímulo oxidativo, como a via citocromo C. O citocromo C é uma proteína localizada na mitocôndria, que é liberada no interior da célula onde interage com procaspase-9, culminando com ativação da caspase-3, conhecidamente indutora de apoptose. Estudos mostram que a doxorubicina é capaz de aumentar as taxas de apoptose (16,20) e também a expressão e atividade de caspase-3, tanto aguda quanto cronicamente, em diferentes modelos experimentais (17,21,22). A regulação da apoptose também depende da concentração de proteínas, como Bax e Bcl-2. A formação de dímeros Bax-Bax cria poros na membrana mitocondrial e facilita a liberação de citocromo C, estimulando, por sua vez, a apoptose; a formação de dímeros Bcl-2-Bax previne a formação destes poros, inibindo apoptose (23). Após a administração de doxorubicina ocorre aumento da relação Bax/Bcl-2, constituindo importante estímulo apoptótico (24). Pesquisas evidenciam que a expressão aumentada de Bcl-2 pode levar células hematopoiéticas à morte induzida por citocinas e acúmulo de linfócitos, muitas vezes culminando em doenças autoimunes ou câncer (25).

Considerando-se a potencial gravidade do quadro de cardiotoxicidade, que muitas vezes pode limitar o tratamento efetivo das neoplasias, é importante a descoberta de estratégias ou substâncias que atenuem ou até mesmo

previnam o aparecimento da lesão cardíaca. Nesse sentido, as substâncias com potencial antioxidante merecem destaque, pois além do dano oxidativo constituir um fator de agressão direto ao miocárdio, ele também pode desencadear diversos outros mecanismos de lesão, conforme exposto anteriormente.

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é um fruto típico do norte do Brasil, extraído de palmeira amazônica da família *Aracaceae*, que contém aproximadamente 13% de proteína, 48% de lipídios e 1,5% de carboidrato (26). O fruto açaí é particularmente rico em ácidos graxos, apresentando uma sensação gordurosa ao toque. Contém altos níveis de ácido oléico que é um ácido graxo monoinsaturado, além do ácido linoléico, o famoso ômega 6 (27). Além disso, é rico em compostos fenólicos, como as antocianinas.

Diversos estudos já evidenciaram a elevada capacidade antioxidante do açaí (28-29), que está relacionada, principalmente, às antocianinas (30), as quais possuem ainda ação anti-inflamatória (30,31) e antiproliferativa contra células neoplásicas (33,34). A fim de aumentar a estabilidade e os efeitos antioxidantes, as antocianinas procuram se associar a outras moléculas. Essas associações químicas se fazem através de reações de copigmentações que são interações entre as antocianinas e outros compostos chamados de copigmentos que podem ser flavonóides, alcalóides, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, polissacarídeos ou metais, sendo nestes casos denominada de copigmentação intermolecular (35). As antocianinas, através dessas associações podem aumentar seu poder antioxidante, sendo responsáveis por muitas atividades biológicas: bactericida, antiviral, antialérgica, antitrombótica, antiinflamatória, anticarcinogênica, hepatoprotetora e vasodilatadora (36). Adicionalmente, pesquisas mostraram que o açaí foi capaz de induzir vasodilatação em vasos mesentéricos de ratos dependente da ação do óxido nítrico o que ressalta a possibilidade de efeitos benéficos do uso do açaí no tratamento de doenças cardiovasculares (37).

Estudo realizado com humanos mostrou que o consumo de suco de açaí aumentou a proteção antioxidante dos eritrócitos, reduziu a formação de espécies reativas de oxigênio nas células polimorfonucleares, reduziu a migração em direção a diferentes quimioatrativos pró-inflamatórios e inibiu a peroxidação lipídica (32). O consumo de açaí diminuiu os danos ao DNA



induzidos por  $H_2O_2$ , além de apresentar atividade anti-proliferativa e anti-carcinogênica em neoplasia de bexiga em camundongos (29).

Ratos tratados com doxorubicina que receberam suplementação dietética de morango, também rico em antocianinas, apresentaram melhora dos marcadores de estresse oxidativo, bem como melhora da atividade de enzimas antioxidantes e do funcionamento mitocondrial (38). No entanto, o efeito do açaí na prevenção da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina ainda não foi amplamente avaliado. Identificamos apenas um estudo em que o açaí se mostrou capaz de reduzir a genotoxicidade provocada pela doxorubicina em camundongos (39). A partir do exposto, elaboramos a hipótese que o açaí é capaz de atenuar a cardiotoxicidade aguda provocada pela doxorubicina em ratos.

# Objetivo

Avaliar o efeito do açaí na atenuação da disfunção ventricular esquerda e sua influência no estresse oxidativo, no metabolismo energético cardíaco, na apoptose e na atividade das MMP no modelo experimental de cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos.

# Material e Métodos

## **Delineamento**

O delineamento do estudo pode ser observado na figura 1. Foram utilizados 64 ratos Wistar machos, com peso corporal entre 250 e 300 g, que foram alocados em caixas individuais, mantidos sob temperatura controlada ( $23^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à água e comida, cujas ingestões foram mensuradas durante todo o estudo. Após o período de adaptação de 2 semanas, foi realizado ecocardiograma em todos os animais e os mesmos foram alocados em 4 grupos, com 16 animais cada: controle (C), doxorrubicina (D), açaí (A) e doxorrubicina/açaí (DA). Os grupos C e D receberam dieta padrão e os grupos A e DA receberam dieta padrão suplementada de açaí a 5% por 4 semanas. Após esse período, os animais receberam injeção intraperitoneal de doxorrubicina na dose de 20 mg/kg (grupos D e DA) ou injeção intraperitoneal de salina estéril em volume equivalente (grupos C e A). A dose de 20mg/kg de doxorrubicina é eficiente para provocar cardiotoxicidade, conforme já demonstrado em estudos anteriores (8,9,40,41). Quarenta e oito horas após a injeção de doxorrubicina ou salina os animais foram submetidos à ecocardiograma. Em seguida, foram anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg, IP) para realização do estudo do coração isolado (8 animais por grupo). O restante dos animais, anestesiados da mesma forma, foram submetidos à eutanásia por abertura do tórax e retirada do coração (8 animais por grupo). Os corações foram lavados em salina estéril, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em ultrafreezer à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  para as análises. Os ratos utilizados para o estudo do coração isolado são diferentes dos ratos utilizados para coleta do coração, pois a perfusão retrógrada necessária no estudo do coração isolado pode interferir com as análises bioquímicas do miocárdio.

## **Cálculo do tamanho amostral**

O cálculo do tamanho amostral foi realizado baseando-se na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, para obter uma diferença entre as médias de 0,08 e um desvio padrão de 0,065 (resultados obtidos em estudos prévios do grupo), considerando um poder de teste de 0,80 e um erro alfa de

0,0125 (devido à comparação de 4 grupos). Desse modo, foi obtido valor de  $n=16$  animais por grupo.

### **Preparação da dieta suplementada com açaí**

Foi utilizada polpa comercializada de açaí (Icefruit®) para preparar a ração. A polpa foi homogeneizada e incorporada à ração-padrão Nuvilab (Nuvital®) triturada, que foi novamente peletizada. A dose utilizada no estudo foi de 5%, proposta por Fragoso e colaboradores, que estudaram a suplementação de açaí no modelo de carcinogênese de cólon (34). O tratamento com a ração suplementada foi iniciado após o período de adaptação e continuada até o final do estudo.

### **Ecocardiograma**

O ecocardiograma foi realizado antes da injeção da doxorubicina (para mostrar a homogeneidade dos grupos) e 48 horas após a injeção de doxorubicina ou salina. Para isso, os animais receberam anestesia com ketamina (50 mg/kg, IP) e xilazina (1 mg/kg, IP) e foram posicionados em decúbito lateral esquerdo parcial. Todas as variáveis foram obtidas a partir dos cortes paraesternal eixo longo e curto e apical quatro câmaras. Os exames foram realizados pelo mesmo examinador, que foi cego em relação ao tratamento, com o aparelho Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Israel) dotado de transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz.

As variáveis morfológicas analisadas ao ecocardiograma foram: diâmetro do átrio esquerdo, espessura da parede posterior, diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo e diâmetro da aorta. Para avaliação da função diastólica foi mensurada, através do Doppler transmitral, a onda E, onda A e o tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo. Foi também realizado doppler tissular para avaliar função diastólica e função sistólica do ventrículo esquerdo. A frequência cardíaca foi calculada a partir da distância entre dois ciclos cardíacos consecutivos e todos os valores foram obtidos a partir da média de 3 batimentos consecutivos.

## **Estudo do coração isolado**

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg, IP) e submetidos à injeção intraperitoneal de 2000 UI de heparina não fracionada. Foi realizada a esternotomia mediana, com ventilação assistida, e dissecada a aorta ascendente. A aorta foi canulada e iniciada a perfusão retrógrada com solução de Krebs-Henseleit, filtrada com filtro de acetato de celulose com poro de 5  $\mu$ m (composição, em milimoles/litro: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,52 CaCl<sub>2</sub>; 1,16 MgSO<sub>4</sub>; 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,50 glicose; 25,88 NaHCO<sub>3</sub> e 8 manitol). Durante a perfusão do coração, a temperatura da solução e a pressão de perfusão foram mantidas constantes (37°C e 75 mmHg, respectivamente). A pressão parcial de oxigênio (PO<sub>2</sub>) da solução foi mantida por meio de contato da película de solução de Krebs com gás carbogênio (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>). O coração, conectado à cânula perfusora, foi rapidamente retirado e transferido para o aparato de perfusão de coração isolado tamanho 3, tipo 830 da Hugo Sachs Elektronik - March-Hugstetten, Germany. O átrio esquerdo foi retirado para a introdução de balão de látex na cavidade ventricular esquerda. O volume do balão foi conhecido em cada momento e este foi conectado a transdutor de pressão P23XL, que permite a aferição precisa da pressão ventricular durante todo o experimento. O volume no interior do balão foi variado para se obter uma variação da pressão diastólica de zero a 25 mmHg. A cada acréscimo de volume, foram registradas as curvas de pressão do VE e as derivadas temporais da pressão (+dP/dt e -dP/dt), utilizando-se polígrafo da GOULD, modelo Windograf.

## **Análise do estresse oxidativo**

A análise das defesas antioxidantes foi realizada por meio da determinação das atividades das enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase no tecido cardíaco. A oxidação foi medida por meio da determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo no tecido cardíaco. Amostras de 100 mg de tecido cardíaco foram homogeneizados em tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,4 e a seguir centrifugado a 12000 rpm, por 30 minutos a -4°C, segundo descrito por Pereira et al. (1998). O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais (g/100g de tecido).

- Determinação da atividade da Glutathione Peroxidase (GSH-Px) (E.C.1.11.1.9.): a atividade da GSH-Px foi determinada por meio da técnica descrita por Nakamura et al. (1974), em presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, azida sódica, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), glutathione reduzida (GSH) e glutathione redutase. Por meio da oxidação do metileno-tetraidrofolato redutase (NADPH<sub>2</sub>) a 340 nm na presença de glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada (GSSG), foi determinada a atividade da GSH-Px, expressa em nmol/mg de tecido.
- Determinação da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) (E.C.1.15.1.1.): a atividade da SOD foi determinada pela técnica de Crouch et al. (1981), tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução de nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura hidroxilamina em meio alcalino (pH 10). A hidroxilamina gera fluxo de O<sup>2-</sup> do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra é adicionada, a velocidade de redução do NBT é inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra. A atividade foi expressa em nmol/mg de proteínas totais.
- Determinação da atividade da Catalase (EC.1.11.1.6.): a atividade da catalase foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5ml de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 240nm. Os resultados foram expressos em μmol/mg de proteínas totais.
- Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídeo: foi medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe<sup>2+</sup>) medida por hidroperóxido, com 100 μl da amostra e 900 μl de mistura reagente de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>), 250 μM, ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 25 mM, xilenol orange 100 μM e butil-hidroxitolueno (BHT) 4 mM em 90% (v/v) metanol. A intensidade da coloração da reação foi medida espectrofotometricamente. A concentração do hidroperóxido de lipídeo foi expressa em nmol/g de tecido.

### **Avaliação do metabolismo energético**

Aproximadamente 100mg de amostras do VE foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M pH 7,0) e centrifugadas. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas e a atividade das



enzimas do metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons foi determinada após ressuspensão e centrifugação do pellet com tampão fosfato de sódio (0,1M) contendo 250mM de sacarose e 2mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (42). As leituras foram realizadas em leitor de microplaca com controle por software. Todos os reagentes foram obtidos do laboratório Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

- Determinação da atividade da  $\beta$ -OH-acil CoA-DH: determinada na presença de tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,0), EDTA, acetoacetil-CoA e NADH (43).

- Determinação da atividade da citrato sintase (CS): avaliada pela reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetato, reação catalisada pela CS, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA, oxaloacetato e dithiobis-2-nitrobenzoato em tampão fosfato Tris-HCl (50mM pH 8,0) (44).

- Determinação da atividade do complexo I: a atividade do complexo I foi determinada em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio (80mM pH 7,4), EDTA e NADH, onde se monitorou a velocidade de oxidação do NADH (45).

- Determinação da atividade do complexo II: a atividade enzimática do complexo II foi medida em meio com tampão fosfato de potássio (50mM pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e 2,6-diclorofenolindofenol, o qual teve absorbância a 600nm (46).

- Determinação da atividade da ATP sintase: a atividade da ATP sintase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM pH 8,0), na presença de  $MgCl_2$ , NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, lactato desidrogenase e piruvato quinase (47).

- Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK): a atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão Tris-HCl (50mM pH 8,0),  $MgCl_2$ , gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH<sub>2</sub> (43).

- Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH): a atividade da LDH foi determinada com a utilização do método UV otimizado, onde foi

medido o consumo de NADH<sub>2</sub>, que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

- Determinação da atividade da piruvato desidrogenase (PDH): na presença de tampão fosfato de potássio (50mM pH 7,4) foi determinada a atividade da PDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditioneitol, MgCl<sub>2</sub>, nitro blue tetrazolium (NBT), piruvato de sódio e fenassina metassulfato, onde mediu-se a conversão do piruvato em acetil coenzima A através da velocidade de redução do NAD (43).

### **Zimografia para análise da MMP-2**

Aproximadamente 30 mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X e 10 mM CaCl<sub>2</sub>. Para cada 30 mg de tecido foram adicionados 1,5 ml deste tampão. As amostras foram trituradas utilizando o aparelho Ultra Turrax, 21.000 rpm e centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada, utilizando método de Bradford e a concentração final ajustada. As amostras (10 µg de proteína) foram diluídas em tampão da amostra (0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol 50 %, e 0,05% de azul de bromofenol), aplicadas no gel de eletroforese de poliacrilamida a 8% e 1% de gelatina e a corrida foi realizada com aparato Bio-Rad mini-protean (110 V, por 2 horas), contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Após a corrida o gel foi lavado por uma hora em 2,5% Triton X-100 e após, em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 17 horas em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500mM de CaCl<sub>2</sub>, em agitação contínua e à temperatura de 37°C. Após a incubação o gel foi corado com coumassie brilliant blue 2,5% por 1 hora e descorado com solução de 30% metanol e 10% ácido acético. Os géis foram fotografados e analisados através do programa GelPro 32, que mediu a área de digestão da gelatina. Um mesmo animal do grupo controle foi incluído em todos os géis para normalização entre experimentos e a localização da MMP-2 foi feita utilizando-se a MMP-2 recombinante de rato/camundongo (R&D System) como padrão positivo.

## **Western blot para análise de apoptose**

A apoptose foi avaliada pela expressão de caspase-3 e bcl-2 no músculo cardíaco. Para isso, foram utilizados 100 mg de tecido cardíaco homogeneizados em tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, glicerol 10%, Tris 10 mM pH=7,4, EDTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma-Aldrich). O homogenato foi centrifugado (12000 rpm, 4°C, por 20 minutos) e o sobrenadante coletado. Foi determinada a quantidade de proteína nas amostras pelo método de Bradford.

As amostras foram diluídas em tampão Laemmli e separadas por eletroforese (sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell – BioRad, USA) em gel bifásico: de empilhamento (Tris-HCl 240 mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCl 240 mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed). A corrida foi realizada por 30 minutos a 50 V, seguidos de 2,5 horas a 120 V, com tampão de corrida contendo Tris 0,25 M, glicina 192 mM e SDS 1% e com temperatura de 4°C.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (BioRad, USA), utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário foram bloqueados por incubação em solução de 5% de leite em pó desnatado dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M, NaCl 5M e detergente Tween 20). Em seguida, foi colocado o anticorpo primário diluído em solução basal por 12 horas. Após, a membrana foi lavada 3 vezes com solução basal e incubada com anticorpo secundário por 1,5 horas, e lavada novamente com solução basal.

A imunodeteção foi realizada por método de quimioluminescência. As membranas foram analisadas no fotodocumentador ImageQuant LAS (General Eletricks) e as imagens geradas foram analisadas pelo programa Gel-Pro 32 (Media Cybernetics Rockville, EUA), onde as bandas foram quantificadas por densitometria.

Após, foi realizada a detecção da GAPDH para normalização das proteínas analisadas. As mesmas membranas foram lavadas com solução Stripping por 15 minutos e iniciado o processo de bloqueio, incubação com anticorpos para GAPDH e imunodeteção da mesma forma já descrita.

Os valores obtidos para as proteínas analisadas foram normalizados pelo GAPDH e a normalização entre as membranas foi feita por um mesmo animal controle que foi incluído em todas as corridas eletroforéticas.

Anticorpos primários utilizados:

- Caspase 3, rabbit monoclonal IgG (Cell Signaling Technology, Inc, Beverly, MA, USA, 9664).
- Bcl2, rabbit monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc492).
- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233).

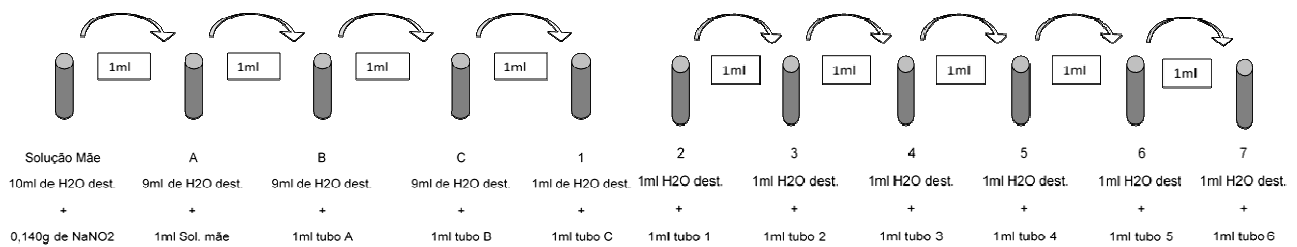
Anticorpos secundários utilizados:

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005).
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004).

### **Dosagem dos derivados do óxido nítrico**

Os níveis de nitrito e nitrato foram mensurados a partir de amostras do soro dos animais, os quais foram obtidos por centrifugação do sangue total a 4°C, por 20 minutos. Essas amostras foram mantidas congeladas à – 80 °C e depois descongeladas para a realização do procedimento. Para construção da curva de diluição, foi feita solução mãe, que apresentava 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada + 0,140g de NaNO<sub>2</sub>. Em seguida, a solução mãe foi diluída em tubos de ensaio envolvidos em papel alumínio, conforme figura abaixo, onde o tubo A apresentava 9 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml da solução mãe; o tubo B: 9 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml do tubo A; tubo C: 9 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml do tubo B; tubo 1: 1 ml de H<sub>2</sub>O destilada + 1 ml do tubo C; tubo 2: 1 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml do tubo 1; tubo 3: 1 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml do tubo 2; tubo 4: 1 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml do tubo 3; tubo 5: 1 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml do tubo 4; tubo 6: 1 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml do tubo 5; tubo 7: 1 ml de H<sub>2</sub>O + 1 ml do tubo 6. Os conteúdos dos tubos e as amostras de soro (100 µL) foram aplicados em placa de 96 poços, todos em duplicata. Foram acrescentados 100µl de PBS para o poço branco (sem qualquer amostra ou conteúdo dos tubos da curva), seguido de acréscimo de 100µl de reagente de Greiss em

todos os poços. Após 10 minutos, foi realizada a leitura em leitor de ELISA com filtro de 540 nm.



### Análise estatística

Para as variáveis paramétricas, os valores obtidos foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão, em relação às não paramétricas, as mesmas foram submetidas à transformação matemática para normalização e também apresentadas em média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre os grupos foram feitas por ANOVA de duas vias. As variáveis que não puderam ser normalizadas (consumo de água e ração, diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo e espessura diastólica do septo, SOD) foram analisadas por teste t ou Mann-Whitney; nesse caso o valor de p foi ajustado pela correção de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 5% para todas as análises.

Foi realizado teste de Análise de Covariância (ANCOVA) para ajuste dos resultados funcionais ao ecocardiograma pela frequência cardíaca, já que esta pode interferir com a função ventricular sistólica e diastólica.

# Resultados

### **Peso corporal, peso dos órgãos e consumo de ração e água**

Ao início do experimento todos os animais apresentavam peso corporal semelhante e mantiveram ganho de peso também semelhante ao longo do experimento. No entanto, quarenta e oito horas após a injeção da doxorubicina, os animais que receberam a droga apresentaram perda de peso corporal em relação aos animais que não receberam a droga. A evolução do peso dos animais após a injeção de doxorubicina pode ser observada na figura 2. Não observamos diferenças no peso do ventrículo direito, fígado e pulmão entre os grupos. O peso do ventrículo esquerdo foi menor entre os animais que receberam doxorubicina, porém quando normalizado pelo peso corporal observamos o aumento do peso do ventrículo esquerdo nesses mesmos animais. Não observamos qualquer efeito do açaí nessas variáveis. Esses resultados podem ser observados na tabela 1.

Durante o período de suplementação, a ingestão alimentar foi semelhante entre os grupos, porém após a administração da doxorubicina houve diminuição do consumo diário de ração entre os animais que receberam a droga. O mesmo comportamento pode ser observado em relação ao consumo de água, cuja ingestão foi menor no grupo D quando comparado ao grupo controle (Figura 3). Esses resultados demonstram o efeito tóxico geral provocado pela doxorubicina.

### **Estudo ecocardiográfico**

Os parâmetros ecocardiográficos foram semelhantes entre os grupos antes da administração da doxorubicina (dados não apresentados). Quarenta e oito horas após a injeção da droga, os animais que receberam doxorubicina apresentaram alterações tanto morfológicas, quanto funcionais. Entre as diferenças morfológicas, conseguimos observar o aumento do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e aumento do diâmetro do átrio esquerdo, inclusive quando normalizado pelo diâmetro da aorta, além da diminuição da frequência cardíaca. Quando os animais receberam doxorubicina em associação ao açaí (grupo DA), houve melhora no diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e no diâmetro do átrio esquerdo (Tabela 2).

Em relação às alterações funcionais, houve diminuição da fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e diminuição das ondas E' septal, E' lateral, S'septal e S' lateral ao doopler tissular (Tabela 3). Os ratos que receberam doxorubicina e foram suplementados com açaí (grupo DA) apresentaram melhora na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo e na onda E'septal, como mostra a tabela 3.

Devido ao fato de a frequência cardíaca interferir com a função cardíaca, realizamos ajuste dos parâmetros funcionais por ANCOVA e observamos, que mesmo quando ajustados para a frequência, os resultados permaneciam estatisticamente significantes.

### **Estudo do Coração Isolado**

Em relação à análise do coração isolado, os dados estão apresentados na tabela 4. A doxorubicina reduziu a  $+dP/dt$ , a  $-dP/dt$  e a pressão sistólica máxima, sugerindo piora tanto na função sistólica, quanto diastólica. Não houve interação entre a suplementação de açaí e o tratamento com doxorubicina no estudo do coração isolado.

### **Western Blot**

Não observamos diferenças entre os grupos na expressão da proteína Bcl-2 no musculo cardíaco, conforme observado na figura 4.

Em relação à caspase 3, esta aparece em 3 bandas diferentes, com peso molecular de 17 KDa, 19 KDa e 35 KDa. As bandas com 17 e 19 KDa correspondem à caspase-3 ativa, ao passo que a banda de 35 KDa corresponde à caspase-3 inativa. Não observamos diferenças em relação à banda de 17 KDa, bem como não houve diferença na caspase-3 inativa. Houve aumento da expressão proteica da caspase-3 ativa, com peso molecular de 19 KDa, dentre os animais que receberam o quimioterápico doxorubicina. Não observamos qualquer efeito do açaí em relação à expressão da caspase-3. Os resultados referentes à expressão proteica da caspase-3 podem ser vistos na figura 5.



### **Metaloproteinasas de matriz**

Como pode ser observado na tabela 5 e na figura 6, observamos que a administração de doxorubicina provocou aumento das bandas de MMP-2 com peso de 75 KDa e 72 KDa e a suplementação de açaí levou à diminuição da banda de 72 KDa em relação aos animais que não receberam açaí. No entanto, a suplementação de açaí não foi capaz de prevenir o aumento da MMP-2 dentre os animais tratados com a doxorubicina. Não observamos qualquer diferença entre os grupos ou tratamentos em relação à banda de MMP-2 de 64 KDa.

### **Estresse oxidativo**

Os ratos que receberam injeção de doxorubicina apresentaram maior concentração miocárdica de hidroperóxido de lipídio em comparação aos animais que não foram tratados com o quimioterápico e a administração de açaí provocou diminuição da concentração miocárdica do hidroperóxido de lipídeo, tanto nos animais que receberam doxorubicina quanto nos que não receberam, conforme observado na figura 7. O aumento do hidroperóxido de lipídeo nos animais tratados com doxorubicina foi acompanhado por diminuição da atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase, porém sem alteração da atividade da superóxido dismutase (tabela 6). Quando o açaí foi administrado em conjunto, observamos aumento da atividade da glutathione peroxidase, que atingiu valores semelhantes ao do grupo controle, conforme pode ser observado na figura 8.

### **Metabolismo energético e cadeia respiratória mitocondrial**

A administração da doxorubicina provocou aumento da atividade da fosfofrutoquinase, e lactato desidrogenase e diminuição da atividade da  $\beta$ -hidroxiacil desidrogenase, piruvato desidrogenase e da citrato sintase. Quando o açaí foi administrado em conjunto (grupo DA), observamos que houve melhora da atividade da fosfofrutoquinase,  $\beta$ -hidroxiacil desidrogenase e citrato

sintase, porém o açaí não interferiu com a atividade da lactato desidrogenase e piruvato desidrogenase. Esses resultados estão apresentados na tabela 7.

Com relação à atividade dos complexos enzimáticos mitocondriais, a doxorrubicina diminuiu a atividade do complexo I, complexo II e ATP sintase. A administração concomitante de açaí (grupo DA) provocou normalização dos níveis de ATP sintase, que atingiram valores próximos ao grupo controle e melhorou a atividade do complexo II. O açaí não provocou alterações na atividade do complexo I. Esses resultados estão apresentados na tabela 8.

### **Derivados do óxido nítrico**

Não observamos diferença entre os grupos na concentração sérica dos derivados do óxido nítrico, conforme pode ser observado na figura 9.

# Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de açaí na prevenção da disfunção ventricular e sua influência no estresse oxidativo, na apoptose e na atividade das metaloproteinases de matriz no modelo experimental de cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos. Nosso estudo mostrou que a doxorubicina induziu cardiotoxicidade, evidenciada por alterações morfológicas e funcionais cardíacas, além de aumentar MMP-2, o estresse oxidativo, a apoptose e alterar o metabolismo energético cardíaco. Quando o açaí foi administrado conjuntamente, observamos atenuação da disfunção cardíaca, normalização da atividade da enzima glutathione peroxidase e melhora do metabolismo energético cardíaco.

A doxorubicina pode provocar vômitos, alopecia e neutropenia como efeitos colaterais (3). Porém, observamos como efeito colateral geral que os animais que receberam doxorubicina apresentaram perda de peso corporal devido ao menor consumo de água e ração, além de diminuição do peso corporal. Como o período de perda de peso foi muito curto (48 horas), provavelmente a diminuição de peso ocorreu por provável diminuição da volemia dos animais, em concordância com alguns estudos prévios (3,48).

A diminuição da volemia pode ter como consequência diminuição da perfusão tecidual. Com a finalidade de promover reestabelecimento da perfusão orgânica, ocorre vasoconstrição periférica, que pode levar a aumento da pós-carga e pode contribuir para piora da função cardíaca, principalmente em corações com disfunção (49). Esse pode ter sido um dos fatores que podem ter contribuído para a piora da função sistólica observada em nosso estudo.

Estima-se que a taxa de mortalidade entre doentes oncológicos que desenvolvem cardiotoxicidade pelo uso de quimioterápicos como a doxorubicina pode ser muito elevada, com valores superiores a 60% talvez em dois anos (50). Todavia, o prognóstico pode ser alterado positivamente se houver uma prevenção e uma detecção precoce e, dentre esses fatores, além da adoção de hábitos de vida saudável pelos doentes, dieta com baixo teor em gorduras saturadas, restrição de agentes tóxicos como álcool e tabaco (51), podemos destacar também o consumo de alimentos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

O açaí é considerado um “superfruto” e, devido às suas propriedades nutricionais, observamos aumento no consumo desse fruto nacional e internacionalmente. Contêm em sua composição lipídeos (ácidos graxos insaturados), proteínas, fibras e minerais e altos teores de compostos antioxidantes, entre eles as antocianinas (52,53).

A cor típica do açaí é roxo-avermelhada e deve-se à presença de pigmentos naturais chamados de antocianinas, que são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides. Os flavonóides fazem parte de um vasto grupo de antioxidantes polifenólicos que ocorrem naturalmente em vegetais, frutas e em bebidas como chás e vinhos (54).

Nossos animais comiam, em média, 25g de ração suplementada com açaí a 5% diariamente, o que equivale a 1,25 gramas de polpa de açaí adicionadas na ração por dia. Para calcular a dose equivalente em humanos foi utilizada a equação de equivalência proposta por Reagan-Shaw e colaboradores (55). Chegamos ao resultado de que 1,25 gramas de polpa de açaí no rato equivalem a 39 gramas de açaí em humanos. A quantidade de 39 gramas de polpa de açaí pode ser convertida em 2,5 colheres de sopa diárias. A quantidade não é muito grande e o açaí pode ser encontrado com facilidade e preço acessível no Brasil durante o ano inteiro.

Segundo um estudo realizado por Passamonte, as antocianinas presentes no açaí podem ser absorvidas como moléculas intactas no estômago, ou ainda no intestino onde resiste à atividade enzimática da flora intestinal, pois estas moléculas já foram detectadas intactas no plasma e na urina (56).

A fim de determinar o mecanismo de ação e os efeitos farmacológicos das antocianinas na saúde do homem, vários estudos estão sendo realizados. Acreditam que, por se tratar de uma estrutura polifenólica, as antocianinas apresentam função antioxidante e anti-radicalar, protegendo o organismo contra o acúmulo de depósitos de colesterol nos vasos sangüíneos, processo que leva à aterosclerose. Pesquisas estão sugerindo que a elevada ingestão de antocianinas pode proteger contra doenças cardiovasculares (57).

Quando há desequilíbrio entre a produção de radicais livres, como espécies reativas de oxigênio (EROs), e as reservas antioxidantes do miocárdio ocorre o estresse oxidativo (58). Um agente antioxidante pode ser

definido como sendo um composto capaz de bloquear o efeito danoso dos radicais livres. Em situações habituais, existe um grande número de antioxidantes produzidos pelas células ou ingeridos através da alimentação que formam uma defesa natural contra os danos induzidos pelas espécies reativas (59, 60).

Os mecanismos de ação dos agentes antioxidantes são diversos, uma vez que os antioxidantes são de natureza variada. Entre esses mecanismos pode-se destacar a inibição de enzimas oxidantes e aumento das enzimas antioxidantes. As enzimas antioxidantes reconhecem especificamente as biomoléculas degradadas, as eliminam e substituem. Algumas neutralizam diretamente os iniciadores de reações radicalares, seja diminuindo as espécies radicalares, seja reciclando os antioxidantes (61). Entre as principais enzimas antioxidantes destacam-se a CAT, a SOD, a GSH-Px e a tiorredoxina. A SOD converte o radical superóxido a peróxido de hidrogênio, e este, posteriormente é convertido em água pela CAT e GSH-Px. GSH-Px é uma enzima antioxidante chave que catalisa a redução do  $H_2O_2$  e hidroperóxido. Ela não só elimina  $H_2O_2$ , mas também previne a formação de mais outros radicais tóxicos (62).

Uma das substâncias utilizada como marcador do estresse oxidativo é o hidroperóxido de lipídeo. Ele surge a partir da peroxidação de lipídios e sua decomposição resulta em produtos de maior reatividade e toxicidade, como os radicais peroxila (63). É importante ressaltar que, em nosso estudo, a doxorrubicina promoveu aumento do estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da concentração miocárdica de hidroperóxido de lipídeo. A suplementação de açaí provocou aumento da atividade da glutathione peroxidase nos animais tratados com doxorrubicina e diminuição da concentração miocárdica de hidroperóxido de lipídeo tanto dentre os animais que receberam doxorrubicina quanto dentre os que não receberam. Podemos afirmar, portanto, que o açaí preveniu o aumento do estresse oxidativo provocado pela doxorrubicina. A diminuição da atividade da glutathione peroxidase é fenômeno precoce e importante na cardiotoxicidade provocada pela doxorrubicina, uma vez que a doxorrubicina é capaz de inativar rapidamente a glutathione-peroxidase no tecido cardíaco (64).

Os radicais livres podem ser gerados a partir da exposição a fatores exógenos como fumaça de cigarro, radiação, medicamentos entre outros e a

partir de fatores endógenos como a inflamação, por exemplo, mas uma das principais fontes é o metabolismo mitocondrial (65). O coração é um órgão bastante susceptível à lesão oxidativa, pois apresenta alta densidade de mitocôndrias no tecido. Nos organismos aeróbios, o oxigênio consumido é reduzido à água na mitocôndria. A enzima catalisadora desta reação é a citocromo oxidase a qual impede a produção elevada de espécies reativas de oxigênio nas mitocôndrias das células. No entanto, de 2% a 5% do oxigênio consumido pelos organismos gera normalmente espécies reativas de oxigênio nestas organelas com a formação do íon superóxido e de peróxido de hidrogênio (66).

Os ácidos graxos são os principais substratos utilizado pela mitocôndria para fornecer energia cardíaca em condições aeróbicas (67). No citoplasma os ácidos graxos são convertidos em *acil-CoA* pela *acil-CoA sintase* formando *FA-acil-CoA* e 75% do *FA-acil-CoA* produzido é transferido para mitocôndria. Os restantes dos 25 % é armazenado como triglicerídeos para posterior oxidação (68). O *FA-acil-CoA* derivado do metabolismo dos ácidos graxos produz *acetil-CoA*. Vale ressaltar que o piruvato, derivado do metabolismo de carboidratos também gera *acetil-CoA* e um dos reguladores da oxidação do piruvato é a piruvato desidrogenase. O *acetil-CoA* que é produzido na  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos e na oxidação do piruvato entra no ciclo do ácido cítrico e gera NADH e FADH<sub>2</sub>. Esses produtos formados participam da cadeia transportadora de elétrons e gera gradientes eletroquímicos que fornece prótons para 5 complexos, onde o difosfato de adenosina é combinado com Pi (fosfato inorgânico), resultando na formação de ATP (69).

Durante o desenvolvimento de patologias cardíacas, pelo menos em suas fases iniciais, ocorre uma diminuição da utilização de ácidos graxos como substrato para geração de energia e utilização da glicose como resposta compensatória (70). O aumento dos níveis de catecolaminas e cortisol induzidos pela agressão cardíaca estimulam a lipólise levando a um aumento de ácidos graxos. Porém, os ácidos graxos necessitam de 10% a 12 % a mais de oxigênio do que a glicose para gerar a mesma quantidade de ATP. A oxidação de ácidos graxos produz calor em vez de ATP e nesta situação, um aumento na oxidação dos ácidos graxos pode desperdiçar oxigênio e agravar os danos ao coração.

Na remodelação e insuficiência cardíaca ocorre diminuição da síntese de moduladores de oxidação de ácidos graxos, o que resultará no acúmulo de lipídios no citoplasma. Por esses motivos, durante o processo de remodelação cardíaca a glicose é a fonte de energia preferencial, uma vez que ela gera uma maior quantidade de ATP por molécula de oxigênio consumida. A glicose mantém um nível razoável de produção de energia até que ocorra a lipotoxicidade. Nesta, os ácidos graxos não oxidados são armazenados em triglicerídeos que se acumulam no interior do citoplasma e exerce um efeito tóxico no coração (69).

Wakasugi e colegas demonstraram que ratos tratados com doxorubicina apresentaram uma importante redução tanto na utilização da glicose como na utilização dos ácidos graxos. No entanto, altas concentrações de doxorubicina foram necessárias para inibição da oxidação da glicose em comparação a oxidação de ácidos graxos (71).

Em nosso estudo, a doxorubicina levou a alterações no metabolismo energético características de situações patológicas, com aumento da atividade das enzimas envolvidas no metabolismo da glicose e diminuição da atividade da  $\beta$ -hidroxiacil-coenzimaA desidrogenase. A administração de açaí promoveu melhora na atividade da enzima  $\beta$ -hidroxiacil-coenzimaA desidrogenase e provocou diminuição da atividade da fosfofrutoquinase. Adicionalmente, podemos dizer que a suplementação de açaí também permitiu um funcionamento adequado do ciclo de Krebs, já que a atividade da citrato sintase, primeira enzima do ciclo, diminuiu com a administração de doxorubicina e a suplementação de açaí, apesar de não normalizar sua atividade, promoveu melhora em relação ao grupo que só recebeu doxorubicina. Desse modo, podemos afirmar que a suplementação de açaí juntamente com a doxorubicina favoreceu a manutenção do metabolismo miocárdico próximo a uma situação de normalidade.

Em desacordo com a literatura, onde foi observado maior atuação da doxorubicina nos complexos III e IV (não estudado nesse trabalho), pouca atuação no complexo I e nenhuma atuação no complexo II (70), nossa pesquisa evidenciou que a doxorubicina diminuiu a atividade dos complexos I, II e ATP sintase, o que poderia contribuir para a formação de mais radicais de



oxigênio e, conseqüentemente, maior estresse oxidativo, como observado em nosso estudo.

Podemos afirmar que o açaí atenuou a disfunção mitocondrial provocada pela doxorrubicina, pois normalizou a atividade da ATP sintase e melhorou consideravelmente a atividade do complexo II. No entanto, a melhora do metabolismo mitocondrial não foi suficiente para diminuir nosso marcador de estresse oxidativo (hidroperóxido de lipídeo), conforme citado anteriormente. Isso nos leva a crer que, neste modelo experimental, existem outras fontes produtoras de espécies reativas.

De fato, a doxorrubicina também interfere na atividade da NOS e pode gerar radical peroxinitrito e talvez esse radical tenha um papel mais importante na cardiotoxicidade que as EROs (72).

Em relação a apoptose, pode-se dizer que é um fenômeno de morte celular que ocorre individualmente, ou seja, a morte de uma célula não leva à morte de outras células. Na manutenção da homeostase tecidual, este processo de morte celular possui um papel essencial e é importante em certas condições patológicas, incluindo o câncer (73).

A maioria das alterações morfológicas observadas é causada por uma série de proteases, chamadas caspases, que são ativadas especificamente em células em apoptose (74). Como já foi citado anteriormente, a apoptose também pode ser regulada pela proteína Bcl-2, uma vez que esta previne a formação de poros na membrana mitocondrial e impede a liberação de citocromo C para o interior da célula, evitando assim a ativação da caspase-3 (23). A formação de dímeros Bcl-2-Bax previne a formação desses poros e inibe a apoptose (23). Com a administração da doxorrubicina ocorre aumento da relação Bax/Bcl-2 e isso provoca a formação de dímeros Bax-Bax, levando à formação de poros na membrana mitocondrial e promove a liberação do citocromo C, estimulando assim a apoptose.

Danos no DNA e nas vias de sinalização envolvendo o supressor tumoral p53 também podem estar envolvidos na morte de células cardíacas induzida pela doxorrubicina. Após ativação, o p53 induz a expressão de genes associados com a parada celular, reparo no DNA e apoptose (75).

Outro mecanismo de indução de apoptose pela doxorrubicina pode ser através da ativação da proteína p38 quinase que é ativada por mitógenos e

inibição da via PI3K e serina/treonina (Akt), proteínas que fornecem sinal antipoptótico (18, 72).

Verificamos que em nosso estudo que houve aumento da expressão de caspase-3 no músculo cardíaco dos animais que receberam doxorrubicina, no entanto, não observamos diferença estatisticamente significativa em relação à Bcl-2. O açaí não interferiu na expressão dessas proteínas.

Apesar de estudos anteriores mostrarem que a doxorrubicina promove alteração na Bcl-2 (76), talvez a relação entre a expressão proteica de Bcl-2 e Bax seja mais importante que alterações na expressão da Bcl-2 isoladamente (23).

Após o uso da doxorrubicina, o coração pode sofrer alterações bioquímicas e moleculares importantes que cursam com importantes alterações na sua função (51). Como já citado anteriormente, o estresse oxidativo pode ativar as metaloproteinases de matriz (MMP), que são enzimas responsáveis pela degradação de componentes da matriz extracelular, atuando no desenvolvimento normal dos tecidos ou em processos patológicos (77).

Essas MMP pertencem a uma família grande de enzimas zinco-dependentes, que desempenham importante função no desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares (78). No coração, podemos destacar duas enzimas, também classificadas como gelatinases: a MMP-2 e a MMP-9. A estrutura e função da matriz extracelular são mantidas pelas MMPs, enquanto que sua atividade é regulada pelos TIMPs (inibidor tecidual de metaloproteinase). Desta forma, o aumento da atividade de MMP está associado à degradação da matriz extracelular e aumento da produção de TIMP está associado a menor degradação de colágeno e subsequente fibrose.

No geral, em situações fisiológicas, a produção de MMP e TIMP encontra-se em equilíbrio, porém, em situações patológicas, a ativação de MMP e a degradação excessiva da matriz extracelular pode levar a expansão do VE e está associada à remodelação cardíaca e insuficiência cardíaca (12,79). Alterações nos níveis de MMP-2 e MMP-9 no miocárdio foram observadas em doenças hipertensivas utilizando ratos como modelo experimental, no infarto do miocárdio, bem como após tratamento agudo e crônico com doxorrubicina (15,80). De acordo com vários estudos, a

administração de doxorrubicina provoca, agudamente, aumento de MMP-2 (81).

As MMP são produzidas em sua forma inativa e, para que sejam ativadas, há a necessidade de clivagem do peptídeo que cobre o sítio de ação da enzima. A quebra desse peptídeo confere às MMP ativas menor peso molecular que suas formas inativas. Deste modo, a banda inferior da MMP-2, ou seja, a mais leve, apresenta peso molecular de 64 KDa. A banda superior à banda ativa corresponde à MMP-2 inativa e apresenta peso molecular de 72 KDa. Além disso, em roedores, é possível identificar uma banda de MMP-2 com peso molecular de 75 KDa (82). Em nosso estudo, houve aumento da banda de 75 KDa e 72 KDa nos animais que receberam a doxorrubicina, semelhante a resultado prévio na literatura (80), e diminuição da banda de 72 KDa dentre os animais que foram suplementados com açaí; no entanto, o açaí não foi capaz de prevenir o aumento de MMP-2 nos animais que receberam a doxorrubicina. Identificamos apenas um estudo que avaliou o efeito do açaí na expressão e atividade de MMP-2 no tecido cardíaco. Este estudo não mostrou qualquer efeito do uso do açaí isoladamente na atividade de MMP-2 (83).

Um dos fatores mais potentes de ativação de MMP-2 é o aumento do estresse oxidativo e nossos resultados sugerem que o açaí diminuiu o estresse oxidativo, pois levou a diminuição do hidroperóxido de lipídeo. Esse poderia ser um dos motivos pelos quais os animais que receberam suplementação de açaí poderiam ter menor atividade de MMP-2.

Os efeitos agudos ou subagudos da doxorrubicina sobre o coração podem se manifestar através alterações eletrocardiográficas inespecíficas, de perturbação da condução cardíaca (bloqueios auriculoventriculares ou bloqueios de ramo), arritmias, miocardite, pericardite e disfunção ventricular. Esses eventos podem ocorrer desde o início do tratamento até duas semanas após o término do mesmo (51).

Podemos observar, agudamente, prejuízo da função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo em estudos experimentais (80). Conforme esperado, nossos animais apresentaram diminuição da fração de encurtamento, caracterizando disfunção sistólica, e aumento do átrio esquerdo com diminuição da onda E' septal, caracterizando disfunção diastólica.

No estudo do coração isolado, a doxorubicina reduziu a  $+dP/dt$ , a  $-dP/dt$  e a pressão sistólica máxima, também sugerindo piora tanto na função sistólica, quanto diastólica. Foi evidente o efeito do açaí na prevenção da disfunção ventricular ao ecocardiograma, no entanto não observamos o mesmo efeito no estudo do coração isolado, no qual a função ventricular é analisada in vitro. Conforme citado anteriormente, os animais que receberam doxorubicina provavelmente apresentavam diminuição da volemia e, nessas situações, esperamos que ocorra vasoconstrição para manutenção da perfusão orgânica adequada. Se o grau de vasoconstrição for muito importante, podemos ter aumento da pós-carga e prejuízo na função cardíaca.

No estudo do coração isolado não há qualquer influência da vasoconstrição, pois a função do órgão é avaliada sem qualquer interferência do organismo, seja hemodinâmica, endócrina ou neuronal. Devido a esse fato, acreditamos que as diferenças observadas entre os dois tipos de estudo de função possam ser atribuídas à vasoconstrição provocada pela hipovolemia (48, 81, 82) e também pela própria droga. A doxorubicina pode se ligar ao domínio redutase da eNOS e consequentemente diminuir a produção de NO (72). Também pode interferir com a expressão de receptores  $\beta$  e  $\alpha$  adrenérgicos, sendo que doses altas e agudas podem provocar maior expressão desses receptores e essa expressão está relacionada com a regulação do microRNA-30 (72).

Apesar de o açaí apresentar propriedades vasodilatadoras que podem ser atribuídas às antocianinas e sua capacidade de aumentar a expressão de NO (83,84,85), de maneira surpreendente, não observamos qualquer diferença na concentração sérica dos derivados do NO em nosso estudo. No entanto, acreditamos que a diferença entre os métodos de avaliação da função ainda possa ser atribuída à vasoconstrição, já que o açaí pode interferir em outras vias mediadoras da vasoconstrição, como o sistema renina/angiotensina/aldosterona (86,87) não avaliadas nesse estudo.

Em resumo, a doxorubicina provocou disfunção ventricular in vivo e in vitro, aumentou o estresse oxidativo, aumentou MMP-2, promoveu modificações no metabolismo energético miocárdico e aumentou a expressão proteica de casapase-3 ativa. A administração preventiva de açaí foi capaz de atenuar a disfunção sistólica e, possivelmente, a disfunção diastólica in vivo,

porém não atenuou a disfunção *in vitro*. Acreditamos que o efeito vasodilatador do açaí possa estar relacionado a essa melhora da função *in vivo*. Adicionalmente, o açaí melhorou o metabolismo energético cardíaco, incluindo melhora na atividade das enzimas da cadeia fosforilativa mitocondrial e atenuou o estresse oxidativo, de acordo com a hipótese inicial.

# Conclusão

A doxorubicina induziu alterações na estrutura e função cardíaca, além de aumento do estresse oxidativo, mudanças no metabolismo energético, ativação de MMP-2 e aumento da apoptose. O açaí preveniu o aparecimento de disfunção cardíaca *in vivo*, além de atenuar as mudanças no metabolismo energético miocárdico e o estresse oxidativo induzido pelo quimioterápico. Portanto, a suplementação de açaí constitui uma potencial estratégia para a redução da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina.

## TABELAS

**Tabela 1: Dados morfométricos**

|                | C (n=16)      | A (n=16)      | D (n=15)      | DA (n=16)     | p <sub>interação</sub> | p <sub>açaí</sub> | p <sub>doxo</sub> |
|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| PC inicial (g) | 396 ± 37      | 404 ± 35      | 409 ± 32      | 405 ± 32      | 0,478                  | 0,787             | 0,418             |
| PC final (g)   | 396 ± 38      | 406 ± 39      | 389 ± 33      | 390 ± 33      | 0,615                  | 0,553             | 0,183             |
| Δ PC (g)       | 0,37 ± 4,95   | 1,81 ± 6,1    | -20,4 ± 16,5  | -15,8 ± 14,4  | 0,582                  | 0,298             | 0,001             |
| VE (g)         | 0,92 ± 0,13   | 0,90 ± 0,12   | 0,86 ± 0,17   | 0,8 ± 0,1     | 0,651                  | 0,271             | 0,049             |
| VE/PC          | 0,021 ± 0,003 | 0,021 ± 0,002 | 0,024 ± 0,003 | 0,023 ± 0,002 | 0,796                  | 0,537             | 0,015             |
| VD (g)         | 0,24 ± 0,05   | 0,23 ± 0,06   | 0,24 ± 0,08   | 0,23 ± 0,07   | 0,830                  | 0,709             | 0,990             |
| Fígado (g)     | 12,2 ± 1,5    | 12,9 ± 1,8    | 11,8 ± 1,4    | 11,8 ± 1,6    | 0,416                  | 0,434             | 0,072             |
| Pulmão (g)*    | 1,59 ± 0,32   | 1,80 ± 0,35   | 1,49 ± 0,22   | 1,67 ± 0,63   | 0,664                  | 0,078             | 0,165             |

C: grupo controle; A: grupo açai; D: grupo doxorrubicina; DA: grupo doxorrubicina + açai; PC: peso corporal; Δ PC: peso corporal final – peso corporal inicial; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média ± desvio padrão. \*variáveis normalizadas para a realização do teste ANOVA de duas vias.

**Tabela 2: Variáveis estruturais ao Ecocardiograma**

|           | C (n=16)       | A (n=16)       | D (n=15)       | DA (n=16)      | p <sub>interação</sub> | p <sub>açaí</sub> | p <sub>doxo</sub> |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| FC (bpm)  | 342,50 ± 50,63 | 326,44 ± 66,34 | 286,27 ± 58,01 | 306,31 ± 60,19 | 0,230                  | 0,894             | 0,013             |
| VES (mm)  | 1,02 ± 0,46    | 1,10 ± 0,43    | * 1,33 ± 0,88  | &1,09 ± 0,71   | 0,002                  | 0,110             | 0,003             |
| VED (mm)@ | 6,9 (6,6-7,5)  | 7,3 (6,9-7,5)  | 6,9 (6,2-7,4)  | 6,6 ± 0,8      | 0,324                  | 0,335             | 0,324             |
| PP (mm)@  | 1,5 (1,5-1,7)  | 1,5 (1,5-1,8)  | 1,5 (1,5-1,5)  | 1,5 (1,5-1,5)  | 0,766                  | 0,752             | 0,502             |
| ERPP      | 0,45 ± 0,04    | 0,46 ± 0,06    | 0,45 ± 0,06    | 0,47 ± 0,07    | 0,573                  | 0,742             | 0,328             |
| SIV (mm)@ | 1,5 (1,5-1,8)  | 1,8 (1,5-1,8)  | 1,8 (1,5-1,8)  | 1,8 (1,7-1,8)  | 0,415                  | 0,138             | 0,520             |
| AE (mm)   | 4,91 ± 0,33    | 4,99 ± 0,35    | * 5,52 ± 0,78  | &4,93 ± 0,49   | 0,012                  | 0,054             | 0,037             |
| AE/Ao     | 1,34 ± 0,10    | 1,38 ± 0,07    | 1,57 ± 0,28    | 1,45 ± 0,16    | 0,057                  | 0,360             | 0,001             |

FC: frequência cardíaca; VES: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; VED: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; PP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo; ERPP: espessura relativa da parede (2xPP/VED); SIV: espessura diastólica do septo; AE: diâmetro do átrio esquerdo, Ao: diâmetro da aorta. C: grupo controle; A: grupo açai; D: grupo doxorrubicina; DA: grupo doxorrubicina + açai. \* Diferente do grupo C; & diferente do grupo D; valor de p: ANOVA de 2 vias. @ variáveis analisadas por teste t/Mann-Whitney, com valor de p ajustado por Bonferroni; nessas situações, o valor de p considerado para o pinteração foi o valor de p da comparação DxDA, pdoxorrubicina foi o valor de p para a comparação CxD e o paçaí foi o valor de p da comparação CxA.



**Tabela 3: Dados funcionais ao Ecocardiograma**

|                          | C (n=16)    | A (n=16)    | D (n=15)     | DA(n=16)     | p interação | p açaí | p doxo |
|--------------------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------|--------|
| <b>Fenc (mm)</b>         | 0,60 ± 0,06 | 0,58 ± 0,04 | 0,44 ± 0,09* | 0,54 ± 0,06& | 0,001       | 0,014  | 0,001  |
| <b>E/A (mm)</b>          | 1,59 ± 0,26 | 1,6 ± 0,25  | 1,67 ± 0,43  | 1,50 ± 0,22  | 0,233       | 0,295  | 0,905  |
| <b>TRIVc</b>             | 65 ± 13     | 66 ± 8,5    | 70 ± 17      | 71 ± 8,7     | 0,959       | 0,743  | 0,133  |
| <b>E' septal (cm/s)</b>  | 6,4 ± 0,8   | 5,9 ± 0,6   | 4,5 ± 0,8*   | 5,6 ± 1,1&   | 0,013       | 0,330  | 0,002  |
| <b>E' lateral (cm/s)</b> | 6,7 ± 1,3   | 7,0 ± 1,6   | 4,7 ± 1,2    | 5,7 ± 1,2    | 0,471       | 0,203  | 0,002  |
| <b>S' septal (cm/s)</b>  | 5,5 ± 0,8   | 5,5 ± 0,6   | 4,4 ± 0,9    | 4,9 ± 1,4    | 0,484       | 0,551  | 0,020  |
| <b>S' lateral (cm/s)</b> | 6,2 ± 0,5   | 6,4 ± 0,4   | 5,6 ± 0,6    | 6,0 ± 0,5    | 0,744       | 0,116  | 0,016  |

C: grupo controle; A: grupo açaí; D: grupo doxorubicina; DA: grupo doxorubicina + açaí. Fenc: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; E/A: relação da onda E e A ao doppler transmitral; TRIVc: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca; E': onda E ao doppler tissular. \* Diferente do grupo C; & diferente do grupo D. Valor de p: ANOVA de duas vias.

**Tabela 4: Estudo do coração Isolado**

|                                    | C (n=8)     | A (n=8)     | D (n=7)     | DA (n=8)    | p interação | p açaí | p doxo |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|--------|
| <b>V<sub>0</sub> (μL)</b>          | 85,6 ± 36,4 | 90,0 ± 23,0 | 77,1 ± 32,9 | 86,9 ± 22,5 | 0,801       | 0,508  | 0,585  |
| <b>+dP/dt*<br/>(mmHg/s)</b>        | 2961 ± 1066 | 3109 ± 978  | 1768 ± 434  | 1680 ± 554  | 0,579       | 0,912  | <0,001 |
| <b>-dP/dt<br/>(mmHg/s)</b>         | 2063 ± 612  | 2422 ± 619  | 1275 ± 514  | 1133 ± 485  | 0,226       | 0,596  | <0,001 |
| <b>PS<sub>Max</sub><br/>(mmHg)</b> | 143 ± 39    | 137 ± 29    | 99 ± 21     | 90 ± 23     | 0,918       | 0,499  | <0,001 |

Dados expressos em média ± desvio padrão. \* variáveis normalizadas para a realização do teste estatístico. C: grupo controle; A: grupo açaí; D: grupo doxorubicina; DA: grupo doxorubicina + açaí; V<sub>0</sub>: volume inicial do balão intraventricular que determina pressão diastólica de zero; +dP/dt: primeira derivada positiva de pressão; -dP/dt: primeira derivada negativa pressão; PS<sub>max</sub> : pressão sistólica máxima atingida. Valor de p: ANOVA de duas vias.

**Tabela 5: Metaloproteinase de matriz no miocárdio**

|                     | C (n=10)    | A (n=5)     | D (n=4)     | DA (n=6)    | p interação | p açaí | p doxo |
|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|--------|
| <b>MMP-2 75 KDa</b> | 1,53 ± 0,48 | 1,20 ± 0,66 | 2,45 ± 1,23 | 1,65 ± 1,04 | 0,480       | 0,100  | 0,049  |
| <b>MMP-2 72 KDa</b> | 1,39 ± 0,41 | 1,07 ± 0,45 | 2,08 ± 0,88 | 1,38 ± 0,42 | 0,380       | 0,023  | 0,026  |
| <b>MMP-2 64 KDa</b> | 1,37 ± 0,77 | 1,43 ± 0,91 | 1,64 ± 1,18 | 1,25 ± 1,08 | 0,550       | 0,651  | 0,898  |

MMP: metaloproteinase de matriz. Dados expressos em média ± desvio padrão. C: grupo controle; A: grupo açaí; D: grupo doxorubicina; DA: grupo doxorubicina + açaí. Valor de p: ANOVA de duas vias. Os valores estão apresentados em unidades arbitrarias.

**Tabela 6 - Atividade das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo**

|                                            | C (n=8)     | A (n=8)      | D (n=8)     | DA (n=8)                    | p interação | p açai | p doxo |
|--------------------------------------------|-------------|--------------|-------------|-----------------------------|-------------|--------|--------|
| <b>CAT</b> (μmol/g tecido)                 | 78,4 ± 19,2 | 104,4 ± 25,0 | 42,9 ± 10,5 | 62,2 ± 10,3                 | 0,596       | 0,001  | <0,001 |
| <b>SOD</b> (nmol/mg proteína) <sup>@</sup> | 11,5 ± 1,7  | 11,2 ± 2,3   | 9,6 ± 0,9   | 10,7(9,3-13,4)              | 0,195       | 0,815  | 0,102  |
| <b>GSH-Px</b> (nmol/mg tecido)             | 75,0 ± 8,2  | 69,9 ± 6,7   | *55,2± 8,1  | <sup>&amp;</sup> 77,1 ± 5,1 | <0,001      | 0,002  | 0,018  |

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. C: grupo controle; A: grupo açai; D: grupo doxorubicina; DA: grupo doxorubicina + açai. CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; GSH-Px: glutatona peroxidase. \* Diferente do grupo C; & diferente do grupo D. Valor de p: ANOVA de duas vias. @ variáveis analisadas por teste t/Mann-Whitney, com valor de p ajustado por Bonferroni.

**Tabela 7 - Atividade das enzimas relacionadas ao metabolismo energético miocárdico**

|                                               | C (n=8)    | A (n=8)     | D (n=8)     | DA (n=8)                      | p interação | p açai | p doxo |
|-----------------------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------------------------|-------------|--------|--------|
| <b>β-OH-acilCoA-Desidrogenase</b> (nmol/mgPt) | 31,5 ± 5,0 | *26,2 ± 3,9 | *13,0 ± 2,8 | @ <sup>&amp;</sup> 21,4 ± 2,4 | <0,001      | 0,251  | <0,001 |
| <b>Fosfofrutoquinase</b> (nmol/gtecido)       | 145 ± 28,8 | 138 ± 19,8  | *176 ± 25,6 | <sup>&amp;</sup> 133 ± 22,7   | 0,047       | 0,008  | 0,156  |
| <b>Lactato desidrogenase</b> (nmol/mgPt)      | 58,3 ± 8,5 | 48,5 ± 6,7  | 111 ± 30,3  | 77,1 ± 25,6                   | 0,263       | 0,002  | 0,001  |
| <b>Piruvato Desidrogenase</b> (nmol/gtecido)  | 267 ± 41,4 | 348 ± 33,2  | 152 ± 34,2  | 268 ± 37,2                    | 0,206       | <0,001 | <0,001 |
| <b>Citrato sintase</b> (nmol/mgPt)            | 49,0 ± 7,2 | 42,6 ± 5,7  | *26,6 ± 6,5 | <sup>&amp;</sup> 36,3 ± 6,5   | <0,001      | 0,150  | <0,001 |

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. C: grupo controle; A: grupo açai; D: grupo doxorubicina; DA: grupo doxorubicina + açai. \* Diferente do grupo C; @diferente do grupo A, &diferente do grupo D. Valor de p: ANOVA de duas vias.

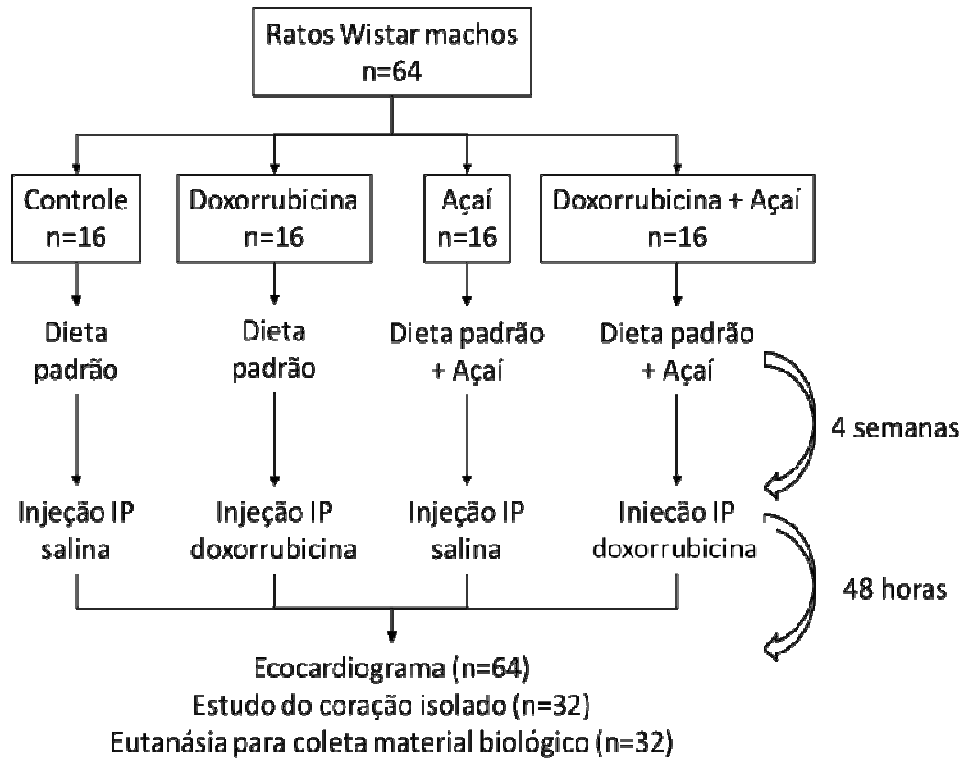
**Tabela 8 - Atividade das enzimas da cadeia respiratória mitocondrial**

|                                | C (n=8)    | A (n=8)    | D (n=8)    | DA (n=8)                    | p interação | p açai | p doxo |
|--------------------------------|------------|------------|------------|-----------------------------|-------------|--------|--------|
| <b>Complexo I</b> (nmol/mgPt)  | 13,4 ± 4,3 | 13,9 ± 3,4 | 9,1 ± 2,5  | 10,9 ± 2,1                  | 0,560       | 0,308  | 0,003  |
| <b>Complexo II</b> (nmol/mgPt) | 4,8 ± 1,1  | 4,1 ± 0,9  | *1,6 ± 0,4 | <sup>&amp;</sup> @2,5 ± 0,6 | 0,009       | 0,786  | <0,001 |
| <b>ATP Sintase</b> (nmol/mgPt) | 22,7 ± 3,2 | 22,4 ± 2,9 | *13,0±2,7  | <sup>&amp;</sup> 23,8 ± 3,0 | <0,001      | <0,001 | <0,001 |

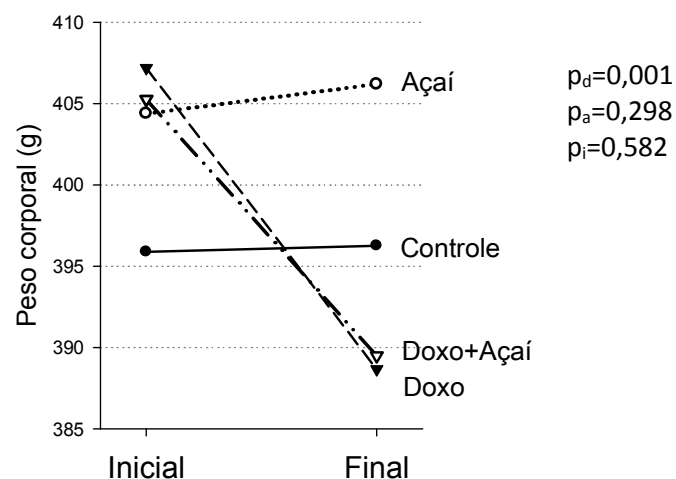
Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. C: grupo controle; A: grupo açai; D: grupo doxorubicina; DA: grupo doxorubicina + açai. \* Diferente do grupo C; @diferente do grupo A, &diferente do grupo D. Valor de p: ANOVA de duas vias.

## FIGURAS

**Figura 1: Delineamento experimental**

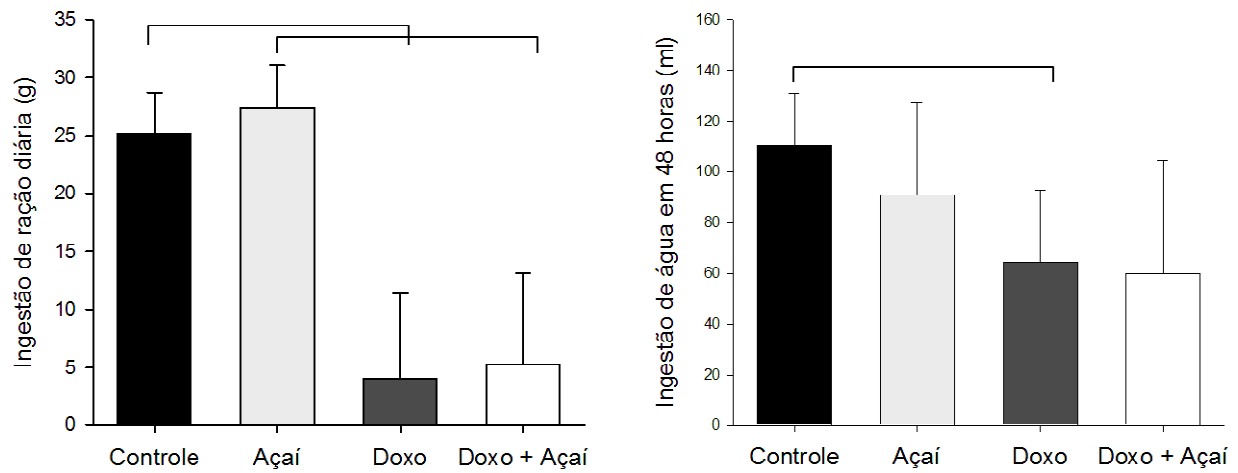


**Figura 2: Evolução do Peso Corporal**



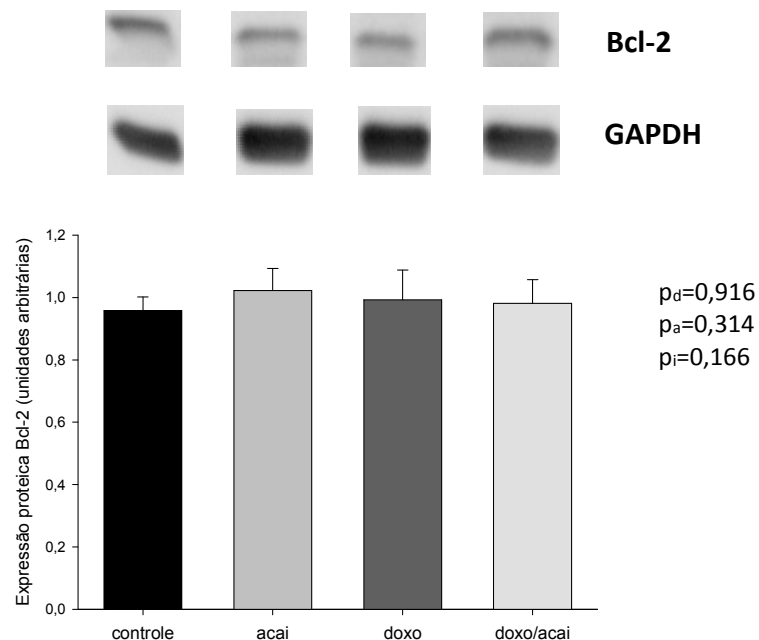
**Figura 2.** Ilustra a evolução do ganho de peso dos animais durante as 48 horas após a administração da doxorrubicina. O peso inicial representa o peso anterior à administração da doxorrubicina e o peso final representa o peso 48 horas após. Observamos redução do peso corporal dentre os animais que receberam doxorrubicina, porém a suplementação de açaí não influenciou nesse resultado. Valor de p: ANOVA de duas vias. Teste estatístico foi realizado com a variação do peso corporal (peso final – peso inicial).

**Figura 3: Ingestão de ração e água após a administração de doxorrubicina**



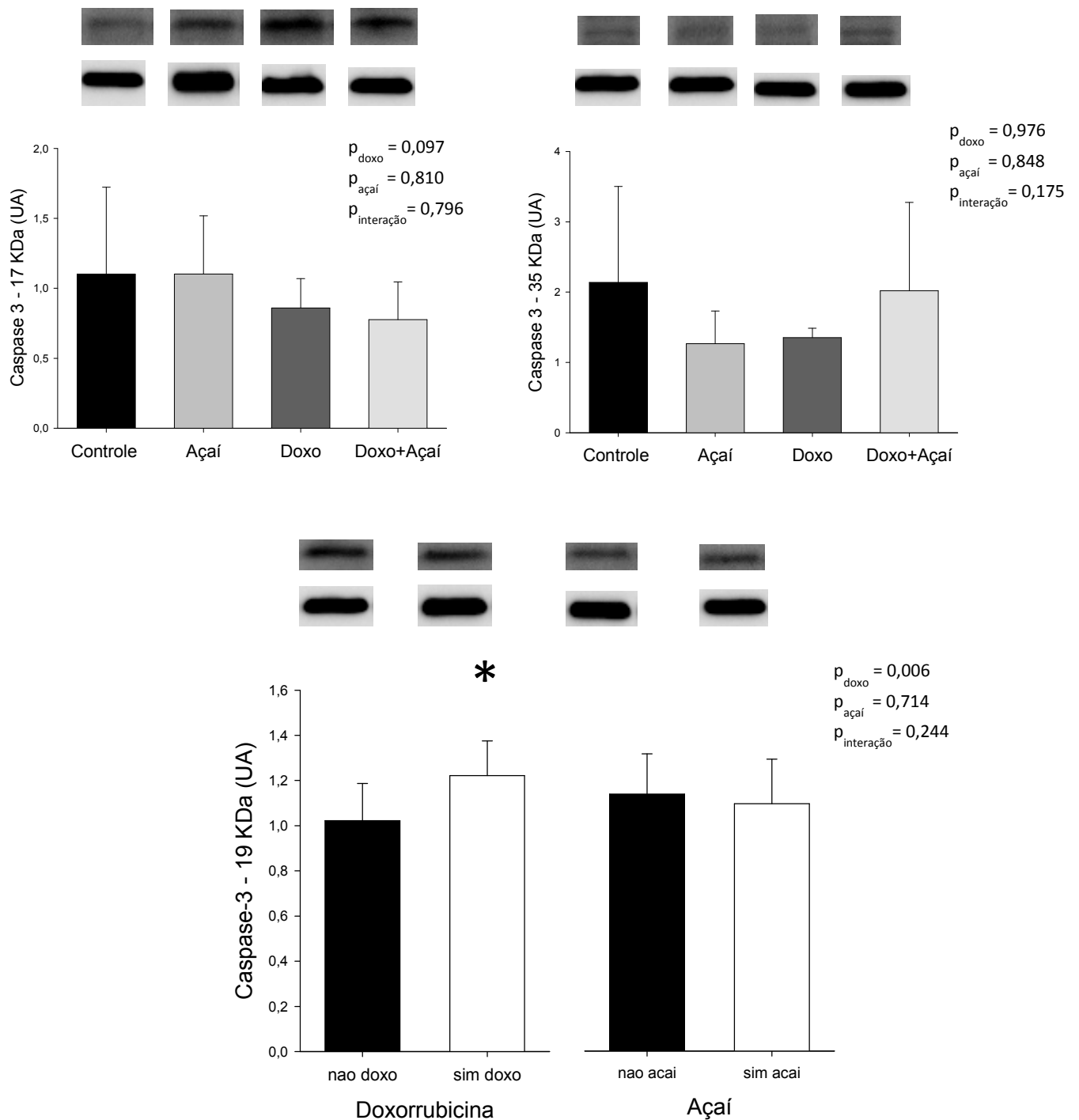
**Figura 3:** Ilustra a ingestão de ração e consumo de água após administração de Doxorrubicina. Foram realizadas as seguintes comparações: CxD; CxA; DxDA e AxDA. Valor de p: Mann-Whitney, com valor de p corrigido pelo número de comparações possíveis. A chave liga dois grupos estatisticamente diferentes ( $p < 0,008$ ).

**Figura 4: Expressão proteica de Bcl-2 no miocárdio**



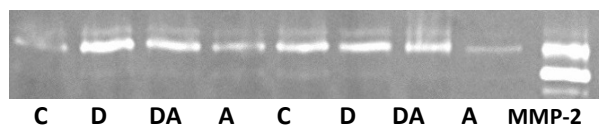
**Figura 4:** Expressão proteica de Bcl-2. Os valores foram normalizados pelo GAPDH. Valor de p: ANOVA de duas vias.

**Figura 5: Expressão proteica de caspase-3**



**Figura 5:** Expressão proteica de Caspase-3 no miocárdio. Os gráficos representam respectivamente a caspase 3 ativa com peso molecular de 17 KDa, caspase 3 inativa com peso molecular de 35 KDa e caspase 3 ativa com peso molecular de 19 KDa. Os valores foram normalizados pelo GAPDH. Valor de p: ANOVA de duas vias.

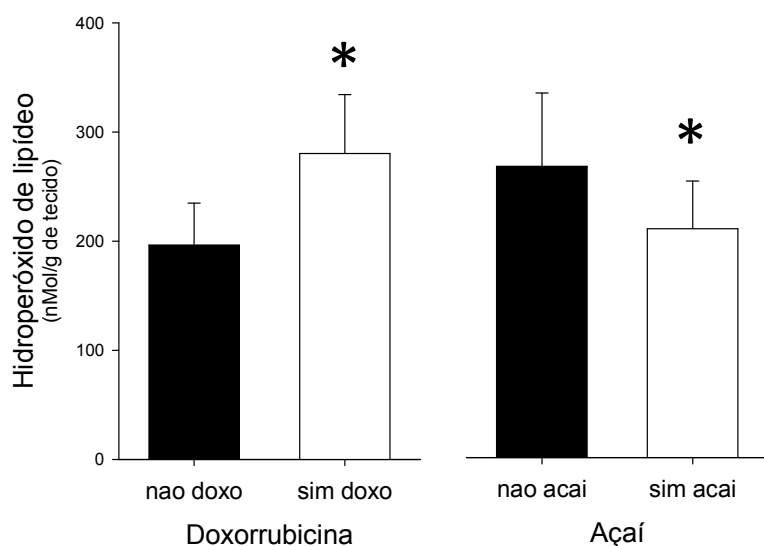
**Figura 6: Metaloproteinase de matriz no miocárdio**



$p_{\text{doxo}} = 0,026$   
 $p_{\text{açai}} = 0,023$   
 $p_{\text{interação}} = 0,380$

**Figura 6:** Gel da zimografia. As áreas em branco correspondem às áreas de degradação da gelatina no gel. É possível identificar 3 bandas que correspondem à 75 KDa, 72 KDa e 64 KDa. C: grupo controle; A: grupo açai; D: grupo doxorubicina; DA: grupo doxorubicina + açai. MMP-2: controle positivo (MMP-2 recombinante). Valor de p: ANOVA de duas vias.

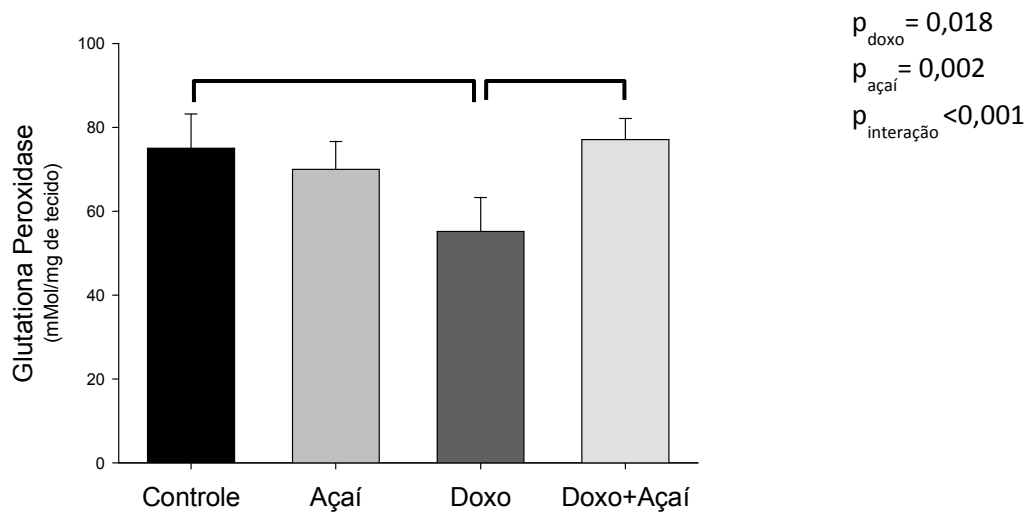
**Figura 7: Concentração miocárdica de Hidroperóxido de Lipídeo**



$p_{\text{doxo}} < 0,001$   
 $p_{\text{açai}} < 0,001$   
 $p_{\text{interação}} = 0,068$

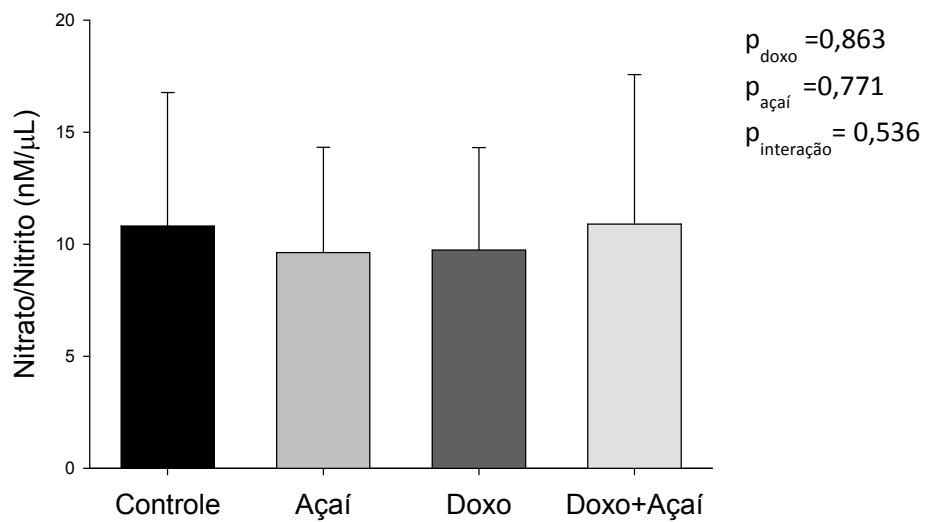
**Figura 7:** Ilustra a concentração miocárdica de Hidroperóxido de Lipídeo. Observamos aumento da concentração de hidroperóxido de lipídeo nos animais que receberam doxorubicina e diminuição da sua concentração nos animais que foram suplementados com açai. \* Indica concentração de hidroperóxido de lipídeo. Valor de p: ANOVA de duas vias.

**Figura 8: Atividade da enzima Glutathione Peroxidase**



**Figura 8:** Ilustra a atividade da enzima Glutathione Peroxidase no tecido cardíaco. Observamos diminuição da atividade de glutathione peroxidase nos animais que receberam doxorubicina e aumento da atividade dessa enzima nos animais que receberam doxorubicina e foram suplementados com açai. Valor de p: ANOVA de duas vias. A chave liga dois grupos estatisticamente diferentes.

**Figura 9: Concentração sérica dos derivados do óxido nítrico**



**Figura 9:** Ilustra a concentração sérica dos derivados do Óxido Nítrico (Nitrato/Nitrito) no soro do sangue. Não observamos diferenças estatisticamente significante entre os grupos. Valor de p: ANOVA de duas vias

# Referências



1. Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer*. 1967; 20(3):333-353.
2. Ferreira AL, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008; 6(4):278-281.
3. Wojtacki J, Lewicka NE, Lesniewski KK. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention--review of the literature. *Med Sci Monit*. 2000; 6(2):411-420.
4. Allen A. The cardiotoxicity of chemotherapeutic drugs. *Semin Oncol*. 1992; 19(5):529-542.
5. Bristow MR, Thompson PD, Martin RP, Mason JW, Billingham ME, Harrison DC. Early anthracycline cardiotoxicity. *Am J Med*. 1978; 65(5):823-832.
6. Shi Y, Moon M, Dawood S, McManus B, Liu PP. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity. *Herz*. 2011; 36(4):296-305.
7. Carvalho F, Burgeiro A, Garcia R, Moreno A, Carvalho R, Oliveira O. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Med Research Rev*. 2014; 34(1):106-135.
8. Toko H, Oka T, Zou Y, Sakamoto M, Mizukami M, Sano M, et al. Angiotensin II type 1a receptor mediates doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Hypertens Res*. 2002; 25(4):597-603.
9. Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 294(1):396-401.
10. Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res*. 2010; 85(3):413-423.
11. Kizaki K, Ito R, Okada M, Yoshioka K, Uchide T, Temma K, et al. Enhanced gene expression of myocardial matrix metalloproteinases 2 and 9 after acute treatment with doxorubicin in mice. *Pharmacol Res*. 2006; 53(4):341-346.
12. Bai P, Mabley JG, Liaudet L, Virag L, Szabo C, Pacher P. Matrix metalloproteinase activation is an early event in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncol Rep*. 2004; 11(2):505-508.

13. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007; 87(4):1285-1342.
14. Schulz R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:211-242.
15. Moura LR, Viegas AA, Nasciutti PR, Carvalho ROA, Moura VMDB. Cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina: Patogenia, diagnóstico e terapias antioxidantes. *Enciclopédia Biosfera. Centro Cient Conhecer – Goiânia.* 2015; 22(11): 711-725.
16. Uygur R, Aktas C, Tulubas F, Alpsoy S, Topcu B, Ozen OA. Cardioprotective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2014; 33(4):435-345.
17. Boghdady NA. Antioxidant and antiapoptotic effects of proanthocyanidin and ginkgo biloba extract against doxorubicin-induced cardiac injury in rats. *Cell Biochem Funct.* 2013; 31(4):344-351.
18. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004; 56(2):185-229.
19. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 2014; 34(1):106-135.
20. Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, et al. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Exp Mol Med.* 2006; 38(5):535-345.
21. Ueno M, Kakinuma Y, Yuhki K, Murakoshi N, Iemitsu M, Miyauchi T, et al. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. *J Pharmacol Sci.* 2006; 101(2):151-158.
22. Wu XX, Kakehi Y, Mizutani Y, Kamoto T, Kinoshita H, Isogawa Y, et al. Doxorubicin enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer. *Int J Oncol.* 2002; 20(5):949-954.

23. Childs AC, Phaneuf SL, Dirks AJ, Phillips T, Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Res.* 2002; 62(16):4592-4598.
24. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, Lim CC, Sawyer DB. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 2007; 7(2):114-121.
25. Czabotar P, Lessene G, Strasser A, Adams J. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Rev | Molecular Cell Bio.* 2014; (15):49-63.
26. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem.* 2006; 54(22):8598-8603.
27. Oliveira AG, Costa MCD, Rocha SMBM. Benefícios funcionais do açaí na prevenção das doenças cardiovasculares. *Journal of Amazon Health Science.* 2015; 1(1): 1-10.
28. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *J Agric Food Chem.* 2006; 54(22):8604-8610.
29. Wu X, Schauss AG. Mitigation of inflammation with foods. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(27):6703-6717.
30. Santos GM, Maia GA, Sousa PH, Costa JM, Figueiredo RW, Prado GM. Correlation between antioxidant activity and bioactive compounds of acai (*Euterpe oleracea* Mart) comercial pulps. *Arch Latinoam Nutr.* 2008; 58(2):187-192.
31. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine.* 2012; 19(3-4):262-269.
32. Poulouse SM, Fisher DR, Larson J, Bielinski DF, Rimando AM, Carey AN, et al. Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(4):1084-1093.

33. Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Rocha NS, Barbisan LF. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by acai fruit (*Euterpe oleracea* Martius) intake. *Plant Foods Hum Nutr.* 2012; 67(3):235-241.
34. Fragoso MF, Romualdo GR, Ribeiro DA, Barbisan LF. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) feeding attenuates dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol.* 2013; (58):68-76.
35. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *Journal of Food Chemistry.* 2004; 52(6):1539-1545.
36. Galvano F, Fauci L, Lazzarino G, Fogliano V, Ritieni A, Ciappellano S, et al. Cyanidins: metabolism and biological properties. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 2004; 15(1):2-11.
37. Rocha AP, Carvalho LC, Sousa MA, Madeira SV, Sousa PJ, Tano T, Schini-Kerth VB, Resende AC, Soares De Moura R. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart. (açai) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul. Pharmacol.* 2007; 46(2):97-104.
38. Diamanti J, Mezzetti B, Giampieri F, Alvarez-Suarez JM, Quiles JL, Gonzalez-Alonso A, et al. Doxorubicin-Induced Oxidative Stress in Rats Is Efficiently Counteracted by Dietary Anthocyanin Differently Enriched Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *J Agric Food Chem.* 2014; 62(18): 3935-3943.
39. Ribeiro JC, Antunes LM, Aissa AF, Darin JD, De Rosso VV, Mercadante AZ, et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. *Mutat Res.* 2010; 695 (1-2):22-28.
40. Buyukokuroglu ME, Taysi S, Buyukavci M, Bakan E. Prevention of acute adriamycin cardiotoxicity by dantrolene in rats. *Hum Exp Toxicol.* 2004; 23(5):251-256.
41. Andreadou I, Sigala F, Iliodromitis EK, Papaefthimiou M, Sigalas C, Aligiannis N, et al. Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42(3):549-558.

42. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996; 328(2):309-316.
43. - Bass A, Brdiczka D, Eyer P. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *European journal of biochemistry/FEBS*. 1969; 10(2):198-206.
44. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alphas-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods of biochemical analysis*. 1974; (22):123-175.
45. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1985; 153(1):23-36.
46. Desai VG, Weindruch R, Hart RW. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996; 333(1):145-151.
47. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;(72):248-254.
48. Melo IM, Oliveira MS, Melo MM. Avaliação das alterações cardiotóxicas decorrentes do uso da doxorubicina: estudo experimental em ratos. *Rev Med Minas Gerais*. 2012; 22 (8): 1-48.
49. Freitas WE. O Grau de desidratação entre os exercícios aeróbios realizados na esteira e bicicleta ergométrica. *Rev Bras de Obes, Nutr e Emag*. 2007; 1(6): 84-98.
50. Lancellotti P, Anker SD, Donal E. Cardiac Oncology Toxicity Registry in breast cancer patients: rationale, study design, and methodology (EACVI/HFACOT Registry) - EURObservational Research Program of the European Society of Cardiology *J Am Soc Echocardiogr*. 2015 16(5): 466–470.
51. Cruz M, Rodrigues J, Campelo M. Cardiotoxicidade na terapêutica com antraciclinas: estratégias de prevenção. *Ver Port de Card*. 2016; 6(35):359-371.
52. Alexandre D, Cunha RL, Hubinger MD. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. *Ciênc e Tec de Alimen*. 2004; 24(1): 114-119.

53. Yamaguchi KKL, Pereira LFR, Lamarão CV, Lima ES, Veiga-Junior VF. Amazon açaí: Chemistry and biological activities: A review. *Food Chemistry*. 2015; (179): 137- 151.
54. Hertog MGL, Feskem EJM, Hollman P, Katam MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease the Zutphen elderly study. *The Lancet*. 1993; 342(8878): 1007-1101
55. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J*. 2008; 22(3):659-661.
56. Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. *FEBS Letters*. 2003 544(1-3): 210–213.
57. Satué GMT, Heinonen M, Frankel EN. Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1997; 45(9): 3362-3367
58. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2008; 81(3):482–490.
59. Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of Food Science and Agricultural*. 2000; 80(13): 1925-1941.
60. Alho H, Leinonen J. Total antioxidant measured by chemiluminescence methods, *Methods in Enzymology*. 1999; 299: 3-15.
61. Halliwell B. Free Radicals and Antioxydant: A personal view. *Nutrition Reviews*. 1994; 52(8): 253-265
62. Grieve DJ, Byrne JA, Cave AC, Shah AM. Role of Oxidative Stress in Cardiac Remodelling after Myocardial Infarction. *Heart Lung Circ*. 2004; 13(2):132–138.
63. Miyamoto, S. Hidroperóxido de lipídios como fonte biológica de oxigênio singleto: estudos com marcação isotópica, espectométrica de massa e luminescência. Usp, São Paulo, SP, 344p. (Tese de Doutorado) 2005.
64. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004; 56(2):185-229.
65. Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr., Campinas*. 1999; 12(2): 123-130.

66. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1989.
67. Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2): 234–242.
68. Lionetti V, Stanley WC, Recchia FA. Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc Res.* 2011; 90(2):202–209.
69. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SAR, Zornoff LAM. Energy Metabolism in Cardiac Remodeling and Heart Failure. Review Article. 2013; 21(3):135-140.
70. Schlattner MT, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2006; (41):389-405.
71. Wakasugi S, Fischman AJ, Babich JW, Callahan RJ, Elmaleh DR, Wilkinson R, et al. Myocardial substrate utilization and left ventricular function in adriamycin cardiomyopathy. *J Nucl Med* 1993; 34(9):1529–1535.
72. Ghigo A, Li M, Hirsch. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jul; 1863 (7):1916-1925.
73. Wyllie A. H. The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res.* 1985; 5(1): 131-142.
74. Minko T, Kopeckvá P, Kopecek J. Primary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. *J. Control. Release.* 2001; (71): 227-237.
75. Anazett MC, Melo PS. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. *Metrocamp Pesquisa.* 2007; 1(1): 37-58.
76. Lorenzo E, Ruiz CR, Quesada AJ, Hernandez A, Rivas L, Redondo JM. Doxorubicin induces apoptosis and CD95 gene expression in human primary endothelial cell through a p53 dependent mechanism. *The journal of biological Chemistry.* 2002; 277(13):10883-10892.
77. Khasigov PZ, Podobed OV, Gracheva TS, Salbiev KD, Grachev SV, Berezov TT. Role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion and metastasis. *Biochemistry. Biokhimiia.* 2003; 68(7): 711-717.
78. Kizaki K, Ito R, Okada M, Yoshioka K, Uchide T, Temma K, Muto KI, Uechi M, Hara Y. Enhanced gene expression of myocardial matrix metalloproteinases

2 and 9 after acute treatment with doxorubicin in mice. *Pharmacological Research*. 2006; 53(4):341-346.

79. Liu Y, Liu K. Effects of spironolactone and losartan on the early neovascularization of acute myocardial infarction. *Experimental and therapeutic medicine*. 2014;8(3):978-982.

80. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM. Remodelação Cardíaca: Conceitos, Impacto Clínico, Mecanismos Fisiopatológicos e Tratamento Farmacológico. *Arq. Bras. Cardiol*. 2015; 106(1):62-69.

81. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Minicucci FC, Pereira EJ. Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity is Associated with Matrix Metalloproteinase-2 Alterations in Rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015 (35): 1924-1933.

82. Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, Wang W, Radomski MW, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart. *Circulation*. 2000; 101(15):1833-1839.

83. Costa CA, Oliveira PRB, Bem GF, Carvalho LCRM, Ognibene DT, Silva AFE. Euterpe Oleracea Mart.-Derived Polyphenols Prevent Endothelial Dysfunction and Vascular Structural Changes in Renovascular Hypertensive Rats: Role of Oxidative Stress. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2012; 385(12):1199-1209.

84. Hillman S. S. Some effects of dehydration on internal distributions of water and solutes in *Xenopus laevis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*. 1978; 61(2):303-307.

85. Hillman S.S. Dehydrational effects on cardiovascular and metabolic capacity in two amphibians. *Physiological zoology*. 1987; (60): 608-613.

86. Portinho JÁ, Zimmermann LM, Bruck MR. Beneficial effects of açai. *International Journal of Nutrology*. 2012; 5(1):15-20.

87. Schauss AG, Wu X, Jensen GS. Increased antioxidant capacity and inhibition of lipid peroxidation in healthy adults consuming an açai (*Euterpe oleracea*) fruit-based juice. *Acta Hort*. 2009; (841):97-100.