

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LEANDRO LOPES SILVA

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS INDUZIDAS PELA
DOXORRUBICINA E POTENCIAL PROTETOR DA ALDA-1 EM
CARDIOMIOBLASTOS**

Botucatu – SP
Janeiro/2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LEANDRO LOPES SILVA

**ALTERAÇÕES MITOCONDRIAS INDUZIDAS PELA
DOXORRUBICINA E POTENCIAL PROTETOR DA ALDA-1 EM
CARDIOMIOBLASTOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista – como requisito para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daisy Maria Fávero Salvadori

**Botucatu – SP
Janeiro/2023**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.DIVISÃO
TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

Silva, Leandro Lopes.

Alterações mitocondriais induzidas pela doxorubicina e potencial protetor da Alda-1 em cardiomioblastos / Leandro Lopes Silva. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Daisy Maria Fávero Salvadori

Capes: 20206003

1. Cardiotoxicidade. 2. Doxorubicina. 3. Estresse oxidativo. 4. Dinâmica mitocondrial.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade; Dinâmica mitocondrial; Doxorubicina; Estresse oxidativo.

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dedico este trabalho aos meus pais, que, apesar de todos os sacrifícios, nunca desistiram de me permitir conquistar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Prof. Dra. Daisy Salvadori, por aceitar me orientar nessa última etapa da graduação, sendo não apenas uma mentora, mas uma amiga em que pude contar com a ajuda sempre que precisei.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento desse projeto com bolsa de Iniciação Científica pelo processo 2021/14056-4, sem o qual esse projeto não seria realizado.

Aos meus pais, que lutaram por 23 anos para que eu pudesse ter a educação que lhes foi negada devido todas as dificuldades que a vida trouxe e que, mesmo à mais de 2000 km de distância, com muita saudade e muitos obstáculos, acompanharam cada pequena conquista durante o período de graduação ao meu lado.

Às minhas melhores amigas, Beatriz e Marcela, por todo o amor, carinho, compaixão e companheirismo, as experiências compartilhadas e as dores consoladas nesses anos de graduação. Obrigado por serem minha família em Botucatu.

Ao meu companheiro, Guilherme, que foi meu pilar nos últimos passos dessa jornada.

À Universidade Estadual Paulista, todos os professores e funcionários que contribuíram para a minha formação, permitindo me tornar o profissional que sou hoje.

RESUMO

A doxorubicina (DOX) é uma antraciclina isolada da actinobacteria *Streptomyces peucetius* e amplamente utilizada na terapia antineoplásica. Entretanto, apesar da sua eficácia, a DOX pode promover quadros de cardiotoxicidade que limitam a quimioterapia e diminuem a qualidade de vida dos pacientes. A literatura científica sugere que a toxicidade induzida pela DOX pode estar associada à disfunção mitocondrial, a qual resulta em aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em danos no DNA mitocondrial e na diminuição da produção de energia. Nesse contexto, a enzima mitocondrial aldeído-desidrogenase 2 (ALDH2) tem papel importante, pois atua na proteção contra os efeitos do estresse oxidativo. Contudo, sabe-se que a DOX pode provocar redução na atividade da ALDH2, tornando o tecido cardíaco suscetível a alterações decorrentes de processos como a lipoperoxidação. Reconhecida como um importante ativador da ALDH2, a Alda-1 é um potencial agente terapêutico que vem sendo testado contra os efeitos colaterais da DOX. Diante dessas premissas, o presente estudo teve por objetivo investigar se mecanismos mitocondriais estão associados à cardiotoxicidade induzida pela DOX e a possível ação protetora da Alda-1. Mais especificamente, foram avaliados, em cardiomioblastos (linhagem H9c2) de ratos tratados *in vitro* com a DOX e a Alda-1, a viabilidade celular, a geração de EROs mitocondrial e a massa e o potencial de membrana mitocondrial. Para isso, foram realizados ensaios utilizando citometria de fluxo e o MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]. Os resultados confirmaram os efeitos da DOX sobre as mitocôndrias (massa, estresse oxidativo e polarização da membrana) de células cardíacas e demonstraram que a Alda-1, nas condições testadas, não apresentou atividade protetora sobre a organela. Contudo, outras análises devem ser realizadas, a fim de melhor entender o potencial cardioprotetor da Alda1 sobre a ação da DOX.

Palavras-chave: cardioproteção; cardiotoxicidade; dinâmica mitocondrial; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) is an anthracycline isolated from the actinobacteria *Streptomyces peucetius* and it is widely used in antineoplastic therapy. However, although its efficiency, DOX can promote cardiotoxicity conditions which limits chemotherapy and reduce patients' life quality. The scientific literature suggests that induced toxicity from DOX might be related to mitochondrial dysfunction, which results in an increased production of oxygen-reactive species, mitochondrial DNA damage and a lower production of energy. In this context, mitochondrial enzyme aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) has an important role because it acts against the effects of oxidative stress. Nevertheless, it is known that DOX can cause a reduction in ALDH2 activity, making the cardiac tissue more susceptible to modifications due to processes as lipoperoxidation. Recognized as an important activator of ALDH2, Alda-1 is a potential therapeutic agent that has been tested against the DOX's collateral effects. Facing these premises, the present study has as objective to investigate if the mitochondrial mechanisms are related to DOX-induced cardiotoxicity and the possible protection effects of Alda-1. More specifically, it was evaluated rats' cardiomyoblasts (cell line H9c2) *in vitro* treated with DOX and Alda-1, cell viability, mitochondrial oxygen-reactive species production and mitochondrial mass and membrane potential. Flow cytometry and MTS [3-(4,5-dimethyliazol-2-yl)-5-(3-carboxymetoxiphenyl)-2-(4-sulfenil)-2h-tetrazolium] were used for these tests. The results confirmed the effects of DOX on the mitochondria (mass, oxidative stress, and membrane polarization) of cardiac cell and demonstrated that Alda-1 did not have a protective effect on the organelle under the investigated conditions. However, additional analyses are required to better understand the cardioprotective effect of Alda-1 on DOX's activity.

Keywords: cardioprotection; cardiotoxicity, mitochondrial dynamics, oxidative stress.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
1.1.	Considerações iniciais.....	9
1.2.	Doxorrubicina	11
1.3.	Mitocôndrias no tecido cardíaco e estresse oxidativo	11
1.4.	Aldeído desidrogenases.....	12
1.5.	Alda-1	13
1.6.	Linhagem celular H9c2.....	14
2.	OBJETIVOS	15
2.1.	Objetivos específicos.....	15
3.	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1.	Cultura de células musculares cardíacas (linhagem H9c2).....	16
3.2.	Ensaio de viabilidade celular (MTS)	16
3.3.	Caracterização da dinâmica mitocondrial	17
3.3.1.	Detecção do superóxido mitocondrial.....	17
3.3.2.	Quantificação da massa mitocondrial.....	17
3.3.3.	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial	18
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1.	Viabilidade celular	19
4.2.	Superóxido mitocondrial	21
4.3.	Massa mitocondrial	23
4.4.	Potencial de membrana mitocondrial.....	25
4.5.	Alda-1	27
5.	CONCLUSÃO.....	28
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações iniciais

O câncer é a segunda doença com maior taxa de mortalidade e morbidade no Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), ficando atrás apenas de doenças cardiovasculares. Também segundo estimativas do INCA, é esperado o surgimento de aproximadamente 704.080 novas neoplasias malignas para o ano de 2023. Dados de 2020 fornecidos pelo Ministério da Saúde informam que 225.830 óbitos foram registrados devido a neoplasias malignas. Além disso, é estimado que sejam registrados cerca de 13 milhões de óbitos causados pelo câncer no ano de 2030 (Rivankar 2014).

Nos últimos séculos, o tratamento do câncer teve como base cirurgias, cauterizações e medicinas minerais e herbais (Morrison 2010). Foi apenas no início do século passado, por volta da década de 30, que a quimioterapia começou a ser utilizada para o câncer (Arruebo et al. 2011). Na década de 60, a cirurgia e a radioterapia foram os principais métodos utilizados, com taxas de cura de cerca de 33% (DeVita and Chu 2008). A busca por compostos antineoplásicos efetivamente se iniciou na década de 1950. Entretanto, foi apenas no início dos anos 60 que as duas primeiras antraciclina foram isoladas da bactéria produtora de pigmento, *Streptomyces peucetius*. Essas antraciclina foram denominadas daunorrubicina (DNR) e doxorrubicina (DOX), sendo ambas diferenciadas apenas por um grupo metil na terminação da molécula de DNR e um álcool primário na molécula de DOX (Carvalho et al. 2009; Rivankar 2014).

Apesar da disseminação de seu uso e efeito positivo da DNR e, principalmente, da DOX contra células tumorais, ambas as drogas foram identificadas como grandes causadoras de cardiotoxicidade, que pode resultar em disfunções graves como arritmias, cardiomiopatias, disfunção ventricular e falha congestiva. Com o desafio de reduzir tais efeitos colaterais,

foram produzidos por volta de 2000 análogos com diversas alterações e substituições em suas cadeias moleculares (Carvalho et al. 2009; Renu et al. 2018; Rivankar 2014). Apesar de haver inúmeros estudos sobre os efeitos adversos da DOX, desde a sua descoberta, a patogênese da cardiotoxicidade e os mecanismos responsáveis pelas cardiomiopatias ainda não foram completamente elucidados (Cappetta et al. 2017).

Sabe-se que a cardiotoxicidade induzida pela DOX é dose-dependente, pode se apresentar em qualquer estágio do tratamento, sendo classificada como: aguda, subaguda ou crônica. A fase aguda da cardiotoxicidade pode ser detectada dentro de 3 dias por meio de eletrocardiogramas, sendo observadas alterações no segmento ST, redução na amplitude do complexo QRS, taquicardia ou batimentos supraventriculares prematuros; ocorre em cerca de 11% da população tratada com a droga (Songbo et al. 2019; Chatterjee et al. 2010). A incidência da cardiotoxicidade crônica é de cerca de 1,7% e se torna evidente cerca de 30 dias após a administração da DOX, embora possa ocorrer até mesmo entre 6 e 10 dias após o tratamento. A idade é um dos fatores responsáveis pelo risco de desenvolvimento de cardiomiopatias induzidas pela DOX, sendo os mais afetados indivíduos muito jovens e muito velhos. (von Hoff et al. 1979; Chatterjee et al. 2010)

A literatura tem indicado que a mitocôndria possui papel central no efeito cardiotóxico da DOX, e que a alta demanda energética e a grande quantidade dessas organelas no tecido cardíaco poderiam explicar a maior suscetibilidade à atividade adversa da droga (Cappetta et al. 2017; Carvalho et al. 2009; Chen et al. 2020; Armstrong and Dass 2018). Segundo Armstrong et al. (2018), apenas cerca de 40% da DOX e seus metabólitos são excretados pelo organismo após os processos metabólicos.

1.2. Doxorrubicina

A DOX é a droga antineoplásica mais potente e mais utilizada na quimioterapia do câncer, sendo empregada no tratamento de tumores sólidos, como os de mama, de ductos biliares, tecido endometrial, esôfago e fígado, osteosarcomas e linfoma não-Hodgkin. (Carvalho et al. 2009; Gewirtz 1999). Estudos demonstraram que a ação da DOX está relacionada à capacidade de se ligar a dupla hélice do DNA e também a proteínas que estão envolvidas no processo de replicação e transcrição (Box 2007). Foi também demonstrado que antraciclinas como a DOX se ligam não somente ao DNA nuclear, como também ao DNA mitocondrial (mtDNA), e que isso ocorre porque a DOX possui grande afinidade a um fosfolípido presente na membrana interna da mitocôndria, a cardiolipina (Ashley and Poulton 2009). A DOX também é conhecida por ser um “veneno” para a topoisomerase II (proteína envolvida no processo de replicação e transcrição da dupla-fita de DNA), a qual desfaz a torção natural que ocorre na fita. Quando a DOX afeta a topoisomerase II, causa um colapso no complexo responsável pelos processos de separação e religamento das fitas, levando à quebra da fita e consequente sinalização de apoptose para as células (Swift et al. 2006).

1.3. Mitocôndrias no tecido cardíaco e estresse oxidativo

O coração possui alta e contínua demanda por metabolismo oxidativo para manter a produção de ATP. Assim sendo, o cardiomiócito possui grande número de mitocôndrias, sendo cerca de 40% do volume celular ocupado por essas organelas (Duncan 2011). A mitocôndria é a maior fonte de ATP no coração e o ATP se encontra reduzido em quadros de insuficiência cardíaca. A cadeia transportadora de elétrons (CTE) é um componente importante para a produção de ATP. Defeitos na CTE têm sido reportados em casos de insuficiência cardíaca. O coração não possui excesso de capacidade de produção de energia, utilizando 90% de toda a sua capacidade oxidativa durante um exercício intenso. Noventa por cento dessa capacidade é atendida pela fosforilação oxidativa da mitocôndria. Déficit na energia cardíaca tem sido

apontado em casos de insuficiência cardíaca devido a imparidades nos componentes bioenergéticos cardíacos (Rosca and Hoppel 2013).

A DOX possui grande afinidade pela cardiolipina (fosfolípido encontrado na membrana mitocondrial interna), fato que contribui para sua interação com os componentes da cadeia transportadora de elétrons (CTE) e a consequente inibição das proteínas dos complexos I e II (pertencentes à CTE e responsáveis pela transferência de elétrons oriundos do metabolismo celular para posterior produção de ATP) (Yen et al. 1999; Xiong et al. 2006; Sousa et al. 2018). Além disso, os elétrons que normalmente seriam utilizados pela CTE interagem com a DOX, promovendo o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e o comprometimento da produção de ATP (Marcillat et al. 1989; Goormaghtigh et al. 1986; Gorini et al. 2018). A DOX pode interagir indiretamente com o genoma mitocondrial por meio do aumento da produção de EROs, e tal interação pode gerar danos à molécula de DNA ou aumentar a taxa de erros transcripcionais, ambos os casos culminando em alterações importantes na mitocôndria. Estudos utilizando diferentes modelos experimentais demonstraram o aumento de danos no DNA mitocondrial (mtDNA) após a exposição à DOX, dando suporte à hipótese de que esse tipo de alteração pode potencializar a ação cardiotóxica da droga (Lebrecht et al. 2003; 2005; Li et al. 2012). De fato, mutações no mtDNA podem ter consequências deletérias para o tecido, uma vez que este codifica importantes componentes do complexo respiratório mitocondrial (Bonora et al. 2012; Alexeyev et al. 2013).

1.4. Aldeído desidrogenases

Uma das consequências do aumento do estresse oxidativo mitocondrial induzido pela DOX é o processo de peroxidação de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) presentes nas bicamadas lipídicas das membranas biológicas. Dentre os produtos dessa peroxidação o 4-hidroxinonal (4-HNE) desempenha atividade relevante na toxicidade (Zhong and Yin 2015; Ayala et al. 2014). O 4-HNE tem potencial de formar adutos com grande variedade de biomoléculas, e estudos têm

mostrado que, após o tratamento com DOX, os níveis de 4-HNE e de adutos com proteínas mitocondriais de cardiomiócitos ficam elevados, levando a diminuição significativa de atividades enzimáticas (Zhong et al. 2015; Zhao et al. 2014; Hlaváčová et al. 2015). Nesse contexto, a família de enzimas denominadas aldeído desidrogenases (ALDHs) tem despertado interesse como possível alternativa para minimizar os efeitos adversos de quimioterápicos como a DOX. Particularmente, a enzima mitocondrial aldeído-desidrogenase 2 (ALDH2) vem recebendo atenção especial devido ao papel que desempenha na oxidação de aldeídos endógenos como o 4-HNE e o malondialdeído (MDA) (Chen et al. 2010; Chen et al. 2014).

1.5. Alda-1

Diante das evidências que indicam a ação da ALDH2 na prevenção de danos celulares, tem-se aumentado a busca por ativadores seletivos desta enzima. Um exemplo é a classe de moléculas que inclui as Aldas, entre as quais a Alda-1 [N- (1,3-benzodioxol-5-ilmetil) -2,6-diclorobenzamida], agonista que funciona como chaperona química, aumentando a eficiência catalítica da ALDH2 (Chen et al. 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a Alda-1, além de aumentar a atividade catalítica, protege a atividade enzimática da ALDH2 contra a inativação induzida pelo 4-HNE, permitindo a manutenção da sua ação mesmo na presença de altas concentrações do aldeído (Doorn et al. 2006; Chen et al. 2009; Perez-Miller et. al 2010; Chen et al. 2014). Recentemente, foi identificado que a Alda-1 foi capaz de modular a expressão de genes importantes tanto para a atividade mitocondrial como para o metabolismo energético de células cardíacas de ratos Wistar (Souza et al. 2021). No entanto, apesar da literatura evidenciar o potencial cardioprotetor da Alda-1, sua possível ação sobre as mitocôndrias não foi completamente investigada, não sendo, portanto, totalmente compreendida (Chen et al. 2014).

1.6. Linhagem celular H9c2

A linhagem celular H9c2 foi originalmente derivada do tecido ventricular embrionário de ratos (Kimes and Brandt 1976). Possui diversas similaridades aos cardiomiócitos primários, como morfologia da membrana, expressão da proteína G e propriedades eletrofísicas (Watkins et al 2011). São células imortalizadas com fenótipos cardíacos, produzem grandes quantidades de ATP, grande massa mitocondrial e atividade respiratória. Em comparação com outras linhagens celulares cardíacas, a linhagem H9c2 demonstrou ser mais próxima a cardiomiócitos primários (Kuznetsov et al. 2015).

2. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi investigar se alterações mitocondriais estão associadas à cardiotoxicidade induzida pela DOX e a possível ação protetora da Alda-1.

2.1. Objetivos específicos

Em cardiomioblastos tratados *in vitro* com a DOX e a Alda-1 foram avaliados:

- a viabilidade celular;
- a geração de EROs mitocondrial;
- o potencial de membrana mitocondrial;
- a massa mitocondrial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de células musculares cardíacas (linhagem H9c2)

A linhagem H9c2 de mioblastos cardíacos de ratos, foi adquirida do European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). As células foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂, em meio DMEM (Gibco™) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de solução de penicilina, estreptomicina e anfotericina (Sigma). As células foram submetidas ao seguinte protocolo de análise: 24 horas após doses únicas de DOX (0,1 e 1 µM) e de Alda-1 (20 µM); 2). As células foram semeadas 48 horas antes do tratamento com a DOX/Alda-1 e permaneceram expostas às drogas por período de 24 horas. Os resultados foram obtidos de experimentos em triplicata.

3.2. Ensaio de viabilidade celular (MTS)

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTS. Este é um método colorimétrico que se baseia na biorredução do composto MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] em meio de cultura (formazan). Tal processo é realizado por enzimas mitocondriais e a mudança de coloração do meio reflete diretamente a atividade celular, que é medida em espectrofotômetro (absorbância). Para o ensaio MTS as células H9c2 foram semeadas 48 horas antes do tratamento com a DOX/Alda-1 a uma densidade de 3 x 10³ células por poço (placas de 96 poços). Após 24 horas, as drogas foram retiradas e as células expostas ao MTS por 1h30min em incubadora de CO₂ a 5% e 37°C para metabolização do composto. A placa de cultura foi analisada em leitor de placa com comprimento de onda ajustado para 490 nm.

3.3. Caracterização da dinâmica mitocondrial

3.3.1. Detecção do superóxido mitocondrial

A formação de superóxido mitocondrial foi medida por citometria de fluxo utilizando-se o corante fluorescente MitoSOX Red (Invitrogen™), que tem como alvo mitocôndrias em células vivas. Resumidamente, para este ensaio as células H9c2 foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 e submetidas aos protocolos tratamento. Após 24h, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, foram adicionados 250 μ L de PBS e MitoSox Red (3 μ M), e a suspensão de células incubada por 30 minutos. Após esse período, o MitoSOX Red foi excitado por feixe de laser (488 nm), os dados coletados em FSC, SSC, 585/42 nm em citômetro Guava EasyCyte 8 (Luminex) e posteriormente analisados utilizando-se o software InCyte 2.7 (Luminex). Debris celulares, representados por baixo FSC e SSC, foram excluídos da análise. Serão contabilizados 5000 eventos por amostra e os dados foram apresentados em histograma de intensidade média de fluorescência de MitoSOX e/ou gráfico de barras e comparados com o controle negativo com apenas PBS, sem presença do fluoróforo.

3.3.2. Quantificação da massa mitocondrial

A detecção da massa mitocondrial foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o MitoTracker™ Green (Invitrogen™), marcador mitocondrial permeável às células vivas e usado para a identificação de mitocôndrias independente do seu potencial de membrana. Para este ensaio os mioblastos cardíacos H9c2 foram semeados em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 . As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e adicionados 250 μ L de PBS e MitoTracker™ Green (50 nM), seguido por incubação por 30 minutos. Após este período o fluoróforo foi excitado utilizando-se laser a 488 nm, e os dados coletados em FSC, SSC, 525/30 nm utilizando-se citômetro Guava EasyCyte 8 (LUMINEX). Debris celulares, representados por baixo FSC e

SSC foram excluídos da análise. Foram contabilizados 5000 eventos por amostra e os dados foram apresentados por histograma de intensidade média de fluorescência de MitoTracker e/ou gráfico de barras e comparados com o controle com apenas PBS, sem presença do fluoróforo.

3.3.3. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

A detecção do potencial de membrana mitocondrial foi feita por citometria de fluxo utilizando o fluoróforo tetrametilrhodamina (Invitrogen™) (TMRM), que se acumula em mitocôndrias com potencial de membrana normal, gerando forte sinal. Resumidamente, para este ensaio os mioblastos cardíacos H9c2 foram semeados em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 . As células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, o sobrenadante descartado e foram adicionados 250 μ L de PBS e tetrametilrhodamina (40 nM), seguido por incubação por 30 minutos. Após este período o fluoróforo foi excitado utilizando-se laser a 488 nm e os dados coletados em FSC, SSC, 583/26 nm utilizando-se citômetro Guava Easycyte 8 (LUMINEX). Para este ensaio foi utilizado CCCP (*carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone*) na concentração de 10 μ M como controle positivo da reação (esta droga atua sobre a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias, comprometendo o gradiente de prótons formado entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial e favorecendo a despolarização da membrana mitocondrial). Debris celulares, representados por baixo FSC e SSC, foram excluídos da análise. Foram contabilizados 5000 eventos por amostra e os dados apresentados por histograma de intensidade média de fluorescência e/ou gráfico de barras e comparados com o controle com apenas PBS, sem presença do fluoróforo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Viabilidade celular

Os dados mostraram que tanto o DMSO (veículo de diluição da Alda-1) quanto a Alda-1 não apresentaram efeito citotóxico, ou seja, não reduziram a viabilidade celular em relação ao controle negativo (grupo tratado somente com o meio de cultura). Diferentemente, o tratamento com 1 μM , mas não com 0,1 μM de DOX, causou redução da viabilidade celular ($p < 0,0001$) sugerindo efeito dose-dependente como demonstrado na literatura, (Wu et al. 2021). Não foi observado efeito significativo no tratamento com a DOX associada à Alda-1 (Figuras 1A e B).

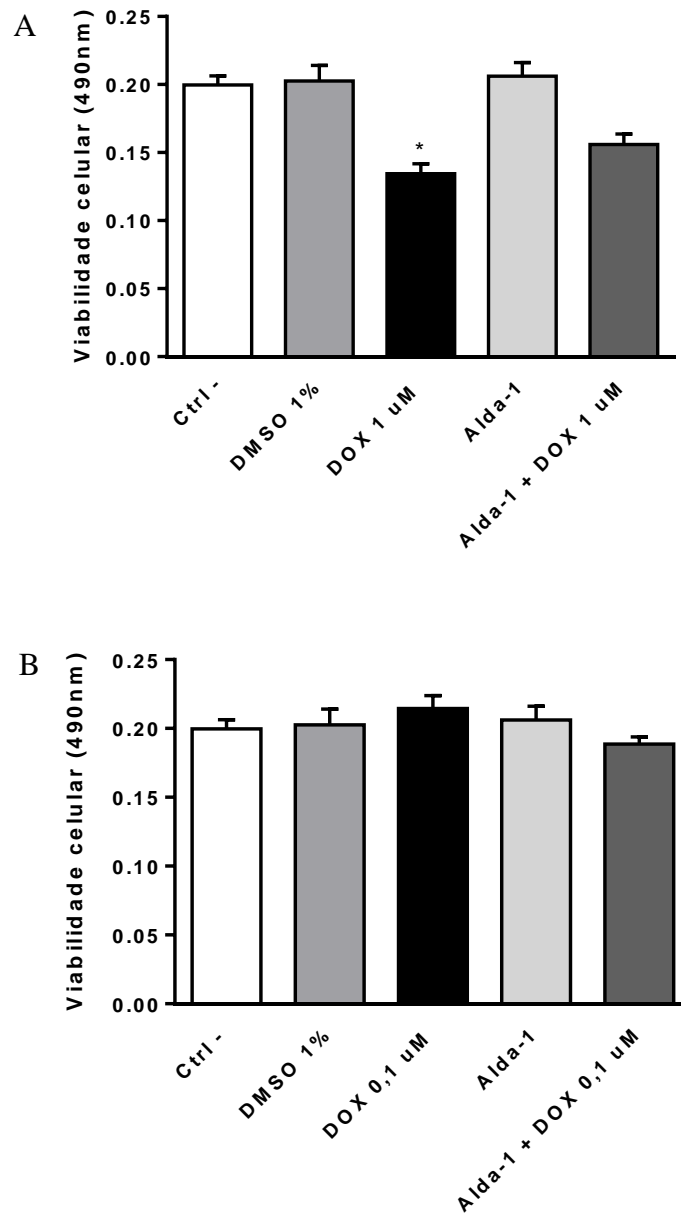


Figura 1. Viabilidade celular (MTS) de mioblastos cardíacos tratados com 1 μ M (A) e 0,1 μ M (B) de doxorrubicina (DOX) e com a Alda-1 (20 μ M). Ctrl -: controle negativo (tratado apenas com o fluoróforo); DMSO (dimetil sulfóxido, veículo de diluição da DOX); * $p < 0,01$ (em relação ao DMSO 1%)

4.2. Superóxido mitocondrial

A análise por citometria de fluxo demonstrou aumento significativo ($p < 0,01$) na produção de superóxido mitocondrial nos grupos tratados com a DOX, 0,1 e 1 μM , em relação ao grupo controle negativo (tratado apenas com o fluoróforo) (Figuras 2 A e B), reforçando o efeito dose-dependente da DOX (Renu et al. 2018). O aumento das EROs foi semelhante ao descrito na literatura, confirmando que a DOX é uma droga indutora de estresse oxidativo (Zhao et al. 2020). O estresse oxidativo é o eixo principal dos efeitos adversos da DOX e, a partir de sua ação na mitocôndria, ocorre a peroxidação da bicamada lipídica, formando o 4-HNE e degradando as atividades enzimáticas. Os radicais formados no estresse oxidativo podem interagir com o mtDNA causando danos com consequente disfunção da organela e eventual apoptose. (Li et al. 2015; Zhao et al. 2020; Dong et al. 2022). A produção de superóxido, produto do estresse oxidativo, está ligada diretamente ao complexo I, e representa o ponto de entrada de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (Sousa et al. 2018). Portanto, é possível que a DOX interaja com o complexo I, inativando ou reduzindo sua atividade, e, nesse caso, mais elétrons estariam disponíveis. Resultados semelhantes foram encontrados por Lebrecht et al. (2003), que observaram, em modelo *in vivo*, o aumento de EROs no tecido cardíaco de ratos Wistar macho. Da mesma forma, Wu et al. (2021) estudando os efeitos da DOX em condrócitos, verificaram que aumento na produção de EROs e que o estresse oxidativo interferiu na diferenciação dessas células.

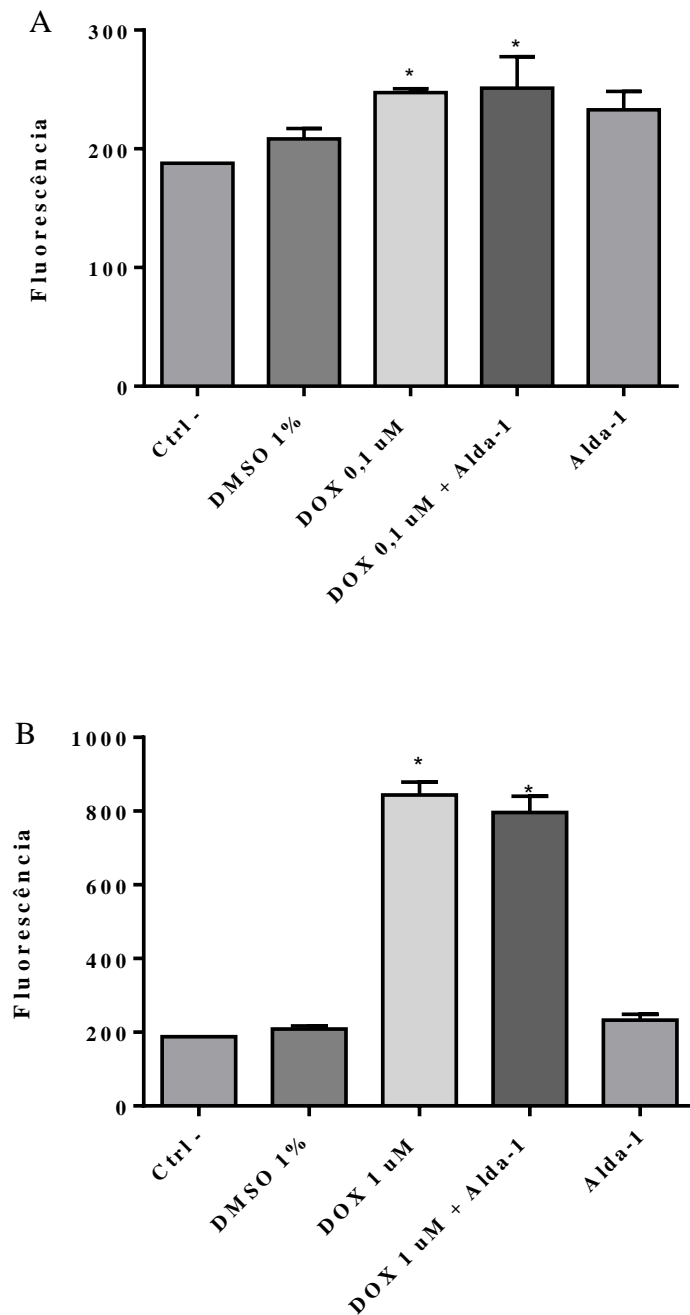


Figura 2. Níveis de superóxido mitocondrial em mioblastos cardíacos tratados com a doxorubicina (DOX) 0,1 μ M (A) e 1 μ M (B) e com a Alda-1 (20 μ M); Ctrl-: controle negativo (tratado apenas com o fluoróforo); DMSO (dimetil sulfóxido, veículo de diluição da DOX); * $p < 0,01$ (em relação ao DMSO1%)

4.3. Massa mitocondrial

A massa mitocondrial representa o equilíbrio entre as taxas de biogênese e degradação da mitocôndria. Logo, esta análise foi realizada a fim de buscar compreender se a DOX possui influência direta na degradação dessas organelas (Dominy and Puigserver 2013). Os resultados mostraram que apenas a dose de 1 μ M de DOX foi capaz de reduzir a massa mitocondrial, isto é, causou deterioração ou redução na biogênese das mitocôndrias. Novamente, não foi observado efeito da Alda-1 sobre a ação da DOX (Figuras 3 A e B). Os resultados reforçam dados da literatura que mostram que a DOX pode reduzir a massa mitocondrial de cardiomiócitos (Hasinoff et al. 2003; Kluza et al. 2004). Essa redução se reflete diretamente na capacidade das células de produzirem novas mitocôndrias e regularem sua forma e quantidade de acordo com a demanda energética e condições de estresse oxidativo (Costanzini et al. 2019). Logo, de acordo com os dados obtidos, pode-se sugerir que em cenários de quimioterapia com a DOX, a célula perde parte da função de biogênese da mitocôndria e a organela tem seu formato alterado, fazendo com que não seja capaz de suprir toda a demanda energética necessária para o bom funcionamento do tecido e órgão. Portanto, parece haver relação direta entre o tratamento com a DOX e a quantidade de mitocôndrias disponíveis no citoplasma.

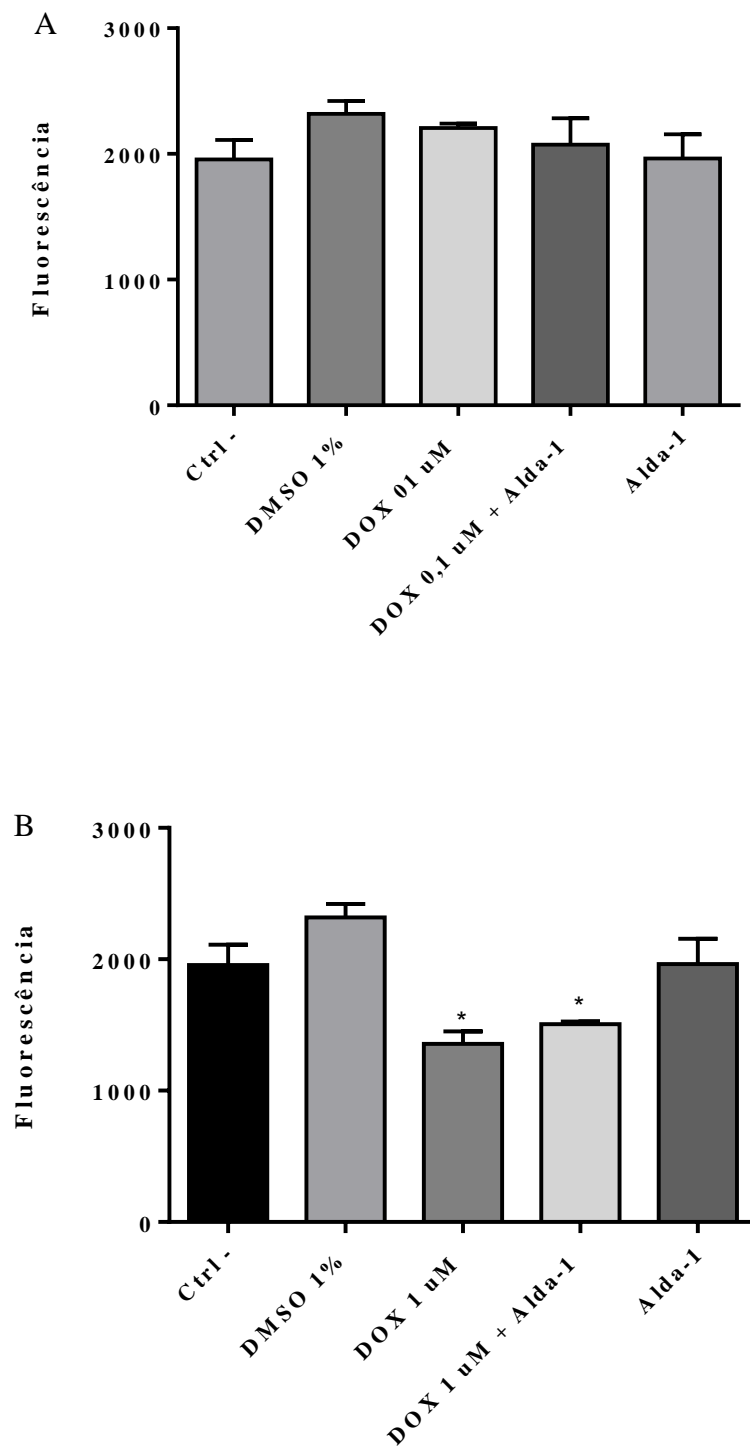


Figura 3. Massa mitocondrial em mioblastos cardíacos tratados com a doxorubicina (DOX) a 0,1 (A) e 1 (B) μ M e com a Alda-1 (20 μ M); Ctrl-: controle negativo (tratado apenas com o fluoróforo); DMSO (dimetil sulfóxido, veículo de diluição da DOX); * $p < 0,01$ (em relação ao DMSO1%)

4.4. Potencial de membrana mitocondrial

A análise do potencial de membrana teve como objetivo verificar se a DOX poderia causar a despolarização permanente da membrana mitocondrial, o que normalmente se traduz na redução ou falta de atividade da organela, com consequente indução de apoptose (Xiao et al. 2017). O controle negativo foi tratado apenas com o fluoróforo, enquanto o controle positivo foi tratado com CCCP, que faz com que haja a despolarização da membrana. Os dados obtidos indicaram que a concentração de 0,1 μM de DOX foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,01$) o potencial de membrana, indicando uma diminuição na atividade mitocondrial das células tratadas. Da mesma forma do observado para os parâmetros anteriores, não foi detectada ação da Alda-1 sobre o tratamento com a DOX (Figuras 4 A e B).

Nas células a em que foi utilizada a DOX à 1 μM , o resultado foi diferente. Ao invés da despolarização da membrana mitocondrial ser ainda mais atenuada (dose-dependente) os tratamentos com a droga (associada ou não à Alda-1) levaram a aumento do potencial de membrana. Tal efeito também foi observado em outro estudo utilizando a DOX e o fluoróforo TMRM na linhagem celular HepG2 (Lieggi et al 2010). Segundo pesquisadores o aumento da fluorescência pode ter ocorrido devido a afinidade da DOX e do TMRM à glicoproteína-P (presente na superfície da membrana celular de diversos tecidos, inclusive do coração) que é relacionada à resistência a múltiplas drogas e responsável por transporte ativo de fármacos para fora da célula (Qu et al. 2022). A DOX e o TMRM se acumulam dentro da célula devido a essa afinidade e, por causa dos efeitos da DOX, o transporte do excesso do fluoróforo para fora da célula não ocorre, pois a proteína é inibida e o TMRM se mantém acumulado no interior da célula. Portanto, o aumento observado do potencial de membrana poderia ser explicado pela afinidade do próprio TMRM à DOX que possuem afinidade com a glicoproteína-P. Assim, pode-se sugerir que a emissão aumentada da fluorescência não seria

consequência direta da ação da DOX, uma vez que a excitação máxima da DOX é de 500 nm e o TMRM é excitado à 570 nm (Lieggi, 2010).

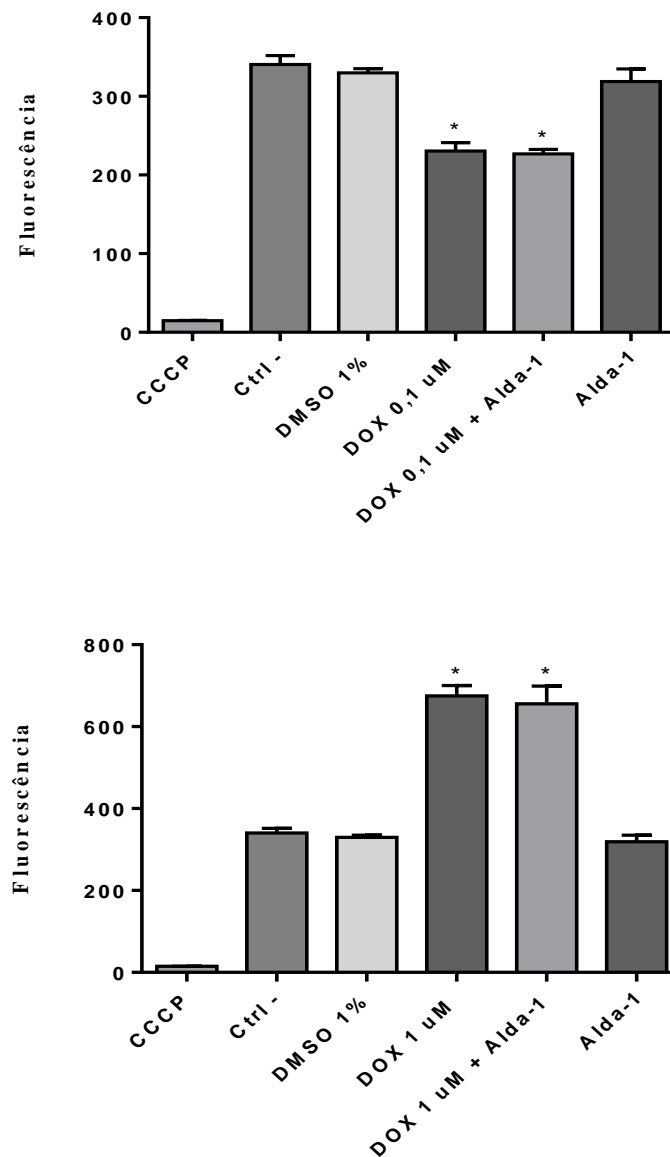


Figura 4. Potencial de membrana mitocondrial em mioblastos cardíacos tratados com a doxorrubicina (DOX) 0,1 (A) e 1 (B) μM e com a Alda-1 (20 μM). Ctrl-: controle negativo (tratado apenas com o fluoróforo); DMSO (dimetil sulfóxido, veículo de diluição da DOX); CCCP (cianeto de carbonila 3-clorofenilhidrazona, despolarizador de membrana) * $p < 0,01$ (em relação ao DMSO 1%)

4.5. Alda-1

No presente estudo, a Alda-1 não se mostrou eficaz na proteção celular contra os efeitos adversos da DOX. A Alda-1 tem como principal enzima alvo a ALDH2, cuja atividade é fundamental na eliminação de aldeídos tóxicos produzidos durante o estresse oxidativo (por exemplo, 4-hidroxi-2-nonenal e malondialdeído), ou adquirido por exposição ambiental (por exemplo, acroleína, acetaldeído, formaldeído, etc.) (Marchitti et al. 2008; Bonora et al. 2012). Contudo, há dados que sugerem que os efeitos benéficos do Alda-1 ocorrem apenas em processos de alto estresse oxidativo e efeitos adversos podem ser encontrados em condições basais (Belmont-Díaz et al. 2016). De fato, Hammad et al. (2018) avaliando a disfunção tubular renal induzida por lesão isquêmica observou que a Alda-1, ao invés de proteger os rins, levou à deposição de cristais intratubulares que resultou em nefropatia cristalina. Além dos fatores apresentados, o tamanho do substrato pode também estar relacionado à ausência de atividade protetora da Alda-1. Segundo Perez-Miller et. al (2010) para a ativação da ALDH2 e funcionamento correto da Alda-1 é necessário que o sítio ativo em que a Alda-1 se liga à ALDH2 se sobreponha ao sítio ativo da daidzeína, conhecido inibidor da ALDH2.

Diante de nossos achados pode-se sugerir que a ação dose-dependente da DOX evidenciada também em outros estudos (Wu et al. 2021; Lüpertz et al. 2010), assim como as concentrações utilizadas da Alda-1 podem ter sido fatores relacionados à não detecção da atividade protetora da Alda-1 nos parâmetros analisados.

5. CONCLUSÃO

Este estudo objetivou identificar possíveis mecanismos relacionados à atividade cardioprotetora da DOX, assim como avaliar se a Alda1 poderia interferir nas ações deletérias do antineoplásico. Os resultados confirmaram os efeitos da DOX sobre as mitocôndrias (massa, estresse oxidativo e polarização da membrana) de células cardíacas e demonstraram que a Alda-1, nas condições testadas, não apresentou atividade protetora sobre a organela. Contudo, outras análises devem ser realizadas, a fim de melhor entender o potencial cardioprotetor da Alda1 sobre a ação da DOX.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexeyev, Mikhail, Inna Shokolenko, Glenn Wilson, and Susan LeDoux. 2013. “The Maintenance of Mitochondrial DNA Integrity - Critical Analysis and Update.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (5): 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012641>.
- Armstrong, Jo, and Crispin R. Dass. 2018. “Doxorubicin Action on Mitochondria: Relevance to Osteosarcoma Therapy?” *Current Drug Targets* 19 (5): 432–38. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150416115852>.
- Arruebo, Manuel, Nuria Vilaboa, Berta Sáez-Gutierrez, Julio Lambea, Alejandro Tres, Mónica Valladares, and África González-Fernández. 2011. “Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies.” *Cancers* 3 (3): 3279–3330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>.
- Ashley, Neil, and Joanna Poulton. 2009. “Mitochondrial DNA Is a Direct Target of Anti-Cancer Anthracycline Drugs.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (3): 450–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.11.059>.
- Ayala, Antonio, Mario F. Muñoz, and Sandro Argüelles. 2014. “Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- Belmont-Díaz, Javier A., Belem Yoval-Sánchez, Luis F. Calleja-Castañeda, Juan P. Pardo Vázquez, and José S. Rodríguez-Zavala. 2016. “Alda-1 Modulates the Kinetic Properties of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase (ALDH2).” *FEBS Journal* 283: 3637–50. <https://doi.org/10.1111/febs.13833>.
- Bonora, Massimo, Simone Patergnani, Alessandro Rimessi, Elena de Marchi, Jan M. Suski,

- Angela Bononi, Carlotta Giorgi, et al. 2012. "ATP Synthesis and Storage." *Purinergic Signalling* 8 (3): 343–57. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>.
- Box, Vernon G.S. 2007. "The Intercalation of DNA Double Helices with Doxorubicin and Nagalomycin." *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 26 (1): 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.09.005>.
- Cappetta, Donato, Antonella De Angelis, Luigi Sapio, Lucia Prezioso, Michela Illiano, Federico Quaini, Francesco Rossi, Liberato Berrino, Silvio Naviglio, and Konrad Urbanek. 2017. "Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1521020>.
- Carvalho, Cristina, Renato Santos, Susana Cardoso, Sonia Correia, Paulo Oliveira, Maria Santos, and Paula Moreira. 2009. "Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect." *Current Medicinal Chemistry* 16 (25): 3267–85. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>.
- Chatterjee, Kanu, Jianqing Zhang, Norman Honbo, and Joel S. Karliner. 2010. "Doxorubicin Cardiomyopathy." *Cardiology* 115 (2): 155–62. <https://doi.org/10.1159/000265166>.
- Chen, Che-hong, Grant R Budas, Eric N Churchill, Marie-helene Disatnik, D Thomas, and Daria Mochly-rosen. 2009. "An Activator of Mutant and Wildtype Aldehyde Dehydrogenase Reduces Ischemic Damage to the Heart." *Science* 321 (5895): 1493–95. <https://doi.org/10.1126/science.1158554>.An.
- Chen, Che Hong, Julio Cesar Batista Ferreira, Eric R. Gross, and Daria Mochly-Rosen. 2014. "Targeting Aldehyde Dehydrogenase 2: New Therapeutic Opportunities." *Physiological Reviews* 94 (1): 1–34. <https://doi.org/10.1152/physrev.00017.2013>.

- Chen, Che Hong, Lihan Sun, and Daria Mochly-Rosen. 2010. "Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase and Cardiac Diseases." *Cardiovascular Research* 88 (1): 51–57. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq192>.
- Chen Y, Huang T, Shi W, Fang J, Deng H, Cui G. 2020. "Potential targets for intervention against doxorubicin-induced cardiotoxicity based on genetic studies: a systematic review of the literature." *J Mol Cell Cardiol* 138: 88-98. doi: 10.1016/j.yjmcc.2019.11.150.
- Costanzini, Anna, Gianluca Sgarbi, Alessandra Maresca, Valentina Del Dotto, Giancarlo Solaini, and Alessandra Baracca. 2019. "Mitochondrial Mass Assessment in a Selected Cell Line under Different Metabolic Conditions." *Cells* 8 (11): 1–14. <https://doi.org/10.3390/cells8111454>.
- Cunha Menezes Souza, Leonardo da, Fábio Henrique Fernandes, Paula Torres Presti, Ana Lucia Anjos Ferreira, and Daisy Maria Fávero Salvadori. 2021. "Effect of Doxorubicin on Cardiac Lipid Metabolism-Related Transcriptome and the Protective Activity of Alda-1." *European Journal of Pharmacology* 898 (September 2020): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173955>.
- DeVita, Vincent T., and Edward Chu. 2008. "A History of Cancer Chemotherapy." *Cancer Research* 68 (21): 8643–53. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6611>.
- Dominy, John E., and Pere Puigserver. 2013. "Mitochondrial Biogenesis through Activation of Nuclear Signaling Proteins." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015008>.
- Dong, Qincai, Dapei Li, Huailong Zhao, Xun Zhang, Yue Liu, Yong Hu, Yi Yao, et al. 2022. "Anti-Apoptotic HAX-1 Suppresses Cell Apoptosis by Promoting c-Abl Kinase-Involved ROS Clearance." *Cell Death and Disease* 13 (4). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04748-2>.

- Doorn, Jonathan A., Thomas D. Hurley, and Dennis R. Petersen. 2006. "Inhibition of Human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase by 4-Hydroxynon-2-Enal and 4-Oxonon-2-Enal." *Chemical Research in Toxicology* 19 (1): 102–10. <https://doi.org/10.1021/tx0501839>.
- Duncan, Jennifer G. 2011. "Mitochondrial Dysfunction in Diabetic Cardiomyopathy." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813 (7): 1351–59. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.014>.
- Gewirtz, David A. 1999. "A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin." *Biochemical Pharmacology* 57 (7): 727–41. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00307-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00307-4).
- Goormaghtigh, E., P. Huart, R. Brasseur, and J. M. Ruyschaert. 1986. "Structure of the Adriamycin-Cardiolipin Complex." *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* 94 (4): 7. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(90\)80012-v](https://doi.org/10.1016/0301-4622(90)80012-v).
- Gorini, Stefania, Antonella De Angelis, Liberato Berrino, Natalia Malara, Giuseppe Rosano, and Elisabetta Ferraro. 2018. "Chemotherapeutic Drugs and Mitochondrial Dysfunction: Focus on Doxorubicin, Trastuzumab, and Sunitinib." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7582730>.
- Hammad, Fayez T., Suhail Al-Salam, Priya Yuvaraju, and Loay Lubbad. 2018. "Alda-1, an Aldehyde Dehydrogenase-2 Agonist, Causes Deterioration in Renal Functions Following Ischemia–Reperfusion Injury Due to Crystalline Nephropathy." *Drug Development Research* 79 (7): 315–23. <https://doi.org/10.1002/ddr.21454>.
- Hasinoff, Brian B., Kareena L. Schnabl, Rosemary A. Marusak, Daywin Patel, and Erwin Huebner. 2003. "Dexrazoxane (ICRF-187) Protects Cardiac Myocytes against

- Doxorubicin by Preventing Damage to Mitochondria.” *Cardiovascular Toxicology* 3 (2): 89–99. <https://doi.org/10.1385/CT:3:2:89>.
- Hlaváčová, M., J. Gumulec, T. Stračina, M. Fojtů, M. Raudenská, M. Masařík, M. Nováková, and H. Paulová. 2015. “Different Doxorubicin Formulations Affect Plasma 4-Hydroxy-2-Nonenal and Gene Expression of Aldehyde Dehydrogenase 3A1 and Thioredoxin Reductase 2 in Rat.” *Physiological Research* 64: S653–60. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933223>.
- Hoff, D. D. von, M. W. Layard, P. Basa, H. L. Davis, A. L. Von Hoff, M. Rozenzweig, and F. M. Muggia. 1979. “Risk Factors for Doxorubicin-Induced Congestive Heart Failure.” *Annals of Internal Medicine* 91 (5): 710–17. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-91-5-710>.
- Kimes, B. W., and B. L. Brandt. 1976. “Properties of a Clonal Muscle Cell Line from Rat Heart.” *Experimental Cell Research* 98 (2): 367–81. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(76\)90447-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90447-X).
- Kluza, Jérôme, Philippe Marchetti, Miguel Angel Gallego, Steve Lancel, Charles Fournier, Anne Loyens, Jean Claude Beauvillain, and Christian Bailly. 2004. “Mitochondrial Proliferation during Apoptosis Induced by Anticancer Agents: Effects of Doxorubicin and Mitoxantrone on Cancer and Cardiac Cells.” *Oncogene* 23 (42): 7018–30. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207936>.
- Kuznetsov, Andrey V., Sabzali Javadov, Stephan Sickinger, Sandra Frotschnig, and Michael Grimm. 2015. “H9c2 and HL-1 Cells Demonstrate Distinct Features of Energy Metabolism, Mitochondrial Function and Sensitivity to Hypoxia-Reoxygenation.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1853 (2): 276–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.015>.
- Lebrecht, Dirk, Aikaterini Kokkori, Uwe Peter Ketelsen, Bernhard Setzer, and Ulrich A.

- Walker. 2005. "Tissue-Specific MtDNA Lesions and Radical-Associated Mitochondrial Dysfunction in Human Hearts Exposed to Doxorubicin." *Journal of Pathology* 207 (4): 436–44. <https://doi.org/10.1002/path.1863>.
- Lebrecht, Dirk, Bernhard Setzer, Uwe Peter Ketelsen, Jörg Haberstroh, and Ulrich A. Walker. 2003. "Time-Dependent and Tissue-Specific Accumulation of MtDNA and Respiratory Chain Defects in Chronic Doxorubicin Cardiomyopathy." *Circulation* 108 (19): 2423–29. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093196.59829.DF>.
- Li, Bo, Do Sung Kim, Raj Kumar Yadav, Hyung Ryong Kim, and Han Jung Chae. 2015. "Sulforaphane Prevents Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Cell Death in Rat H9c2 Cells." *International Journal of Molecular Medicine* 36 (1): 53–64. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2199>.
- Li, Hongzhi, Danhui Liu, Jianxin Lu, and Yidong Bai. 2012. "Physiology and Pathophysiology of Mitochondrial DNA." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 942: 39–51. https://doi.org/10.1007/978-94-007-2869-1_2.
- Lieggi, N. T., A. Edvardsson, and P. J. O'Brien. 2010. "Translation of Novel Anti-Cancer Cytotoxicity Biomarkers Detected with High Content Analysis from an in Vitro Predictive Model to an in Vivo Cell Model." *Toxicology in Vitro* 24 (8): 2063–71. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.07.014>.
- Lüpertz, Regine, Wim Wätjen, Regine Kahl, and Yvonne Chovolou. 2010. "Dose- and Time-Dependent Effects of Doxorubicin on Cytotoxicity, Cell Cycle and Apoptotic Cell Death in Human Colon Cancer Cells." *Toxicology* 271 (3): 115–21. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.03.012>.
- Marchitti, Satori A., Chad Brocker, Dimitrios Stagos, and Vasilis Vasiliou. 2008. "Non-P450 Aldehyde Oxidizing Enzymes: The Aldehyde Dehydrogenase Superfamily." *Expert*

Opinion on Drug Metabolism and Toxicology 4 (6): 697–720.

<https://doi.org/10.1517/17425255.4.6.697>.

Marcillat, O., Y. Zhang, and K. J.A. Davies. 1989. “Oxidative and Non-Oxidative Mechanisms in the Inactivation of Cardiac Mitochondrial Electron Transport Chain Components by Doxorubicin.” *Biochemical Journal* 259 (1): 181–89.

<https://doi.org/10.1042/bj2590181>.

Morrison, W.B. 2010. “Cancer Chemotherapy: An Annotated History.” *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24 (3): 1249–62. <https://doi.org/10.1177/1461444810365020>.

Perez-Miller S, Younus H, Vanam R, Chen CH, Mochly-Rosen D, Hurley TD. 2010. “Alda-1 Is an Agonist and Chemical Chaperone for the Common Human Aldehyde Dehydrogenase 2 Variant.” *Nat Struct Mol Biol.* 17 (2): 159–64.

<https://doi.org/10.1038/nsmb.1737.Alda-1>.

Qu, Jiameng, Fan Ke, Xiao Yang, Yue Wang, Huarong Xu, Qing Li, and Kaishun Bi. 2022. “Induction of P-Glycoprotein Expression by Dandelion in Tumor and Heart Tissues: Impact on the Anti-Tumor Activity and Cardiotoxicity of Doxorubicin.” *Phytomedicine* 104 (April): 154275. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154275>.

Renu, Kaviyarasi, Abilash V.G., Tirupathi Pichiah Tirupathi, and Sankarganesh Arunachalam. 2018. *Molecular Mechanism of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy – An Update*.

European Journal of Pharmacology. Vol. 818.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.10.043>.

Rivankar, Sangeeta. 2014. “An Overview of Doxorubicin Formulations in Cancer Therapy.” *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 10 (4): 853–58.

<https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>.

- Rosca, Mariana G., and Charles L. Hoppel. 2013. "Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure." *Heart Failure Reviews* 18 (5): 607–22. <https://doi.org/10.1007/s10741-012-9340-0>.
- Songbo, Mei, Hong Lang, Cai Xinyong, Xiao Bin, Zhang Ping, and Shao Liang. 2019. "Oxidative Stress Injury in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity." *Toxicology Letters* 307 (December 2018): 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.02.013>.
- Sousa, Joana S., Edoardo D'Imprima, and Janet Vonck. 2018. *Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. Subcellular Biochemistry*. Vol. 87. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_7.
- Swift, Lonnie P., Ada Rephaeli, Abraham Nudelman, Don R. Phillips, and Suzanne M. Cutts. 2006. "Doxorubicin-DNA Adducts Induce a Non-Topoisomerase II-Mediated Form of Cell Death." *Cancer Research* 66 (9): 4863–71. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3410>.
- Watkins, Sarah J., Gillian M. Borthwick, and Helen M. Arthur. 2011. "The H9C2 Cell Line and Primary Neonatal Cardiomyocyte Cells Show Similar Hypertrophic Responses in Vitro." *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* 47 (2): 125–31. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9368-1>.
- Wu, Cheng, Jiayi Luo, Yuanxin Liu, Jiannan Fan, Xianwen Shang, Riguang Liu, Chuan Ye, Jihong Yang, and Hong Cao. 2021. "Doxorubicin Suppresses Chondrocyte Differentiation by Stimulating ROS Production." *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 167 (28): 106013. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106013>.
- Xiao, Bin, Xiao Deng, Grace G.Y. Lim, Wei Zhou, Wuan Ting Saw, Zhi Dong Zhou, Kah Leong Lim, and Eng King Tan. 2017. "P62-Mediated Mitochondrial Clustering Attenuates Apoptosis Induced by Mitochondrial Depolarization." *Biochimica et*

Biophysica Acta - Molecular Cell Research 1864 (7): 1308–17.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.04.009>.

Xiong, Ye, Xuwan Liu, Chuan Pu Lee, Balvin H.L. Chua, and Ye Shih Ho. 2006.

“Attenuation of Doxorubicin-Induced Contractile and Mitochondrial Dysfunction in Mouse Heart by Cellular Glutathione Peroxidase.” *Free Radical Biology and Medicine*

41 (1): 46–55. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.024>.

Yen, Hsiu Chuan, Terry D. Oberley, C. Gary Gairola, Luke I. Szweda, and Daret K. St. Clair.

1999. “Manganese Superoxide Dismutase Protects Mitochondrial Complex I against Adriamycin-Induced Cardiomyopathy in Transgenic Mice.” *Archives of Biochemistry and Biophysics*

362 (1): 59–66. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.1011>.

Zhao, Xiao Xiao, Haneul Cho, Sora Lee, Jong Shin Woo, Min Young Song, Xian Wu Cheng,

Kyung Hye Lee, and Weon Kim. 2020. “BAY60-2770 Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Decreased Oxidative Stress and Enhanced Autophagy.” *Chemico-Biological Interactions*

328 (March): 109190. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109190>.

Zhao, Y., S. Miriyala, L. Miao, M. Mitov, D. Schnell, S. K. Dhar, J. Cai, et al. 2014. “Redox

Proteomic Identification of HNE-Bound Mitochondrial Proteins in Cardiac Tissues Reveals a Systemic Effect on Energy Metabolism after Doxorubicin Treatment.” *Free Radical Biology and Medicine*

72: 55–65.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.001>.

Zhong, Huiqin, and Huiyong Yin. 2015. “Role of Lipid Peroxidation Derived 4-

Hydroxynonenal (4-HNE) in Cancer: Focusing on Mitochondria.” *Redox Biology* 4:

193–99. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.011>.

Zhong, Wei, Wenliang Zhang, Qiong Li, Guoxiang Xie, Qian Sun, Xiuhua Sun, Xiaobing Tan,

Xinguo Sun, Wei Jia, and Zhanxiang Zhou. 2015. “Pharmacological Activation of

Aldehyde Dehydrogenase 2 by Alda-1 Reverses Alcohol-Induced Hepatic Steatosis and Cell Death in Mice.” *Journal of Hepatology* 62 (6): 1375–81.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.022>.