

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 01/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**MECANISMOS DE CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM RATOS WISTAR E POTENCIAL
CARDIOPROTETOR DA ALDA-1**

LEONARDO DA CUNHA MENEZES SOUZA

**BOTUCATU – SP
JANEIRO/2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**MECANISMOS DE CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM RATOS WISTAR E POTENCIAL
CARDIOPROTETOR DA ALDA-1**

Doutorando: Leonardo da Cunha Menezes Souza

Orientadora: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientadora: Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

BOTUCATU – SP

JANEIRO/2019

S729m

Souza, Leonardo da Cunha Menezes
MECANISMOS DE CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM RATOS WISTAR E
POTENCIAL CARDIOPROTETOR DA ALDA-1 /
Leonardo da Cunha Menezes Souza. -- Botucatu, 2019
100 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientadora: Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

1. Alda-1, 2. Alterações Mitocondriais. 3. Cardioproteção.
4. Cardiotoxicidade. 5. Doxorubicina

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Aos meus pais com carinho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori pela inspiradora orientação, disponibilidade incondicional e pelo carinho durante todos estes anos. Foi uma grande honra trabalhar neste Projeto sob sua orientação, e seus ensinamentos levarei comigo para sempre como uma valiosa referência.

À professora Dra. Ana Lúcia dos Anjos Ferreira, fundamental para existência deste Projeto de Pesquisa, e cuja coorientação, contínua disponibilidade e contribuição foram essenciais para este trabalho.

To Dr. Yidong Bai for the valuable teachings, supervision and structure during the sandwich doctorate performed in his laboratory at the University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA).

Aos colegas André Luiz Ventura Sávio, Carla Munari, Corina Tomasetti, João Paulo de Castro Marcondes e, especialmente, Fábio Henrique Fernandes e Paulinha Torres Presti, pela grande contribuição nas etapas *in vivo* no biotério.

Ao Sr. Paulo César Georgete pelo suporte técnico, fundamental nas etapas no Biotério do Departamento de Patologia – FMB/UNESP.

To Janice Deng for the important technical support during the experiments in Dr. Yidong Bai's Lab.

Aos integrantes do Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica (OMICS) Amanda Tanamachi, Bruno César Ottoboni Luperini, Carla Munari, Elaine Aparecida Camargo, Gabriela Nogueira Bittencourt, Helenice de Fatima de Lego Marcello, João Paulo de Castro Marcondes, Joara de Paula Campos, Kamila Sauer Veiga Leme, Luciana Maria Feliciano, Maruhen Amir Datsch Silveira, Pablo Felipe Bertolini Andrade, Raphael Toledo, Renato Paschoal Prado, Tathiana Silveira Dorini, Tamara Gomes, Vanessa Lorenço Perese.

To the colleagues from Dr. Yidong Bai's lab at the UTHSCSA, Bi Zhu, Min Zhu, Peiqing Hu and Yusheng Qian.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) pela atenção e suporte durante todo o curso.

To my friends from San Antonio who made this experience in the United States even more special and, in difficult situations, easier to keep going: Adriana Valera Reyes, Alan Vag, Alberto Rodrigues, Andulai Ahmadu, Alvaro Padron, Bhi Zu, Bruno Itaquy, Caroline Gusson Shimoura, Christina Stengl, Danielle Santana Coelho, Fábio Antônio Borges Vigil, Jacqui Mendes, Leila Aguiar, Livia Ferreira, Mitzli Velasco, Pragya Singh, Renata Ciossani, Ryan Chun and Sandeep Kr Malla.

Agradeço ainda mais aqueles integrantes do OMICS que tornaram essa empreitada muito mais agradável e cuja especial amizade se estenderá para além dos portões da UNESP: André Luiz Ventura Sávio, Fábio Henrique Fernandes, Jhennifer Rebecca Cal, Juliana Lara, Mário Otávio Botasso Nasciutti e Phillippe Franklin Coelho Magalhães. Sou muito grato e feliz por ter tido a oportunidade de estar com vocês em tantos momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (2014/09740-0) e auxílio à pesquisa (2012/17280-3) bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus familiares, especialmente meu pai, Genival Corrêa de Souza, minha mãe, Marineuza da Cunha Menezes Souza, e meus irmãos Daniela Menezes Souza e Thiago Menezes Souza, meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio incondicional, que foi ainda mais ampliado pela distância. Vocês representaram nesse caminho um alicerce fundamental. Amo vocês!

Por fim gostaria de agradecer a Deus pela serenidade e coragem em momentos adversos

*“Face á realidade, o que julgamos saber
claramente ofusca o que deveríamos saber.”*

Gaston Bachelard

RESUMO

A cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (DOX), antraciclina isolada da actinobacteria *Streptomyces peucetius* e amplamente utilizada na terapia antineoplásica, corresponde a um dos mais importantes eventos patofisiológicos que limitam sua aplicação clínica. No entanto, não são completamente conhecidos todos os mecanismos envolvidos nessa toxicidade, o que diminui as possibilidades de intervenção e a redução dos efeitos colaterais para os pacientes sob tratamento. Uma das hipóteses é que os aldeídos gerados pela ação da DOX atuam sobre membranas mitocondriais, alterando o estado redox e formando adutos com proteínas, os quais prejudicam o correto funcionamento da organela. Atividades deletérias da DOX sobre outros componentes celulares, como, por exemplo, os ácidos ribonucleicos, são, também, possíveis mecanismos de toxicidade do antineoplásico. Várias estratégias têm sido utilizadas para minimizar os efeitos adversos da DOX. Uma delas, é a busca por compostos que possam proteger as células da ação citotóxica. Nesse sentido, a Alda-1, pertencente ao grupo das chaperonas e agonista da enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2), vem sendo testada com o objetivo de reduzir os efeitos adversos dos metabólitos e radicais gerados pelo antineoplásico. Para investigar outros possíveis mecanismos de ação da DOX e o efeito cardioprotetor da Alda-1, este estudo foi delineado utilizando duas abordagens distintas: experimentos *in vivo*, com ratos Wistar machos submetidos a tratamentos agudos e crônicos com o antineoplásico, e, *in vitro*, em fibroblastos de camundongos e híbridos com heteroplasmia mitocondrial para o gene *ND5* (codifica subunidade ND5 do Complexo I mitocondrial). Foram avaliados perfis de expressão gênica (genes das vias de beta oxidação de ácidos graxos; *Bax*, *Bcl-2*, *CIQBP* e *ALDH2*) e do microRNA miR-34a (regulador da expressão da *ALDH2*), e o processo de lipoperoxidação em cardiomiócitos de ratos tratados com a DOX isoladamente ou em combinação com a Alda-1. *In vitro*, foram investigados os efeitos dos dois compostos sobre a viabilidade celular, sobre a estrutura mitocondrial e sobre o perfil das espécies moleculares da cardiolipina. Além disso, foi avaliado se os níveis de heteroplasmia podiam interferir na ação da DOX. Os resultados confirmaram a ação da DOX sobre o perfil lipídico, aumentando os níveis de triglicerídeos e do VLDL. O tratamento simultâneo com a Alda-1 reverteu tal efeito. As análises de expressão gênica revelaram a hiperexpressão de *Fabp4*, *Slc27a2*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos cardiomiócitos dos animais tratados com a DOX (tratamento agudo). Novamente, a administração associada da Alda-1 foi capaz de reverter as alterações na expressão dos genes afetados. *In vitro*, a DOX promoveu alterações na heteroplasmia mitocondrial em favor do tipo mutante, a diminuição na viabilidade celular e alterações morfológicas nas mitocondriais. Esses eventos foram reduzidos pela ação da Alda-1. Diante de todos esses achados, pode-se concluir que, além dos mecanismos de ação já conhecidos, a DOX também atua modulando genes envolvidos no transporte de ácidos graxos e estresse oxidativo mitocondrial, bem como alterando a heteroplasmia do mtDNA. Por outro lado, os resultados confirmaram o efeito protetor da Alda-1 contra os efeitos tóxicos da DOX, mostrando sua ação redutora da hiperlipidemia e expressão gênica.

Palavras-chave: alda-1; alterações mitocondriais; cardioproteção; cardiotoxicidade; doxorubicina; transcriptoma.

ABSTRACT

The cardiotoxicity induced by doxorubicin (DOX), anthracycline isolated from the actinobacteria *Streptomyces peuceetius*, and widely used as an antineoplastic drug, is one of the most important pathophysiological events that limit its clinical application. However, all the mechanisms involved in this toxicity are not fully understood. One hypothesis is that the aldehydes generated by DOX act on mitochondrial membranes, modifying the redox state and forming adducts with proteins. DOX activities on other cellular components, such as ribonucleic acids, are also possible mechanisms of toxicity. Several strategies have been used to reduce the DOX adverse effects. One of them is the identification of compounds that can protect cells against cytotoxicity. Alda-1, which belongs to a group of chaperones and is an agonist of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2), has been tested to reduce the adverse effects of metabolites and radicals generated by DOX. To investigate other possible DOX mechanisms of action, and the cardioprotective activity of Alda-1, this study was designed using two different approaches: *in vivo*, with male Wistar rats submitted to acute and chronic treatments; and, *in vitro*, in mice fibroblasts and cybrids with *ND5* (gene that encodes the mitochondrial Complex I subunit) mitochondrial gene heteroplasmy. The expression profiling of genes related to beta oxidation pathways, *Bax*, *Bcl-2*, *CIQBP*, *ALDH2* and miR-34a microRNA (*ALDH2* expression regulator), and the lipoperoxidation process were investigated in cardiomyocytes of rats treated with DOX, or with DOX plus Alda-1. *In vitro*, the effects of the two compounds on cell viability, mitochondrial structure and cardiolipin molecular species profile, were investigated. In addition, it was assessed whether heteroplasmy levels could interfere on DOX toxic activity. The results confirmed the DOX effect on lipid profile, increasing triglycerides and VLDL concentration. Simultaneous treatment with Alda-1 decreased such effect. Gene expression analyses revealed the overexpression of *Fabp4*, *Slc27a2*, *Bcl-2* and *CIQBP* in cardiomyocytes of rats treated with DOX (acute treatment). Again, the Alda-1 simultaneous administration was able to modulate the changes on gene expressions. *In vitro*, DOX promoted changes in mitochondrial heteroplasmy towards a mutant genotype, decreased cell viability and morphological changes in the mitochondria. These events were reduced by the action of Alda-1. In conclusion, besides the known mechanisms of action, DOX was able to modulate genes involved in the fatty acids transportation and in oxidative stress pathways. Furthermore, DOX promoted changes in mitochondrial heteroplasmy. On the other hand, the results confirmed the protective effect of Alda-1 against the DOX toxic activity through its ability to reduce hyperlipidemia and gene expression.

Keywords: alda-1; mitochondrial alterations; cardioprotection; cardiotoxicity; doxorubicin; transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química da doxorubicina (Adriamycin®; 10-[(3-amino-2,3,6 trideoxya-L-lyxohexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8 (hydroxyacetyl)-1 methoxy-5,12-naphthacenedione). Modificado de (Zagotto et al. 2001)..... 19
- Figura 2:** Estrutura do complexo doxorubicina-DNA. (a) A doxorubicina forma ligação covalente (vermelho) com a guanina em uma das fitas do DNA e pontes de hidrogênio com a guanina na fita oposta; (b) estrutura da intercalação da doxorubicina no DNA. Modificado de Yang et al. (2014). 22
- Figura 3:** Via metabólica ilustrando a redução univalente da doxorubicina para seu radical livre intermediário semiquinona. Na presença de O₂ a doxorubicina pode se auto-oxidar gerando ânions superóxidos, revertendo a estrutura química inicial. Modificado de Wallace et al. (2003) e Carvalho et al. (2014). 23
- Figura 4:** Mecanismo proposto para o efeito cardiotoxíco da doxorubicina (DOX) em longo prazo. Em cinza, efeitos na presença da DOX; em preto, efeitos em longo prazo sem contato com a droga. Modificado de Lebrecht et al. (2003)..... 28
- Figura 5:** Estrutura da ligação da ALDH2 com a Alda-1. (a) Estrutura do tetrâmero da ALDH2 com diferentes cores mostrando as subunidades individuais e as 4 ligações com as moléculas de Alda-1, representandas em cinza. (b) Estrutura da Alda-1 no túnel catalítico da ALDH2. Em destaque estão os aminoácidos críticos para esta interação. Modificado de Perez-Miller et al. (2010) e Chen et al. (2014)..... 35
- Figura 6:** Delineamento experimental do protocolo de tratamento agudo. DOX: doxorubicina; Alda-1: ativador 1 da aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2); Controle negativo: sem nenhum tratamento; Controle: tratado com: SF (soro fisiológico)/dimetilsulfóxido (DMSO); I.P.: injeção intraperitoneal..... 38
- Figura 7:** Delineamento experimental do protocolo de tratamento crônico. DOX: doxorubicina; Alda-1: ativador 1 da aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2); Controle negativo: sem nenhum tratamento; Controle: tratado com: dimetilsulfóxido (DMSO)/SF (soro fisiológico); I.P.: injeção intraperitoneal; M0-M4: momentos das eutanásias; ▼ : número de animais. 39
- Figura 8:** Fotografia de gel de agarose 2% mostrando a integridade das amostras de RNAs extraídas do tecido cardíaco de ratos do estudo agudo (A) e do estudo crônico (B), e aleatoriamente selecionadas. Padrão de bandas associadas às subunidades ribossomais 28S e 18S; *ladder*: marcador de peso molecular. 42

Figura 9: Diagrama ilustrando a geração dos híbridos utilizados no estudo <i>in vitro</i> e seus respectivos percentuais de heteroplasmia para mutação em <i>ND5</i>	47
Figura 10: Protocolo de tratamento de quatro semanas com as drogas doxorubicina (DOX), Alda-1, SS-31 e rapamicina em células da linhagem A9 e híbridos 3A6. M1 e M2: coleta das células, respectivamente, 24h e uma semana após o 1º tratamento; M3, M4 e M5: uma semana após, respectivamente, dois, três e quatro tratamentos com as drogas.	48
Figura 11: Gráficos gerados pela leitura automatizada do teste de exclusão de azul de tripan para tamanho, viabilidade e total de células para o híbrido 3A6.	49
Figura 12: Protocolo de tratamento para avaliação da heteroplasmia mitocondrial por RFLP.	52
Figura 13: Padrão de digestão da <i>Cl</i> I para mutação no gene mitocondrial <i>ND5</i> . A quantificação foi realizada pela análise dos produtos da reação de digestão enzimática após eletroforese em gel de agarose. Mutação homoplásmica: todos os mtDNA das mitocôndrias nas células apresentam a mutação no gene <i>ND5</i>	53
Figura 14: Pesos corpóreo (A), do coração (B), fígado (C) e rins (D) de ratos Wistar após tratamento de 4 semanas com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e a Alda-1 (8 mg/kg/semana). Os resultados são apresentados como média ± SE; M1, M2, M3 e M4 - momentos da amostragem: respectivamente, uma semana após o 1º, 2º, 3º e 4º tratamentos com as drogas. * p<0,05 com relação ao grupo controle.	56
Figura 15: Níveis lipídicos (média ± SE) de ratos Wistar após tratamento crônico com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e Alda-1 (8 mg/kg/semana). M1, M2, M3 e M4, momentos da amostragem: respectivamente, uma semana após o 1º, 2º, 3º e 4º tratamento com as drogas. ; # p<0,05 com relação ao Grupo Controle; * p < 0,05 com relação à DOX. ANOVA de duas vias.	58
Figura 16: Níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) cardíaco após tratamento múltiplo com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e a Alda-1 (8 mg/kg/semana). Os resultados são apresentados como média ± SE; M1, M2, M3 e M4, respectivamente, uma semana após a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª, injeções com as drogas; ANOVA de duas vias: para comparar os grupos.	59
Figura 17: Análise de agrupamento mostrando a relação entre os níveis de expressão gênica nos grupos de ratos tratados com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1 (tratamento agudo).....	61
Figura 18: <i>Volcano plot</i> apresentando a significância estatística <i>versus</i> o <i>fold change</i> , respectivamente nos eixos y e x, da expressão normalizada de cada gene após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1. Genes hiperexpressos em vermelho e hipoexpressos em verde. A linha central indica os genes que não tiveram alterações nos níveis	

de expressão; a linha tracejada representa o limite de *fold change* = 2, limiar considerado para definir os genes diferencialmente expressos; a linha contínua representa o limite de significância estatística ($p=0,05$). Genes *Fabp4* e *Slc27a2* foram os únicos com diferença significativa nos níveis de expressão com *fold change* ≥ 2 62

Figura 19: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos grupos experimentais após tratamento agudo com a doxorrubicina (DOX) e a Alda-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *fold change* ≥ 2 63

Figura 20: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos grupos com múltiplos tratamentos com a doxorrubicina (DOX) e a Alda-1. M1, M2 e M4, respectivamente, uma semana após as 1^a, 2^a e 4^a injeções. * $p < 0,001$ 64

Figura 21: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão do miR34a-5p após tratamento agudo com a doxorrubicina (DOX) e a Alda-1. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$ e *fold change* < 2). 65

Figura 22: Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripano para as linhagens A9 e 3A6. Os dados são apresentados como média \pm SD; * $p < 0,05$ em comparação ao controle; # $p < 0,05$ em comparação a DOX 65

Figura 23: Número de mitocôndrias por célula para as linhagens celulares A9 e 3A6. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão ($n \geq 10$ imagens). 66

Figura 24: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura mitocondrial das células da linhagem A9 24 horas após o tratamento com a DOX e a Alda-1. A: cultura controle; B: células tratadas com a DOX. C: células e mitocôndrias tratadas com DOX + Alda-1. M: mitocôndria; Nuc: núcleo. 67

Figura 25: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura mitocondrial das células da linhagem 3A6 24 horas após o tratamento com a DOX e a Alda-1. A: cultura controle; B: células tratadas com a DOX. C: células e mitocôndrias tratadas com DOX + Alda-1. M: mitocôndria; Nuc: núcleo. 68

Figura 26: Quantificação da heteroplasmia mitocondrial para o gene *ND5* induzida pela doxorrubicina (DOX). A: Gráfico da heteroplasmia de *ND5* obtido com dados do protocolo de 70 dias. B: Eletroforese em gel de agarose mostrando mitocôndrias com DNA selvagem (297 e 168 bp) e mutantes para o *ND5* (465 bp), e os respectivos gráficos com a porcentagem de DNAs mutantes nas linhagens 3A13, 3A6 e 3A20-30. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações e razões indicativas de pureza do RNA extraído do tecido cardíaco dos ratos dos estudos agudo e crônico	43
Tabela 2. Média (\pm SE) dos pesos corpóreo, do coração, rim e fígado de ratos Wistar após tratamento agudo com a doxorubicina e a Alda-1	55
Tabela 3. Perfil lipídico de ratos Wistar tratados com uma única dose de doxorubicina (DOX) e Alda-1	57
Tabela 4. Níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) cardíaco em ratos Wistar após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX - 4 mg/kg) e a Alda-1	59
Tabela 5. Genes relacionados às vias de β -oxidação de ácidos graxos diferencialmente expressos em tecido cardíaco de ratos Wistar após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX)	61
Tabela 6. Espécies moleculares de cardiolipina e suas respectivas concentrações para os diferentes tratamentos com as drogas.	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	Considerações Gerais	17
2.2	Mecanismos de Ação Antineoplásicos da Doxorubicina.....	21
2.2.1	<i>Interação com o DNA nuclear.....</i>	<i>21</i>
2.2.2	<i>Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....</i>	<i>22</i>
2.2.3	<i>Interação com Topoisomerases.....</i>	<i>23</i>
2.3	Efeitos Adversos do Tratamento com Doxorubicina.....	24
2.4	Mecanismos moleculares da cardiotoxicidade da Doxorubicina.....	25
2.5	Lipoperoxidação.....	30
2.6	Aldeído Desidrogenase Mitocondrial – ALDH2.....	32
2.7	Alda-1 [N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida].....	33
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Geral.....	36
3.2	Específicos.....	36
3.2.1	<i>Estudo in vivo - ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com a DOX.....</i>	<i>36</i>
3.2.2	<i>Estudo in vitro - fibroblastos e cíbridos submetidos ao tratamento com a DOX..</i>	<i>36</i>
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Estudo in vivo	37
4.1.1	<i>Animais e compostos químicos.....</i>	<i>37</i>
4.1.2	<i>Delineamento experimental.....</i>	<i>37</i>
4.1.3	<i>Análise de colesterol e frações.....</i>	<i>40</i>
4.1.4	<i>Lipoperoxidação - determinação do 4-hidroxinonenal (4-HNE).....</i>	<i>40</i>
4.1.5	<i>Coleta e armazenamento das amostras para os estudos de expressão gênica.....</i>	<i>41</i>
4.1.6	<i>Extração, quantificação e avaliação da integridade do RNA.....</i>	<i>41</i>
4.1.7	<i>Transcrição reversa - síntese do cDNA</i>	<i>43</i>
4.7.1.1	<i>Ensaio de expressão gênica por PCR – array.....</i>	<i>43</i>
4.7.1.2	<i>Ensaio de expressão dos genes ALDH2, Bax, Bcl-2 e CIQBP.....</i>	<i>43</i>
4.7.1.3	<i>Ensaio de expressão de microRNAs.....</i>	<i>44</i>
4.1.8	Análise de expressão gênica por RT-qPCR	44
4.1.8.1	<i>Expressão gênica por PCR - array.....</i>	<i>44</i>

4.1.8.2	<i>Expressão dos genes ALDH2, Bax, Bcl-2 e C1QBP</i>	45
4.1.8.3	<i>Expressão de microRNAs</i>	45
4.2	Estudo <i>in vitro</i>	46
4.2.1	<i>Linhagens celulares</i>	46
4.2.2	<i>Protocolo de tratamento das drogas</i>	47
4.2.3	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	49
4.2.4	Microscopia eletrônica de transmissão	50
4.2.5	<i>Shotgun lipidômico – determinação das espécies moleculares de cardiolipina</i>	50
4.2.6	<i>Extração de DNA</i>	51
4.2.7	<i>Análise de polimorfismos (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	52
4.3	Análise Estatística	53
5	RESULTADOS	43
5.1	Estudo <i>in vivo</i>	55
5.1.1	<i>Peso corpóreo e de órgãos isolados (coração, rim e fígado)</i>	55
5.1.2	<i>Perfil lipídico</i>	57
5.1.3	<i>Lipoperoxidação - determinação do 4-hidroxinonenal (4-HNE)</i>	58
5.1.4	<i>Expressão gênica</i>	60
5.1.4.1	<i>Genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos</i>	60
5.1.4.2	<i>Expressão dos genes ALDH2, Bax, Bcl-2 e C1QBP</i>	62
5.1.4.3	<i>Expressão do miR-34a-5p</i>	64
5.2	Estudo <i>in vitro</i>	65
5.2.1	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	65
5.2.2	<i>Microscopia eletrônica de transmissão – número de mitocôndrias e análise estrutural</i>	66
5.2.3	<i>Shotgun lipidômico – determinação das espécies moleculares de cardiolipina</i> ..	69
5.2.4	<i>Análise de polimorfismos (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	70
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	85
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX) é uma antraciclina isolada da actinobactéria *Streptomyces peucetius var. caesius*. Atualmente, sua forma sintética é rotineiramente utilizada como agente antineoplásico no tratamento de vários tipos de cânceres, incluindo o de mama, pulmão, tireóide, ovário, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin e neoplasias pediátricas (Ewer & Ewer 2010; Thorn et al. 2011). Apesar da atividade quimioterápica, muitos estudos têm demonstrado o efeito cardiotoxíco dose-dependente e cumulativo da DOX, com amplo espectro de sintomas clínicos, que incluem desde arritmias até insuficiência cardíaca congestiva (ICC), condição, esta, com alta taxa de mortalidade. A incidência de ICC em pacientes sob tratamento com a DOX na dose cumulativa de 300 mg/m² é de aproximadamente 2%, aumentando para 20% em doses cumulativas de 550 mg/m² (Swain et al., 2003; Chatterjee et al., 2010; Rochette et al., 2015; Mitry & Edwards, 2016).

Diferentes mecanismos são apontados como responsáveis pela cardiotoxicidade promovida pela DOX. Entretanto, o mais aceito é aquele por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A estrutura química da DOX é particularmente susceptível à redução reversível para o radical semiquinona altamente reativo, processo, este, que ocorre predominantemente no complexo I mitocondrial, integrante da cadeia transportadora de elétrons e que promove a geração de EROs (Simunek et al. 2009; Ghigo et al. 2016). Associado à evidência da alta afinidade da DOX à cardiolipina (fosfolípido que ocorre quase que exclusivamente na membrana interna mitocondrial), a mitocôndria tem sido identificada como o principal alvo subcelular ao dano induzido pela DOX no coração. A especificidade para o tecido cardíaco talvez seja resultado da alta densidade mitocondrial e contínua atividade metabólica, inerentes à função cardíaca (Octavia et al. 2012; Carvalho et al. 2014). Portanto, não é surpresa que alterações mitocondriais, como a diminuição do potencial de

membrana (Zhang et al. 2016; Pillai et al. 2016); o aumento da indução do poro de transição de permeabilidade (Carvalho et al. 2014); alterações mitocondriais estruturais (Peng et al., 2018); alterações na quantidade de cálcio (Ascensão et al. 2011; Mitry & Edwards 2016); danos no DNA mitocondrial (Ashley & Poulton 2009; Nitiss & Nitiss 2014; Pillai et al. 2016); diminuição das taxas de respiração (Montaigne et al. 2011; Kuznetsov et al. 2011); diminuição da atividade dos complexo da cadeia respiratória e supressão de ATP (Kuznetsov et al. 2011; Zhang et al. 2016) e a consequente falha bioenergética (Gratia et al. 2012; Carvalho et al. 2014) sejam identificados na insuficiência cardíaca induzida pela DOX. No entanto, além dessas alterações foi sugerido que a DOX exerce atividade cardiotóxica por meio da inibição da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, com grande impacto, tendo em vista que estes representam importante substrato para a produção de energia no miocárdio adulto (Hong et al. 2002). Previamente, nosso Grupo de Pesquisa identificou aumento de danos no DNA, de desarranjo miofibrilar e necrose e diminuição da capacidade antioxidante total (TAP) no ventrículo esquerdo de ratos Wistar submetidos ao tratamento com a DOX, eventos que sugerem o envolvimento de diferentes mecanismos na cardiotoxicidade aguda e crônica (Segredo et al. 2014).

Normalmente, um dos principais alvos das EROs é a bicamada lipídica das membranas biológicas, especialmente os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs). A peroxidação dos PUFAs produz um arranjo de produtos primários de oxidação lipídica e eletrófilos, dentre os quais o 4-hidroxinonenal (4-HNE) tem sido um dos mais estudados (Ayala et al. 2014; Zhong & Yin 2015). O 4-HNE é considerado altamente reativo e citotóxico, com potencial para alterar grande variedade de macromoléculas. Foi estimado que 1% a 8% do 4-HNE formado nas células irão modificar proteínas, as quais, cerca de 30%, atuam no nível mitocondrial (Siems & Grune 2003; Zhao et al. 2014). Alguns estudos têm mostrado que o tratamento com a DOX aumenta os níveis do 4-HNE e seus adutos com

proteínas em mitocôndrias de cardiomiócitos, com significativa redução das atividades enzimáticas (Zhao et al. 2014; Hlaváčová et al. 2015). Como consequência, as alterações promovidas pelo 4-HNE modulam grande número de processos e podem potencializar a formação de EROs, alterar vias de sinalização celular, diminuir a função contrátil cardíaca e contribuir para a progressão de várias doenças cardiovasculares, incluindo a insuficiência cardíaca (Carvalho et al. 2014; Mali & Palaniyandi 2014).

A família aldeído desidrogenase NAD(P)⁺-dependente (ALDH) é uma classe de enzimas detoxificadoras que catalisa a remoção de aldeídos do organismo. Dentre estas, a ALDH mitocondrial (ALDH2) foi identificada como enzima fundamental para a proteção do coração contra o estresse oxidativo (Yoval-Sánchez & Rodríguez-Zavala 2012; Chen et al. 2014). Presente em órgãos que demandam alta capacidade mitocondrial para produção de ATP oxidativo, a ALDH2 tem habilidade de metabolizar produtos aldeídos endógenos derivados da peroxidação lipídica, como o 4-HNE (Chen et al. 2010). Diversos estudos em modelos animais mostram que a hiperexpressão da ALDH2 confere múltiplos benefícios ao tecido cardíaco e suas funções, enquanto seu silenciamento aumenta a susceptibilidade para o desenvolvimento de cardiomiopatias, incluindo a insuficiência cardíaca (Gong et al. 2012; Sun et al. 2014). Além disso, estudos epidemiológicos demonstram que indivíduos que carregam uma mutação de ponto no gene *ALDH2* (*ALDH2*2*), fato que resulta em dramática redução na atividade enzimática, são mais susceptíveis a doenças do coração (Chang et al. 2012).

Em condições de cardiotoxicidade promovida pela DOX, a ALDH2 é inibida pela formação de adutos com o 4-HNE, que, além de substrato, é potente inibidor da enzima. A inibição da ALDH2 é reversível em baixas concentrações, mas se torna irreversível quando a concentração de 4-HNE atinge 10 µM (Doorn et al. 2006; Chen et al. 2010). Portanto, a exposição à DOX, o que promove aumento de aldeídos tóxicos, especialmente do 4-HNE,

compromete severamente a função da ALDH2, contribuindo para a disfunção mitocondrial e consequente alterações cardíacas (Carvalho et al. 2014).

Levantamento realizado por Chen et al. em 2008, deu evidência a uma molécula com relevante potencial clínico, a Alda-1, ou ativador da ALDH2. Este agonista, que simultaneamente funciona como uma chaperona, aumenta a eficiência da atividade da ALDH2 tanto *in vitro* como *in vivo*, de duas formas: aumentando a atividade catalítica da ALDH2 por aproximadamente duas vezes (Chen et al. 2008a; Perez-Miller et al. 2010); e protegendo a atividade enzimática contra inativação induzida pelo 4-HNE, o que permite a manutenção da atividade catalítica mesmo na presença de altas concentrações de 4-HNE (Doorn et al. 2006; Chen et al. 2014). De fato, diversos estudos têm evidenciado a atividade cardioprotetora da Alda-1 em diferentes modelos animais em situação de toxicidade cardíaca. Foi observada, por exemplo, a redução de 60% do dano cardíaco após isquemia-reperfusão (Chen et al. 2008b); a supressão de anomalias mecânicas em cardiomiócitos, protegendo contra a disfunção contrátil induzida pelo etanol e estímulo à autofagia (Ge et al. 2011); a diminuição da disfunção do miocárdio induzida pela DOX por meio do 4-HNE (Sun et al. 2014).

Apesar do conhecimento acumulado, o tratamento efetivo para a redução da cardiotoxicidade induzida pela DOX não está ainda disponível. Este problema assume ainda maior relevância quando se considera que o número de pacientes com câncer, que passou por quimioterapia, vem aumentando todos os anos, com estimativas de 19 milhões em 2024, apenas nos Estados Unidos (DeSantis et al. 2014). É neste cenário, portanto, que a identificação de compostos efetivos contra os efeitos adversos da DOX assume grande importância.

7. CONCLUSÕES

A realização do presente estudo permitiu a seguintes conclusões:

- o tratamento crônico (múltiplo) com a DOX promoveu alterações no perfil lipídico, as quais foram revertidas pela Alda-1;
- o tratamento agudo com a DOX aumentou os níveis de expressão dos genes *Fabp4* e *Slc27a2*, que codificam proteínas transportadoras de ácidos graxos;
- a Alda-1 foi capaz de reduzir o aumento da expressão do *Slc27a2* promovido pela DOX;
- o tratamento agudo com a DOX aumentou os níveis de expressão dos genes *Bcl-2* e *CIQBP*, ambos reduzidos após a administração conjunta com a Alda-1;
- os níveis de expressão do gene *ALDH2* e do microRNA miR-34a não foram alterados pela ação da DOX e da Alda-1;
- os níveis de lipoperoxidação em cardiomiócitos não foram alterados pela ação de DOX e Alda-1;
- a DOX foi capaz de alterar a heteroplasmia mitocondrial do gene *ND5* em direção ao genótipo mutante, sendo esta habilidade um potencial fator contribuinte na cardiotoxicidade de início tardio;

- a DOX promoveu alterações na estrutura mitocondrial sendo a Alda-1 capaz de preservá-la;
- a Alda-1 protegeu as células expostas à DOX preservando a viabilidade;
- a DOX não promoveu alterações nas concentrações das espécies moleculares de cardiolipina após 24 horas de exposição;
- A Alda-1 apresentou potencial protetor contra alterações promovidas pela DOX em cardiomiócitos de ratos Wistar, e em fibroblastos e híbridos *in vitro*.

Finalizando, diante de todos esses achados, pode-se concluir que, além dos mecanismos de ação já conhecidos, a DOX também atua modulando genes envolvidos no transporte de ácidos graxos e estresse oxidativo mitocondrial, bem como alterando a heteroplasmia do mtDNA. Por outro lado, os resultados confirmaram o efeito protetor da Alda-1 contra os efeitos tóxicos da DOX, mostrando sua ação redutora da hiperlipidemia e sobre a expressão gênica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ansari A, Rahman MS, Saha SK, Saikot FK, Deep A, Kim K. 2017. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell*. 16:4–16.

Armstrong GT, Plana JC, Zhang N, Srivastava D, Green DM, Ness KK, Daniel Donovan F, Metzger ML, Arevalo A, Durand J-B, et al. 2012. Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 30:2876–2884.

Aryal B, Rao VA. 2016. Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes. *PLoS ONE* [Internet]. [cited 2018 Aug 30]; 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4951097/>

Ascensão A, Lumini-Oliveira J, Machado NG, Ferreira RM, Gonçalves IO, Moreira AC, Marques F, Sardão VA, Oliveira PJ, Magalhães J. 2011. Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 120:37–49.

Ashley N, Poulton J. 2009. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 378:450–455.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014:360438.

Bai Y, Shakeley RM, Attardi G. 2000. Tight control of respiration by NADH dehydrogenase ND5 subunit gene expression in mouse mitochondria. *Mol Cell Biol*. 20:805–815.

Baker JR, Vuppusetty C, Colley T, Papaioannou AI, Fenwick P, Donnelly L, Ito K, Barnes PJ. 2016. Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via PI3K α reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells. *Sci Rep.* 6:35871.

Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. 1980. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta.* 620:281–296.

Bian Y, Chen Y, Xu F, Xue L, Ji W, Zhang Y. 2010. The polymorphism in aldehyde dehydrogenase-2 gene is associated with elevated plasma levels of high-sensitivity C-reactive protein in the early phase of myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med.* 221:107–112.

Bonadonna G, Monfardini S, De Lena M, Fossati-Bellani F, Beretta G. 1970. Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin (NSC 123127). *Cancer Res.* 30:2572–2582.

Bonadonna G, Monfardini S, de Lena M, Fossati-Bellani F. 1969. Clinical Evaluation of Adriamycin, a New Antitumour Antibiotic. *Br Med J.* 3:503–506.

Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Tréguer K, Carmona G, Bonauer A, et al. 2013. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature.* 495:107–110.

Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 2016. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Cell Physiol.* 311:C537–C543.

Burgess DJ, Doles J, Zender L, Xue W, Ma B, McCombie WR, Hannon GJ, Lowe SW, Hemann MT. 2008. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:9053–9058.

Calamaras TD, Lee C, Lan F, Ido Y, Siwik DA, Colucci WS. 2015. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes protein synthesis in cardiac myocytes via activated mTORC1-p70S6K-RPS6 signaling. *Free Radic Biol Med.* 82:137–146.

Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. 2014. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 34:106–135.

Chang Y-C, Chiu Y-F, Lee I-T, Ho L-T, Hung Y-J, Hsiung CA, Quertermous T, Donlon T, Lee W-J, Lee P-C, et al. 2012. Common ALDH2 genetic variants predict development of hypertension in the SAPHIRE prospective cohort: gene-environmental interaction with alcohol consumption. *BMC Cardiovasc Disord.* 12:58.

Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. 2010a. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology.* 115:155–162.

Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. 2010b. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology.* 115:155–162.

Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. 2008a. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 321:1493–1495.

Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. 2008b. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 321:1493–1495.

Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER, Mochly-Rosen D. 2014. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev.* 94:1–34.

- Chen C-H, Sun L, Mochly-Rosen D. 2010. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc Res.* 88:51–57.
- Chowdhury AR, Ghosh I, Datta K. 2008. Excessive reactive oxygen species induces apoptosis in fibroblasts: role of mitochondrially accumulated hyaluronic acid binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR). *Exp Cell Res.* 314:651–667.
- Coldwell KE, Cutts SM, Ognibene TJ, Henderson PT, Phillips DR. 2008. Detection of Adriamycin–DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. *Nucleic Acids Res.* 36:e100.
- Deepa PR, Varalakshmi P. 2006. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac and renal toxicity. *Toxicology.* 217:176–183.
- DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. 2014. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 64:252–271.
- Doorn JA, Hurley TD, Petersen DR. 2006. Inhibition of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by 4-hydroxynon-2-enal and 4-oxonon-2-enal. *Chem Res Toxicol.* 19:102–110.
- Ewer MS, Ewer SM. 2010. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat Rev Cardiol.* 7:564–575.
- Falcon A, Doege H, Fluit A, Tsang B, Watson N, Kay MA, Stahl A. 2010. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299:E384-393.

Fan F, Sun A, Zhao H, Liu X, Zhang W, Jin X, Wang C, Ma X, Shen C, Zou Y, et al. 2013. MicroRNA-34a promotes cardiomyocyte apoptosis post myocardial infarction through down-regulating aldehyde dehydrogenase 2. *Curr Pharm Des.* 19:4865–4873.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18:499–502.

Ganz PA, Hussey MA, Moinpour CM, Unger JM, Hutchins LF, Dakhil SR, Giguere JK, Goodwin JW, Martino S, Albain KS. 2008. Late cardiac effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer survivors treated on Southwest Oncology Group protocol s8897. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 26:1223–1230.

Gao Y, Xu Y, Hua S, Zhou S, Wang K. 2015. ALDH2 attenuates Dox-induced cardiotoxicity by inhibiting cardiac apoptosis and oxidative stress. *Int J Clin Exp Med.* 8:6794–6803.

Ge W, Guo R, Ren J. 2011. AMP-dependent kinase and autophagic flux are involved in aldehyde dehydrogenase-2-induced protection against cardiac toxicity of ethanol. *Free Radic Biol Med.* 51:1736–1748.

Ghigo A, Li M, Hirsch E. 2016. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1863:1916–1925.

Gong D, Zhang Y, Zhang H, Gu H, Jiang Q, Hu S. 2012. Aldehyde dehydrogenase-2 activation during cardioplegic arrest enhances the cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Toxicol.* 12:350–358.

Gratia S, Kay L, Potenza L, Seffouh A, Novel-Chaté V, Schnebelen C, Sestili P, Schlattner U, Tokarska-Schlattner M. 2012. Inhibition of AMPK signalling by doxorubicin: at the

crossroads of the cardiac responses to energetic, oxidative, and genotoxic stress. *Cardiovasc Res.* 95:290–299.

Hlaváčová M, Gumulec J, Stračina T, Fojtů M, Raudenská M, Masařík M, Nováková M, Paulová H. 2015. Different doxorubicin formulations affect plasma 4-hydroxy-2-nonenal and gene expression of aldehyde dehydrogenase 3A1 and thioredoxin reductase 2 in rat. *Physiol Res.* 64 Suppl 5:S653-660.

Holmgren G, Synnergren J, Andersson CX, Lindahl A, Sartipy P. 2016. MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* 34:26–34.

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 331:717–719.

Hong YM, Kim HS, Yoon H-R. 2002. Serum lipid and fatty acid profiles in adriamycin-treated rats after administration of L-carnitine. *Pediatr Res.* 51:249–255.

Hrelia S, Fiorentini D, Maraldi T, Angeloni C, Bordoni A, Biagi PL, Hakim G. 2002. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1567:150–156.

Hu M, Crawford SA, Henstridge DC, Ng IHW, Boey EJH, Xu Y, Febbraio MA, Jans DA, Bogoyevitch MA. 2013. p32 protein levels are integral to mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology, cell metabolism and survival. *Biochem J.* 453:381–391.

Kaiserová H, Simunek T, Sterba M, den Hartog GJM, Schröterová L, Popelová O, Gersl V, Kvasnicková E, Bast A. 2007. New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 7:145–150.

- Kumar S, Marfatia R, Tannenbaum S, Yang C, Avelar E. 2012. Doxorubicin-induced cardiomyopathy 17 years after chemotherapy. *Tex Heart Inst J.* 39:424–427.
- Kuznetsov AV, Margreiter R, Amberger A, Saks V, Grimm M. 2011. Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1813:1144–1152.
- Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. 2010. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res.* 106:1681–1691.
- Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, Christ T, Ravens U, Schunck W-H, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Morano I. 2009. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res.* 105:326–334.
- Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen U-P, Setzer B, Walker UA. 2005. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol.* 207:436–444.
- Lebrecht D, Setzer B, Ketelsen U-P, Haberstroh J, Walker UA. 2003. Time-dependent and tissue-specific accumulation of mtDNA and respiratory chain defects in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Circulation.* 108:2423–2429.
- Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. 2008. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart Br Card Soc.* 94:525–533.

- Liu X-L, Pan Q, Zhang R-N, Shen F, Yan S-Y, Sun C, Xu Z-J, Chen Y-W, Fan J-G. 2016. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J Gastroenterol.* 22:9844–9852.
- LoPachin RM, Gavin T. 2014. Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. *Chem Res Toxicol.* 27:1081–1091.
- Lv X, Yu X, Wang Yiyang, Wang F, Li H, Wang Yanping, Lu D, Qi R, Wang H. 2012. Berberine inhibits doxorubicin-triggered cardiomyocyte apoptosis via attenuating mitochondrial dysfunction and increasing Bcl-2 expression. *PloS One.* 7:e47351.
- Mali VR, Palaniyandi SS. 2014. Regulation and therapeutic strategies of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in heart disease. *Free Radic Res.* 48:251–263.
- McGee AM, Baines CP. 2011. Complement 1q-binding protein inhibits the mitochondrial permeability transition pore and protects against oxidative stress-induced death. *Biochem J.* 433:119–125.
- Mitry MA, Edwards JG. 2016. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart Vasc.* 10:17–24.
- Montaigne D, Marechal X, Preau S, Baccouch R, Modine T, Fayad G, Lancel S, Neviere R. 2011. Doxorubicin induces mitochondrial permeability transition and contractile dysfunction in the human myocardium. *Mitochondrion.* 11:22–26.
- Nelyudova A, Aksenov ND, Pospelov V, Pospelova T. 2007. By Blocking Apoptosis, Bcl-2 in p38-Dependent Manner Promotes Cell Cycle Arrest and Accelerated Senescence After DNA Damage and Serum Withdrawal. *Cell Cycle.* 6:2171–2177.

Nickerson JG, Alkhateeb H, Benton CR, Lally J, Nickerson J, Han X-X, Wilson MH, Jain SS, Snook LA, Glatz JFC, et al. 2009. Greater Transport Efficiencies of the Membrane Fatty Acid Transporters FAT/CD36 and FATP4 Compared with FABPpm and FATP1 and Differential Effects on Fatty Acid Esterification and Oxidation in Rat Skeletal Muscle. *J Biol Chem.* 284:16522–16530.

Nitiss KC, Nitiss JL. 2014. Twisting and ironing: doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 20:4737–4739.

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. 2012. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 52:1213–1225.

Pang J, Wang J, Zhang Y, Xu F, Chen Y. 2017. Targeting acetaldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in heart failure-Recent insights and perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 1863:1933–1941.

Pedrycz A, Kramkowska A. 2016. Adriamycin - efficacy and possible adverse effects. *Curr Probl Psychiatry.* 17:38–46.

Perez-Miller S, Younus H, Vanam R, Chen C-H, 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.* 17:159–164.

Pillai VB, Bindu S, Sharp W, Fang YH, Kim G, Gupta M, Samant S, Gupta MP. 2016. Sirt3 protects mitochondrial DNA damage and blocks the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 310:H962-972.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 17:421–433.

Renu K, V.g. A, P.b. TP, Arunachalam S. 2018. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *Eur J Pharmacol.* 818:241–253.

Roca-Alonso L, Castellano L, Mills A, Dabrowska AF, Sikkel MB, Pellegrino L, Jacob J, Frampton AE, Krell J, Coombes RC, et al. 2015. Myocardial MiR-30 downregulation triggered by doxorubicin drives alterations in β -adrenergic signaling and enhances apoptosis. *Cell Death Dis.* 6:e1754.

Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, Hachet O, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. 2015. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 36:326–348.

Schauenstein E. 1967. Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products. *J Lipid Res.* 8:417–428.

Schlame M, Ren M. 2009. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1788:2080–2083.

Schlame M, Rua D, Greenberg ML. 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res.* 39:257–288.

Segredo MP de F, Salvadori DMF, Rocha NS, Moretto FCF, Correa CR, Camargo EA, de Almeida DC, Reis RAS, Freire CMM, Braz MG, et al. 2014. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Hum Exp Toxicol.* 33:748–760.

- Seo BB, Marella M, Yagi T, Matsuno-Yagi A. 2006. The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. *FEBS Lett.* 580:6105–6108.
- Siems W, Grune T. 2003. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 24:167–175.
- Simůnek T, Stérba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gersl V. 2009. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep PR.* 61:154–171.
- Steinberg SJ, Wang SJ, McGuinness MC, Watkins PA. 1999. Human liver-specific very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase: cDNA cloning and characterization of a second enzymatically active protein. *Mol Genet Metab.* 68:32–42.
- Stewart JB, Chinnery PF. 2015. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet.* 16:530–542.
- Sun A, Cheng Y, Zhang Y, Zhang Q, Wang S, Tian S, Zou Y, Hu K, Ren J, Ge J. 2014. Aldehyde dehydrogenase 2 ameliorates doxorubicin-induced myocardial dysfunction through detoxification of 4-HNE and suppression of autophagy. *J Mol Cell Cardiol.* 71:92–104.
- Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. 2003. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer.* 97:2869–2879.
- Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM. 2006. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res.* 66:4863–4871.

- Syamsunarno MRAA, Iso T, Hanaoka H, Yamaguchi A, Obokata M, Koitabashi N, Goto K, Hishiki T, Nagahata Y, Matsui H, et al. 2013. A Critical Role of Fatty Acid Binding Protein 4 and 5 (FABP4/5) in the Systemic Response to Fasting. *PLoS ONE*. 8:e79386.
- Szeto HH. 2014. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol*. 171:2029–2050.
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 65:157–170.
- Takemura G, Fujiwara H. 2007. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*. 49:330–352.
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 21:440–446.
- Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. 2006. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol*. 41:389–405.
- Tong Z, Jiang B, Wu Y, Liu Y, Li Y, Gao M, Jiang Y, Lv Q, Xiao X. 2015. MiR-21 Protected Cardiomyocytes against Doxorubicin-Induced Apoptosis by Targeting BTG2. *Int J Mol Sci*. 16:14511–14525.
- Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 149:1536–1548.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 242:1427–1430.

Wallace KB. 2003. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol*. 93:105–115.

Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. 2014. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biol*. 2:619–631.

Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. 2014. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 1845:84–89.

Yin H, Xu L, Porter NA. 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*. 111:5944–5972.

Yin J, Guo J, Zhang Q, Cui L, Zhang L, Zhang T, Zhao J, Li J, Middleton A, Carmichael PL, Peng S. 2018. Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 51:1–10.

Yoval-Sánchez B, Rodríguez-Zavala JS. 2012. Differences in susceptibility to inactivation of human aldehyde dehydrogenases by lipid peroxidation byproducts. *Chem Res Toxicol*. 25:722–729.

Yu H-S, Oyama T, Isse T, Kitakawa K, Ogawa M, Pham T-T-P, Kawamoto T. 2009. Characteristics of aldehyde dehydrogenase 2 (Aldh2) knockout mice. *Toxicol Mech Methods*. 19:535–540.

Zagotto G, Gatto B, Moro S, Sissi C, Palumbo M. 2001. Anthracyclines: recent developments in their separation and quantitation. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 764:161–171.

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu L-S, Lyu YL, Liu LF, Yeh ETH. 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 18:1639–1642.

Zhang Y, Chen L, Li F, Wang H, Yao Y, Shu J, Ying M-Z. 2016. Cryptotanshinone protects against adriamycin-induced mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes. *Pharm Biol.* 54:237–242.

Zhao Y, Miriyala S, Miao L, Mitov M, Schnell D, Dhar SK, Cai J, Klein JB, Sultana R, Butterfield DA, 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 Radic Biol Med.* 72:55–65.

Zhong H, Lu J, Xia L, Zhu M, Yin H. 2014. Formation of electrophilic oxidation products from mitochondrial cardiolipin in vitro and in vivo in the context of apoptosis and atherosclerosis. *Redox Biol.* 2:878–883.

Zhong H, Yin H. 2015. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol.* 4:193–199.