

Manuella Pacifico de Freitas Segredo

PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CARDIOTOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de doutor

Orientadora: Profa. Adjunta *Ana Lúcia dos Anjos Ferreira*

Botucatu – SP
2017

Manuella Pacifico de Freitas Segredo

PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CARDIOTOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de doutor

Orientadora: Profa. Adjunta *Ana Lúcia dos Anjos Ferreira*

Auxílio Pesquisa FAPESP: 2007/07455-2

Botucatu – SP
2017

Manuella Pacifico de Freitas Segredo

Papel do estresse oxidativo na cardiotoxicidade aguda e crônica induzida por doxorubicina

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu, SP, Brasil

Orientadora: Professora Adjunta Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Comissão examinadora:

Profa Adjunta Ana Lúcia dos Anjos Ferreira
Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina, Botucatu, SP, Brasil

Prof. Dr. José Roberto Fioretto
Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina, Botucatu, SP, Brasil

Prof. Dr Carlos Fernando Roncci
Faculdade de Educação Física –
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

Prof. Dr. Andre Ferreira do Nascimento
Universidade Federal de Mato Grosso,
Campus de Sinop

Profa Dra Joelma Gonçalves Martins
Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Medicina, Botucatu, SP, Brasil

Botucatu, 23 de janeiro de 2017.

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

Segredo, Manuella.

Papel do estresse oxidativo na cardiotoxicidade aguda e crônica induzida por doxorrubicina / Manuella Segredo. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Lúcia dos Anjos Ferreira
Capes: 40101002

1. Coração - Doenças. 2. Stress oxidativo. 3. Dano ao DNA. 4. Antioxidantes. 5. Cardiotoxicidade. 6. Rato como animal de laboratório. 7. Doxorrubicina.

Palavras-chave: Capacidade antioxidante total; Coração; Dano no DNA; Doxorrubicina; Rato.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Nesta vida, não podemos fazer grandes coisas. Podemos apenas fazer coisas pequenas com um grande amor.”

Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, MANUEL e CAROLINA, responsáveis pela minha vida, a quem devo meu caráter e disciplina e que fizeram o possível para que eu chegasse até aqui.

Dedico ao ALUÍSIO, meu marido. Obrigada pela sua força, por sua dedicação como pai, por toda a sua capacidade de compreensão, encorajamento e por sua confiança em mim, enfim, pela sua presença em minha vida.

A minha filha, MARIA CAROLINA, que me ensina a ser mãe e é responsável pelos momentos de alegria e descontração.

Esta vitória é nossa!

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a DEUS, pelo dom da vida e, por dar-me forças nos momentos de fraqueza, guiando-me por esta longa caminhada.

A querida orientadora professora ANA LÚCIA DOS ANJOS, por sua amizade, competência teórica e seus ricos ensinamentos durante todos esses anos.

Ao MÁRIO AUGUSTO DALLAQUA, por sua ajuda na elaboração e formatação desta tese.

A TODAS AS PESSOAS que me ajudaram, direta ou indiretamente a realizar este trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	4
Introdução	6
Hipótese	12
Objetivos	14
Materiais e métodos	16
Resultados	23
Discussão	38
Conclusão	46
Financiamento.....	48
Referências	50
Anexos	61
Anexo A.....	62
Anexo B.....	63

RESUMO

Segredo, MPF. PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA CARDIOTOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA INDUZIDA POR DOXORRUBICINA. 67 fls. Tese (doutorado) Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu, SP, Brasil 2017.

Introdução: É desconhecido o papel do estresse oxidativo durante a evolução da cardiotoxicidade crônica induzida por múltiplas doses de doxorubicina (DOX).

Objetivo: Avaliar a evolução da cardiotoxicidade induzida por doxorubicina por meio da avaliação clínica, necropsia; análise morfológica, capacidade antioxidante total e lesão do DNA miocárdica. Primeiramente, foi estudado o efeito agudo de uma única dose de DOX e, posteriormente, avaliamos o efeito evolutivo de múltiplas doses.

Materiais e métodos: Utilizamos ratos Wistar machos (n=66) que foram randomizados em 2 protocolos experimentais: 1) ratos foram sacrificados antes (-24h, n=8) e após (+24h, n=8) dose única de DOX (4mg/kg) a fim de determinar o efeito agudo da DOX; 2) ratos (n=58) receberam 4 injeções semanais de DOX (4mg/kg/semana) e foram sacrificados antes da primeira injeção (M0) e 1 semana depois de cada administração (M1, M2, M3, M4) para determinar o efeito evolutivo de cada uma das quatro doses da DOX. As avaliações realizadas foram: clínica, necropsia, estudo miocárdico morfológico (microscopia óptica), capacidade antioxidante total (TAP, capacidade antioxidante) e lesão oxidativa do DNA (ensaio cometa).

Resultados: No modelo agudo, não houve alteração no peso e nem nas características clínicas ou de necropsia. Contudo, foi verificado aumento da necrose, desarranjo miofibrilar, diminuição da TAP e aumento da lesão oxidativa do DNA após 24h da dose única de DOX ($p < 0,05$). O estudo evolutivo mostrou prejuízo progressivo nos sinais clínicos, no peso corpóreo ($R = -0,99$; $P = 0,011$) e nas alterações morfológicas miocárdicas (necrose: ($R = 1,00$; $P = 0,004$) de acordo com as doses de DOX. Contudo, foi observada melhora miocárdica progressiva tanto da TAP ($R = 0,95$; $P = 0,049$) como da lesão de DNA (SBs: $R = -0,95$; $P = 0,049$). Além disso, a piora progressiva da necrose foi associada com a melhora progressiva tanto da lesão do DNA (SBs) ($R = -0,97$; $P = 0,027$) como com a TAP ($R = 0,96$; $P = 0,039$). A

melhora progressiva da lesão do DNA (SBs) e da TAP também foram associadas ($R=-0,98$; $P=0,018$). A progressão da necrose foi associada à perda de peso corpóreo ($R=-0,98$; $P=0,024$). A necropsia mostrou alterações (amolecimento cardíaco, ascite, derrame pleural, aderência entre órgãos e hidronefrose) a partir de M3.

Conclusão: Dose única de DOX levou à desorganização, necrose, lesão no DNA e diminuição da TAP miocárdicos. O estudo evolutivo de múltiplas doses de DOX mostrou deterioração progressiva dos sinais clínicos, peso corpóreo e necrose de acordo com o aumento do número de doses de DOX. Contudo tal deterioração foi associada com a melhora da TAP e lesão oxidativa do DNA miocárdica. Nossos resultados sugerem que o dano oxidativo está associado apenas com a cardiotoxicidade induzida por uma única dose de DOX. É plausível que multiplas doses de DOX estejam associadas a aumento progressivo da resistência ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: doxorubicina, coração, estresse oxidativo, dano de DNA, morfologia

ABSTRACT

Segredo MPF. ROLE OF OXIDATIVE STRESS ON ACUTE AND CHRONIC CARDIOTOXICITY AFTER TREATMENT WITH DOXORUBICIN. 67 pages. São Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu, SP, Brazil 2017

The mechanism of doxorubicin-induced cardiotoxicity remains controversial. Wistar rats (n=66) received doxorubicin (DOX) injections intraperitoneally and were randomly assigned to two experimental protocols: 1) rats (n=16) were killed before and 24 h after a single dose of DOX (4 mg/Kg-body-wt) to determine the DOX acute effect; 2) rats (n=60) received 4 injections of DOX (4 mg/Kg-body-wt/week) and were killed before the first injection (M0) and 1 week after each injection (M1, M2, M3, M4) to determine the chronological effect. Cardiac total antioxidant performance (TAP), DNA damage and morphology analyses were done at each time point. Body weight, clinical signs and necropsia changes were also registered. DOX single dose was associated with increased cardiac disarrangement, necrosis and DNA damage [strand breaks (SBs) and oxidized pyrimidines], and decreased TAP. Single dose of DOX was not associated with changes in body weight, clinical signs and necropsy. The chronological study showed an effect of a cumulative dose on body weight ($R = 0.99$, $P 0.011$), necrosis ($R 1.00$, $P 0.004$), TAP ($R 0.95$, $P 0.049$), and DNA SBs ($R = 0.95$, $P 0.049$). DNA SBs damage was negatively associated with TAP ($R = 0.98$, $P 0.018$) and necrosis ($R = 0.97$, $P 0.027$). The necropsy showed abnormalities (heart softening, ascites, pleural effusion, adhesion between organs and hydronephrosis) from M3. Our results suggest that oxidative damage is associated with acute cardiotoxicity induced by a single DOX only. Increased resistance to the oxidative stress is plausible for the multiple dose of DOX

Keywords: doxorubicin, heart, estresse oxidativo, DNA damage, morphology.

INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX), também conhecida como adriamicina, é um quimioterápico do grupo dos antibióticos antracíclicos descoberto nos anos 50, e derivado do pigmento vermelho produzido pela bactéria *Streptomyces peucetius* (Tan C *et al*, 1967). É uma excelente droga utilizada em diversos protocolos para o tratamento dos mais variados tipos de tumores (leucemias, linfomas, sarcomas e câncer de mama) (Minotti *et al*, 2004).

A estrutura da doxorubicina consiste em anel tetracíclico com dois grupamentos adjacentes, o grupo quinona/hidroquinona e o grupo aminoaçúcar denominado daunosamina. Além da doxorubicina, outras drogas dessa classe são amplamente utilizadas na prática clínica como a daunorrubicina, a epirubicina e a idarrubicina (Menna P *et al*, 2007), sendo as duas últimas derivadas da doxorubicina e da daunorrubicina, respectivamente (Minotti *et al*, 2004).

A atividade antineoplásica da doxorubicina deve-se principalmente à sua ação junto ao DNA. Embora os mecanismos exatos de ação não estejam completamente elucidados, sabe-se que essa droga inibe a DNA topoisomerase II (diminuindo o reparo); bloqueia a DNA polimerase, insere-se entre os pares de base do DNA, impede a síntese de macromoléculas, induz apoptose e gera radicais livres durante sua metabolização (Ferreira *et al*, 2008).

A cardiotoxicidade é o efeito colateral mais grave desse potente agente anti-neoplásico (Chatterjee *et al*, 2010; Mettler *et al*, 1977). É descrita como dose dependente, ocorrendo quando os valores de DOX superam 550 mg/m² em adultos e 300 mg/m² em crianças (Choi *et al*, 2010; Lipshultz *et al*, 2005). Cerca de 7% dos pacientes que recebem doses acima de 550 mg/m² desenvolvem miocardiopatia dilatada (Pontes *et al*, 2010; Singal & Iliskovic N, 1997; Von Hoff *et al*, 1979). Recente revisão sistemática mostrou que o uso de antraciclina aumentou em 5 vezes o risco de morte cardíaca comparado com outros quimioterápicos diferentes das mesmas (Smith *et al*, 2010).

A toxicidade cardíaca tem sido observada desde minutos até anos após o uso da droga (Ferreira *et al*, 2008; Singal & Iliskovic N 1998; Piegari *et al* 2008). São descritos quatro tipos de cardiotoxicidade. A aguda ocorre durante ou imediatamente após a administração da DOX e envolve vasodilatação, hipotensão e

alterações no ritmo, como taquicardia sinusal, taqui-supraventricular paroxíscica não sustentada, alterações não específicas ST-T, desvio do eixo para a esquerda e diminuição da amplitude do complexo QRS (Chartterjee *et al*, 2010; Ferreira *et al*^a, 2007; Hazari *et al*, 2009; Ferrans *et al*, 1997). A subcrônica é incomum e é caracterizada por síndrome pericardite - miocardite que ocorre entre 1 a 3 dias após o tratamento (Bristow *et al*, 1978; Hale & Lewis IJ, 1994). A crônica precoce desenvolve-se durante o tratamento ou semanas a meses após o mesmo e é caracterizada por miocardiopatia dilatada, disfunção contrátil do ventrículo esquerdo e insuficiência cardíaca congestiva (ICC). As alterações histopatológicas consistem em distensão do retículo sarcoplasmático dos miócitos, vacuolização citoplasmática, edema mitocondrial e desarranjo e perda miofibrilar (Ferrans *et al*, 1997). Por último, a cardiopatia crônica tardia, que foi descrita no começo dos anos 90 em sobreviventes de câncer na infância (Lipshultz *et al*, 1991; Goorin *et al*, 1990), pode se desenvolver 6 a 10 anos após a última dose de DOX (Chartteejee *et al*, 2010).

A toxicidade crônica é clinicamente significativa uma vez que afeta substancialmente a morbimortalidade global e por essa razão requer uma terapia em longo prazo para atenuar a toxicidade. A incidência da cardiotoxicidade crônica e variados graus de ICC variam entre 1 a 16% (Simunek *et al*, 2009). Tal toxicidade pode desenvolver cardiopatia irreversível a qual afeta 26% dos pacientes que receberam a dose de 550 mg/m² (Swain *et al*, 2003).

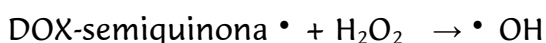
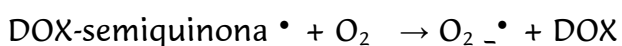
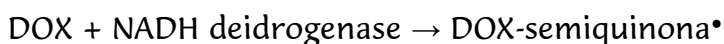
Diversas estratégias são usadas para prevenir ou atenuar a cardiotoxicidade induzida pela DOX como diminuição da velocidade de infusão, utilização de análogos da DOX com agentes protetores e também uso de antioxidantes (Van Vleet *et al*, 1980, Breed *et al*, 1980; Simunek *et al*, 2009).

Várias hipóteses têm sido postuladas para explicar o mecanismo da cardiotoxicidade induzida pela DOX. O estresse oxidativo, lesão de DNA, alteração metabolismo do cálcio e redução na produção de energia são fatores apontados como eventos cardiomiocíticos associados ao uso da DOX (Singal *et al*, 1997; Singal *et al*, 1995). Estudos mostram que o mecanismo toxicidade da DOX é multifatorial, mas se destaca o estresse oxidativo como um denominador comum de todos os

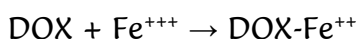
mecanismos (Ferreira *et al*^a, 2007; Ozdogan *et al*, 2010). A gênese da cardiopatia crônica também está relacionada a alterações na homeostase do cálcio celular e mitocondrial (Solem *et al*, 1994) e/ou metabolismo de ácido graxo no miocárdio (Takahashi *et al*, 1998, Feng *et al*, 1999, Kim SY *et al*, 2006, Ondrias *et al*, 1990). Outros mecanismos de lesão incluem acúmulo de DOX no tecido cardíaco (Simunek *et al*, 2009), comprometimento na expressão de proteínas cardíacas (Boucek *et al*, 1999), lesão DNA mitocondrial (Lebrecht *et al*, 2005), e degradação de miofilamentos e proteínas estruturais (Lim *et al*, 2004).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante o metabolismo da droga ocorre por meio de mecanismo enzimático e não enzimático, apresentados nas reações 1 e 2, respectivamente. O enzimático implica na redução de 1 elétron da molécula de DOX por meio de enzimas redutase-p450 dependentes de NADPH (NADH desidrogenase), o que leva a geração de um radical DOX-semiquinona. Este último radical tanto pode reduzir uma molécula de O₂, produzindo radical superóxido (O₂^{•-}) e regenerando nova molécula de DOX como também pode reduzir H₂O₂ e levar a geração de radical hidroxil (•OH). No mecanismo não enzimático, as ROS são originadas de reações intermediadas por íons de ferro. Assim, o íon férrico (Fe⁺⁺⁺) reage com a molécula de DOX por meio de redução de 1 elétron e dá origem ao complexo DOX-Fe⁺⁺. Este último sob condições aeróbicas pode reagir rapidamente com O₂ e originar H₂O₂. Desta forma, qualquer uma das ERO geradas por ambos os mecanismos reagem com ácidos graxos polinsaturados (como a cardiolipina) levando a lipoperoxidação e posterior morte miocítica (Singal *et al*, 1987; Kim C *et al*, 2005).

Reação 1 – Mecanismo Enzimático



Reação 2 – Mecanismo Não Enzimático



O coração é um órgão alvo da toxicidade da DOX pelos seguintes motivos: alta afinidade da DOX pela cardiolipina mitocondrial (fosfolípide vulnerável à lipoperoxidação), ser um órgão com alto metabolismo, gerando mais EROs e ser um órgão com a defesa antioxidante diminuída (Singal *et al.*, 1998; Singal *et al.*, 2000).

É classicamente aceito que o estresse oxidativo desempenha um papel no mecanismo de lesão da toxicidade secundária a DOX. Porém há controvérsias se o estresse oxidativo é um fator mais ou menos importante no mecanismo de cardiotoxicidade. E essas controvérsias provavelmente estão relacionadas ao protocolo experimental utilizado. O protocolo é denominado agudo quando é realizada uma avaliação precoce após única dose de DOX. O protocolo crônico consiste em múltiplas administrações de DOX com avaliações tardias. Avaliando modelo agudo (dose única DOX 15 mg/mg), previo estudo mostrou que o uso de quelante de metal melhorou a glutathione (antioxidante endógeno) e diminuiu o malonaldeído (produto da lipoperoxidação) do coração de ratos (Al-Majed *et al.*, 2002). A exemplo desse estudo, outros autores têm demonstrado resultados semelhantes. A suplementação da enzima Q-10 em ratos após única dose de DOX, levou a uma melhora da apoptose, desorganização e fibrose do cardiomiócito (Chen *et al.*, 2016). Semelhantemente, a suplementação de glutamina em modelo agudo, mostrou aumento da catalase e glutathione cardíacas e diminuição da lipoperoxidação (Todorova *et al.*, 2010). Tomando como base esses estudos, sugere-se que a cardiotoxicidade no modelo agudo pode ser decorrente do estresse oxidativo.

Estudos que adotaram o modelo crônico, com uma única avaliação após o tratamento com DOX, não mostraram efeito de antioxidantes nas lesões histológicas (Van Vleet *et al.*, 1980; Breed *et al.*, 1980; Bruynzeel *et al.*, 2007) e na lipoperoxidação cardíaca (Ghibu *et al.*, 2012) de animais que receberam múltiplas doses de DOX. Usando um protocolo de estudo crônico onde realizamos as análises 1 semana após a última dose de DOX (dose cumulativa de 16 mg/kg), nosso grupo mostrou que a suplementação com licopeno não melhorou a disfunção ventricular esquerda induzida pela DOX (Ferreira *et al.*^a, 2007).

É bem estabelecido que a cardiotoxicidade induzida pela DOX é dose dependente e que a cardiotoxicidade crônica pode levar à insuficiência cardíaca irreversível. Dessa forma, seria de grande importância monitorar marcadores de lesão cardíaca ao longo do tratamento. Os resultados de tal monitoramento poderiam estabelecer estratégias terapêuticas para prevenir ou minimizar a cardiotoxicidade crônica. Poucos estudos monitorizaram a lesão cardíaca (morfologia e ecocardiograma) ao longo do tratamento com DOX (Popelova *et al*, 2009; Teraoka *et al*, 2000, Jackson *et al*, 1984) e para o nosso conhecimento, nenhum deles utilizou marcadores cardíacos de estresse oxidativo. Nosso grupo previamente identificou, *in vitro*, que o nível da capacidade antioxidante total da doxorubicina aumenta progressivamente de acordo com o aumento da concentração da droga (Ferreira *et al*^b, 2007). Tal resultado sugere um efeito antioxidante cumulativo e progressivo da DOX.

Frente ao exposto, o presente estudo investigou o papel do estresse oxidativo na cardiotoxicidade aguda e crônica induzida por DOX. Além disso, o comportamento da lesão histológica e da lesão oxidativa cardíaca ao longo do tratamento com múltiplas doses de DOX também foi monitorado.

HIPÓTESES

1. A cardiotoxicidade aguda está associada ao estresse oxidativo cardíaco;
2. A cardiotoxicidade induzida por múltiplas doses de doxorubicina está associada à progressiva redução do estresse oxidativo cardíaco;
3. A cardiotoxicidade induzida por múltiplas doses de doxorubicina está associada à progressiva piora das lesões histológicas cardíacas.

OBJETIVO

Avaliamos a evolução da cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina por meio da avaliação clínica, necropsia; análise morfológica, capacidade antioxidante total e lesão do DNA, todos miocárdicos. Primeiramente, avaliamos o efeito agudo de uma única dose de DOX. Após, estudamos o efeito evolutivo de múltiplas doses.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Experimentação do Departamento de Clínica Médica - FMB - UNESP - Botucatu com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (Ofício # 951/2012). Ratos Wistar, machos (n= 66, 12 semanas, pesando entre 350 e 400g) provenientes do CEMIB (Unicamp, Campinas, SP) foram submetidos a dois protocolos experimentais (Figura 1). Para determinar o efeito agudo da DOX, animais foram eutanasiados 24h antes (-24h, n=8) e 24h após (+24h, n=8) a dose única, intraperitoneal (IP) 4 mg/kg PC. Nenhuma morte ocorreu durante esse estudo. A duração do estudo foi de 48h.

Para determinar o efeito cronológico de múltiplas doses de DOX, ratos (n=58) receberam injeções IP de doxorrubicina (4mg/kg PC), uma vez por semana por 4 semanas (dose cumulativa de 16 mg/kg). A dose cumulativa foi selecionada segundo protocolos prévios (Siveski-Iliskovic *et al*, 1995; Danelisen I *et al*, 2002). Ocorreram 18 óbitos não programados no decorrer do estudo, sendo estes ratos excluídos. Os animais foram randomizados e eutanasiados antes da primeira dose (M0) e 1 semana após cada dose. Os momentos foram designados M0, M1, M2, M3 e M4. A duração total do tratamento foi de 4 semanas.

Durante o estudo, os animais foram semanalmente pesados e avaliados clinicamente (brilho e espessura dos pelos; atividade física; agressividade) e receberam dieta comercial e água *ad libitum*.

Os animais foram mantidos em jejum durante uma noite, e na manhã do dia seguinte, foram eutanasiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg) IP e necropsiados imediatamente. Amostras do ventrículo esquerdo foram coletadas e armazenadas adequadamente para as seguintes análises: capacidade antioxidante total (TAP), dano oxidativo do DNA (ensaio cometa) e morfologia ótica simples.

Efeito Agudo da DOX:

☆_↑_☆
(-24h) (+24h)

Efeito cronológico de múltiplas doses da DOX:

☆_↑_☆ ☆_↑_☆ ☆_↑_☆ ☆_↑_☆ ☆
M0 M1 M2 M3 M4

☆, sacrifício de animais; ↑, injeção de DOX (4 mg/Kg PC/semana); Estudo agudo: -24h, 24h antes da injeção de DOX; +24h, 24h após injeção de DOX; Estudo Cronológico de múltiplas doses: M0, 24h antes (-24h) do tratamento com DOX; M1, M2, M3, M4, 1 semana após 1^a, 2^a, 3^a e 4^a injeção de DOX, respectivamente.

Figura 1. Protocolo Experimental

Produtos químicos

Os produtos químicos que foram utilizados estão citados abaixo com suas respectivas fontes entre colchetes. Doxorubicina, K₂H₂PO₄, KOH, ácido tiobarbitúrico, Butylated Hydroxytoluene (BHT), 1,1,3,3-tetraethoxypropane, ácido tricloracético [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO]; água (obtida através de purificador de H₂O MiliQue). Glutaraldeído e n-hexano [Merck]. O análogo do ácido graxo 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanoico ácido (BODIPY 581/591) [Molecular Probes, Eugene, OR]. MeO-AMVN; 2,2' azobis (2-amidinopropano) dihidroclorido [Wako Chemicals (Richmond, VA, USA)]. Fluoresceína-diacetato (FDA); Brometo de Etidium (EtBr); NaCl, EDTA, Tris, Sarcosine N-Lauril de sódio, Triton X-100, Sulfoxido dimetil e agarose (low-melting-point) [Sigma Chemical Co., St. Louis, MO]; Agarose normal, proteinase K, colagenase tipe I, tampão fosfato salina Dulbecco (DPBS), e solução balanceada de Hanks (HBSS) [Invitrogen, Grand Island, NY, USA]; endonuclease III (endo III) e formanodipirimidina-DNA glicosilase (FPG) [Trevigen, Gaithersburg, MD, USA].

Estudo Morfológico (Microscopia óptica comum – MO)

Um corte coronal de 3mm foi realizado em cada ventrículo esquerdo e fixado em formalina tamponada a 10% por 48 h e firmada em parafina. Cortes de 5 µm foram feitos no bloco e corados com hematoxilina-eosina (HE). A gravidade das alterações morfológicas foi classificada cegamente por dois patologistas na escala de 1 a 3 (conforme Tabela 1), usando análise semiquantitativa (Ferreira *et al*^a, 2007; Nascimento *et al*, 2011). As seguintes características foram consideradas na análise: desarranjo e necrose miofibrilar, estrutura do miocárdio e alterações infiltrativas. Discordâncias entre os patologistas foram resolvidas caso a caso até chegarem a um consenso. As análises foram realizadas no Carl Zeiss, Alemanha que consistia em um microscópio óptico (Axio Imager A1; aumento X400) ligado a uma câmera digital (Zeiss Vision) e conectado ao computador equipado com software analizador de imagens (Axio Vision Rel version 4.3, Carl Zeiss).

Tabela 1. Graduação do nível de gravidade histológica cardíaca avaliada por microscopia óptica

Grau	Características morfológicas (HE)
0	Morfologia normal
1	Poucas células afetadas com alterações precoces miofibrilares (perda) e vacuolização citoplasmática
2	Grupos de células afetados com perda de elementos contráteis (perda miofibrilar marcante) vacuolização
3	Tecido difusamente afetado por alterações mais graves incluindo morte celular

Capacidade Antioxidante Total

Preparação dos reagentes. A fosfatidilcolina, PC (L-alfa-fosfatidilcolina, Tipo XVI-E, approx. 99%), foi preparada como se segue. A PC (25mg) foi dissolvida em clorofórmio (10 mL) e evaporada muito lentamente sob baixo fluxo de nitrogênio, associado ao rolamento do frasco objetivando conseguir um filme (fino depósito) de PC. Este filme foi re-hidratado com tampão salina (PBS 50 mM, pH 7,4)

a uma concentração de 2,5 mg de PC/mL e posteriormente congelado e derretido por cinco vezes com a ajuda de um vortex (30 segundos) e de um sonicador (1 minuto) (Branson Sonifer 450, Danbrerry, CT, USA) sob gelo por 30 segundos por 3 vezes. O volume resultante foi distribuído em pequenas alíquotas e estocado a -70 °C para posterior uso. PC foi usado como curva padrão. As curvas foram obtidas por meio da oxidação de uma solução controle na presença de PC.

A TAP miocárdica (ventrículo esquerdo) foi quantificada comparando a área sob a curva (area under the curve AUC) relativa à cinética de oxidação do BODIPY [ácido 4,4-difluoro-5-(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno-3-undecanóico] em relação à suspensão do lisossoma PC usado como uma referência de matriz biológica (Ferreira *et al*^b, 2007; Beretta *et al*, 2006). O método TAP foi aplicado para aferição do estado antioxidante (do compartimento lipofílico e hidrofílico) do miocárdio dos animais.

Preparo da amostra. O miocárdio (ventrículo esquerdo) estocado a -80°C, foi pesado (~ 0,1g), fatiado e homogeneizado por 20 segundos no gelo com 2 mL de tampão fosfato (100 mM) usando um homogeneizador Wilmington (North Carolina, USA). Alíquotas de sobrenadante foram coletadas após centrifugação [800 g for 15 min em centrífuga refrigerada (Sorvall RT 6000 Du Pont Co., Newtown, CT)]. O sobrenadante (100 µL) foi usado como amostra para as medidas de TAP.

A concentração de proteína na amostra foi determinada de acordo como kit de ácido bicinchoninic seguindo o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). Após adicionar 300µL de PBS à amostra (100µL), o BODIPY 581/591 (100µL) foi incorporado no compartimento lipídico (concentração final de 2 µmol/L) vortexando gentilmente por 10 segundos a uma baixa velocidade seguido por incubação em banho-maria a 37°C. Após incubação, PBS gelado (485 µL) foi adicionado e a solução foi vortexada gentilmente por 10 segundos à baixa temperatura. O iniciador de radical, MeO-AMVN [2,2'azobis(4-metoxi-2,4-dimetilvalero-nitrilo); (15 µL, concentração final de 2 mM)], foi adicionado na mistura e vortexado gentilmente usando pequena esfera magnética. Curvas de padrão externo foram obtidas por meio da oxidação cinética de soluções controles na

presença de PC (100 μ L) e DHS (100 μ L). A oxidação da amostra do tecido foi monitorada por meio de produto de oxidação de fluorescência verde do BODIPY 581/591 (concentração final λ_{ex} = 500, λ_{em} = 520 nm, fenda 10 nm) usando um contador (Wallac Victor 2X, Perkin-Elmer, Boston, MA, USA). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados expressam os valores do TAP, representando a porcentagem de inibição da oxidação do BODIPY no ventrículo esquerdo em comparação com o que ocorre com amostras de controle (Beretta G *et al*, 2006; Aldini G *et al*, 2001).

Lesão Oxidativa de DNA (Ensaio Cometa)

O ensaio cometa avaliou a frequência de lesões oxidativas no DNA de células cardíacas de ratos tratados com doxorrubicina. As células cardíacas foram isoladas conforme descrito anteriormente por Ferreira *et al* 2007^c. Cada amostra do músculo cardíaco foi fragmentada em uma solução contendo 5,5 mg de proteinase K, 3 mg de colagenase tipo I (Invitrogen) diluídas em 3 ml HBSS (Invitrogen), e incubada, por 45 min, a 37°C para liberar as células, que foram então, ressuspendidas em 10 ml de HBSS. A suspensão resultante foi centrifugada a 800 rpm por 15 min e o sobrenadante descartado. Para detecção de lesões oxidativas específicas no DNA (como danos simples ou duplo SBs, sítios lábeis e purinas e pirimidinas oxidadas) foi utilizada a versão alcalina-padrão do Ensaio Cometa conforme descrita por Singh *et al*, 1988 modificada por Collins *et al*, 1998. Todos os procedimentos foram realizados no escuro para minimizar fontes de danos no DNA. Resumidamente, 15 μ L da suspensão de células cardíacas foram embebidos em agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (LMPA - Sigma) e difundidos sobre uma lâmina de microscópio recoberta com agarose normal (Invitrogen). Seis lâminas foram preparadas para cada amostra. As lâminas foram imersas em solução de lise fresca (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% sal de sódio, N-Lauril sarcosinato, pH 10, com 1% de Triton X-100 e 10% de DMSO, adicionados por último), a 4°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas três vezes em intervalos de 15 minutos, com tampão de reação para as enzimas formandipirimidina-DNA

glicosilase (FPG) (1/1000) e timina glicol-DNA glicosilase (Endo III) (Trevigen). Endo III reconhece pirimidinas oxidadas enquanto FPG identifica as purinas oxidadas, especificamente 8-oxo-guanina. O tampão de enzima foi usado para identificar SBs. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese e expostas a tampão alcalino (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH (13,4), a 4°C, por 40 minutos. Na mesma solução, a eletroforese foi conduzida a 4°C, por 30 min, a 25 V e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas (0,4 M Tris, pH 7,5) a intervalos de 5 minutos por 3 vezes, fixadas em etanol absoluto por 5 minutos e armazenadas. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 50 μ L de EtBr (20 μ g/mL) e serão analisadas em microscópio de fluorescência acoplado a um sistema de análise de imagem (Comet Assay II - image system (Perceptive Instruments, Haverhill, Suffolk, UK)). Foram analisadas 100 células cardíacas (50 células por lâmina) de cada animal sob aumento de 40x. O seguinte parâmetro foi considerado: porcentagem de DNA na cauda (*tail moment*). Linfócitos humanos tratados com H₂O₂ (100 μ M) foram usados na eletroforese como controle positivo.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos em média e erro-padrão (EP) e mediana (percentis 25% -75%) para dados com distribuição normal e não normal, respectivamente. No estudo agudo, a comparação entre grupos foi avaliada por ANOVA complementada com teste *t* de *Student* ou com *Mann-Whitney rank sum*. No estudo cronológico, foi utilizada ANOVA por uma via complementada com procedimentos de análise de comparação múltipla pareada. Para necrose e desorganização miofibrilar, foi utilizado *Kruskal-Wallis one Way ANOVA on ranks* complementada pela análise pareada multivariada (procedimentos de análise de comparação múltipla pareada). Regressão linear foi utilizada para o estudo de associação entre variáveis no estudo cronológico. Todos os cálculos foram realizados no programa SigmaStat, versão 3.5 (Systat Software, Point Richmond, CA, USA). As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$.

RESULTADOS

Efeito agudo de única dose de DOX nas manifestações clínicas, morfologia, no dano DNA e TAP cardíacas

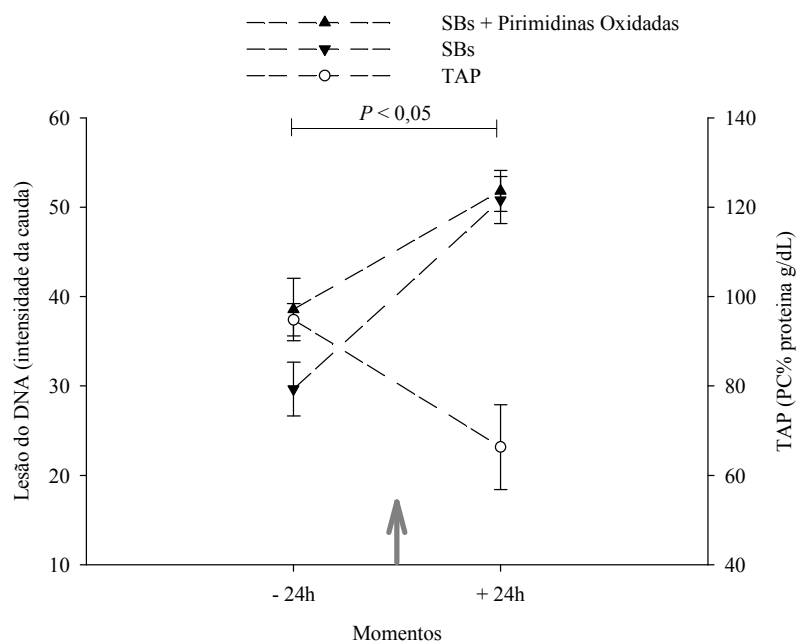
A administração de uma única dose de DOX apresentou alteração em algumas variáveis no momento + 24h, quando comparado com o momento - 24h: aumento na necrose ($p < 0,001$) e na desorganização miofibrilar ($p < 0,002$) (Tabela 2). Aumento no dano DNA (DNA SBs, $p < 0,001$ e pirimidina oxidada, $p = 0,002$), e queda do TAP ($p < 0,010$) foram identificados (Figura 2).

Não foram verificadas alterações significantes no peso (g) [mediana (percentis 25%-75%)] [412,00 (378,00-436,50) vs. 401,50 (342,50-428,50), $p > 0,05$] assim como nas alterações clínicas (atividade, estado geral, eriçamento e brilho dos pelos) e necropsia. Não houve mortes durante este protocolo experimental.

Tabela 2. Efeito da única dose de doxorrubicina (4mg/Kg peso) na morfologia miocárdica de rato

Momentos	Necrose	Desorganização
- 24h	1,00 (1,00-1,00) ⁽⁸⁾	1,00 (1,00-1,00) ⁽⁸⁾
+ 24h	2,50 (2,00-3,00) ^{(8)*}	2,50 (2,00-3,00) ^{(8)**}

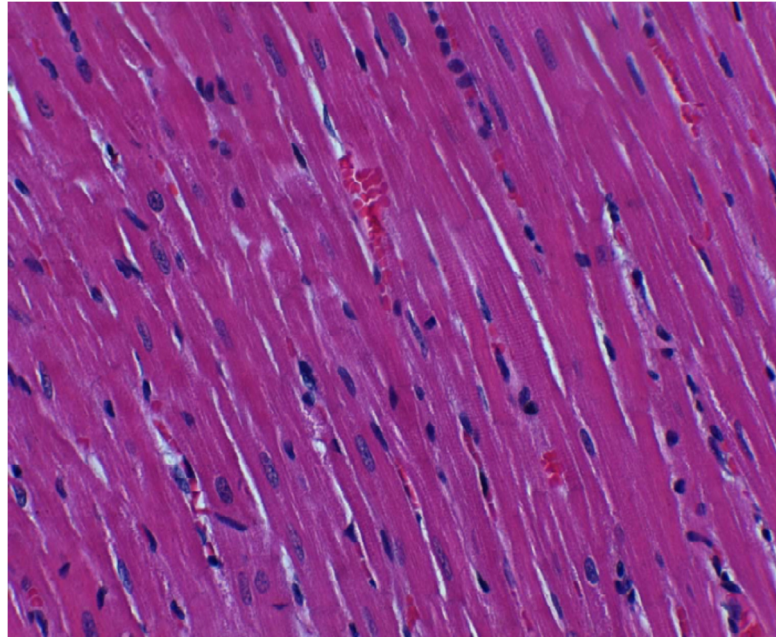
Valores correspondem a medianas (25%-75% percentils); ⁽ⁿ⁾, amostra; Momentos: -24h (antes) e +24h (após) injeções de doxorrubicina; *Mann-Whitney rank sum test* foi usado para comparações entre momentos *, $P < 0,001$, **, $P = 0,002$ (diferente de -24h).



Dados apresentados em média (\pm EP); \uparrow administração IP de DOX; Momentos: -24h (antes) e + 24h (após) administração; Dados obtidos nos momentos -24h(n=8) e +24h (n=8). SBs, quebra de bases de DNA; TAP, capacidade antioxidante total (PC, fosfatidilcolina foi usada como padrão). Mann-Whitney rank sum test (para dano DNA) e teste *t* de Student (para TAP) foram usados para comparar os momentos, * $p < 0,05$, diferença entre os momentos

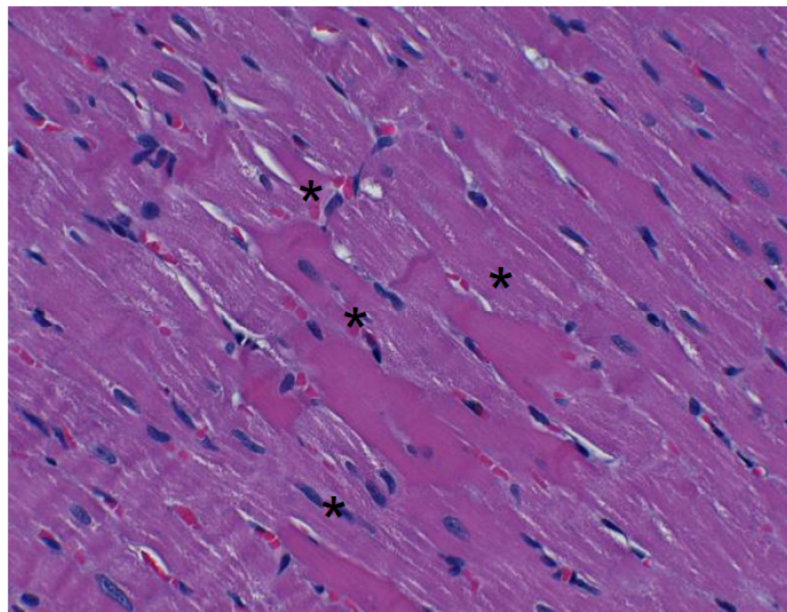
Figura 2. Efeito da única dose de doxorrubicina (4mg/kg) na lesão oxidativa do miocárdio.

Em detalhe, a análise morfológica por microscopia ótica comum mostrou ausência de alterações [(organização miofibrilar, estriação miofibrilar preservada, presença de núcleo de formato fusiforme e tonalidade normal (lilás)] no momento - 24h (Figura 3). Por outro lado, fibras de aspecto hialino (cor avermelhada) sugerindo degeneração (*), núcleos com aspecto normal e ausência de infiltrado inflamatório foram identificados no momento +24h (Figura 4).



Morfologia cardiomiocítica sem alterações [(organização miofibrilar, estriação miofibrilar preservada, presença de núcleo de formato fusiforme e tonalidade normal (lilás))]

Figura 3. Análise morfológica por microscopia óptica no momento -24h.



Fibras de aspecto hialino (cor avermelhada) sugerindo degeneração (*), núcleos com aspecto normal.

Figura 4. Análise morfológica por microscopia óptica no momento +24h.

Efeito evolutivo de múltiplas doses de DOX nas características gerais

Alterações de sinais clínicos (atividade física, estado geral, agressividade, eriçamento, e brilho dos pelos) foram progressivamente associadas ao acúmulo de dose de DOX (figura 5). A maioria dos animais (>86%) exibiu as alterações a partir de M3. O peso dos animais (média \pm EP amostra, g) diminuiu significativamente (teste de Tukey, $p < 0.05$) no decorrer do tempo [M4 (300,91 \pm 11,08^s) < M0 (409,88 \pm 16,42^s), M1 (395,38 \pm 20,44^s), M2 (377,13 \pm 18,09^s); M3 (337,88 \pm 18,88^s) < M0, M1]. Regressão linear mostrou que o peso foi inversamente proporcional ao tempo (acúmulo de doses de DOX) (Figura 6A) ($R = -0,99$, $P = 0,011$).

Na necropsia todos os animais apresentavam evidente e progressivo amolecimento cardíaco, aderência pericárdio/miocárdio e derrames pericárdico, pleural e ascite no momento M2 (1 semana após a segunda dose de DOX). Além do tecido renal pálido bilateralmente, verificou-se aderência nos lobos hepáticos e entre os órgãos peritoneais (estômago e baço) no momento M4.

A mortalidade de 31% ($n = 18/58$) observada no protocolo cronológico é consistente com outros estudos (Abdel-aleem *et al.* 1997; Matsui, M *et al.* 1999; Danelisen, I *et al.* 2002; Segredo, M *et al.* 2013) e ocorreram a partir de M1 [entre M1 e M2 ($n=6$); entre M2 e M3 ($n=5$) e entre M3 e M4 ($n=7$)].

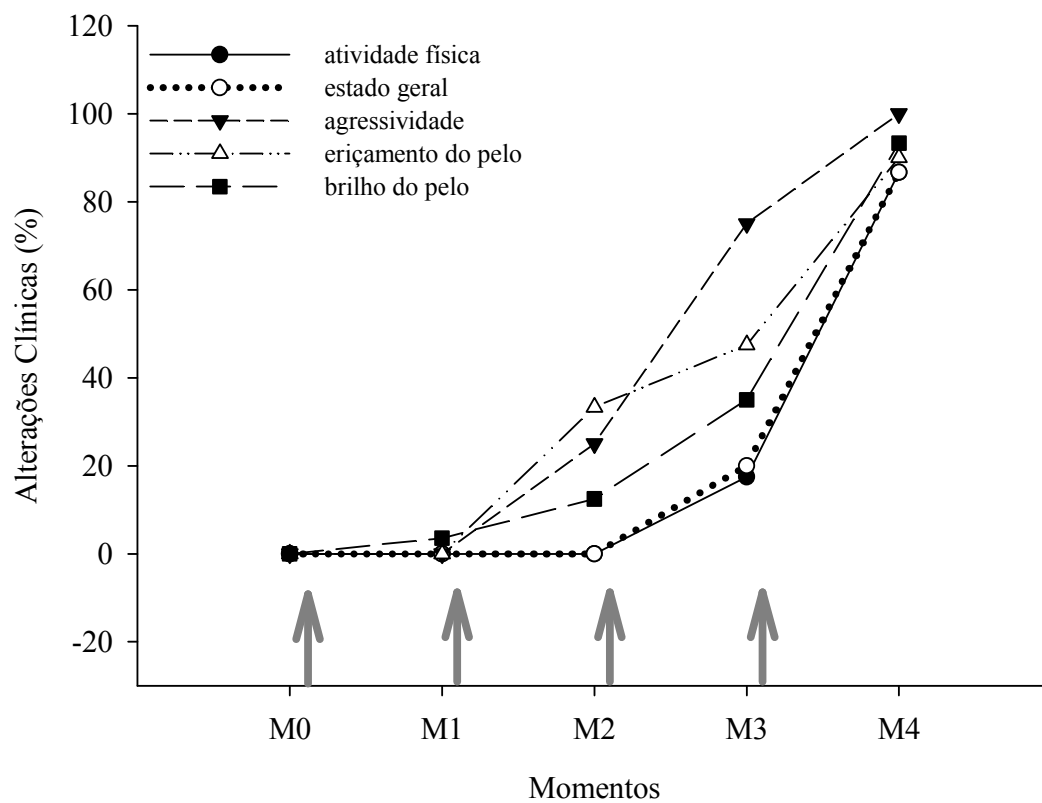
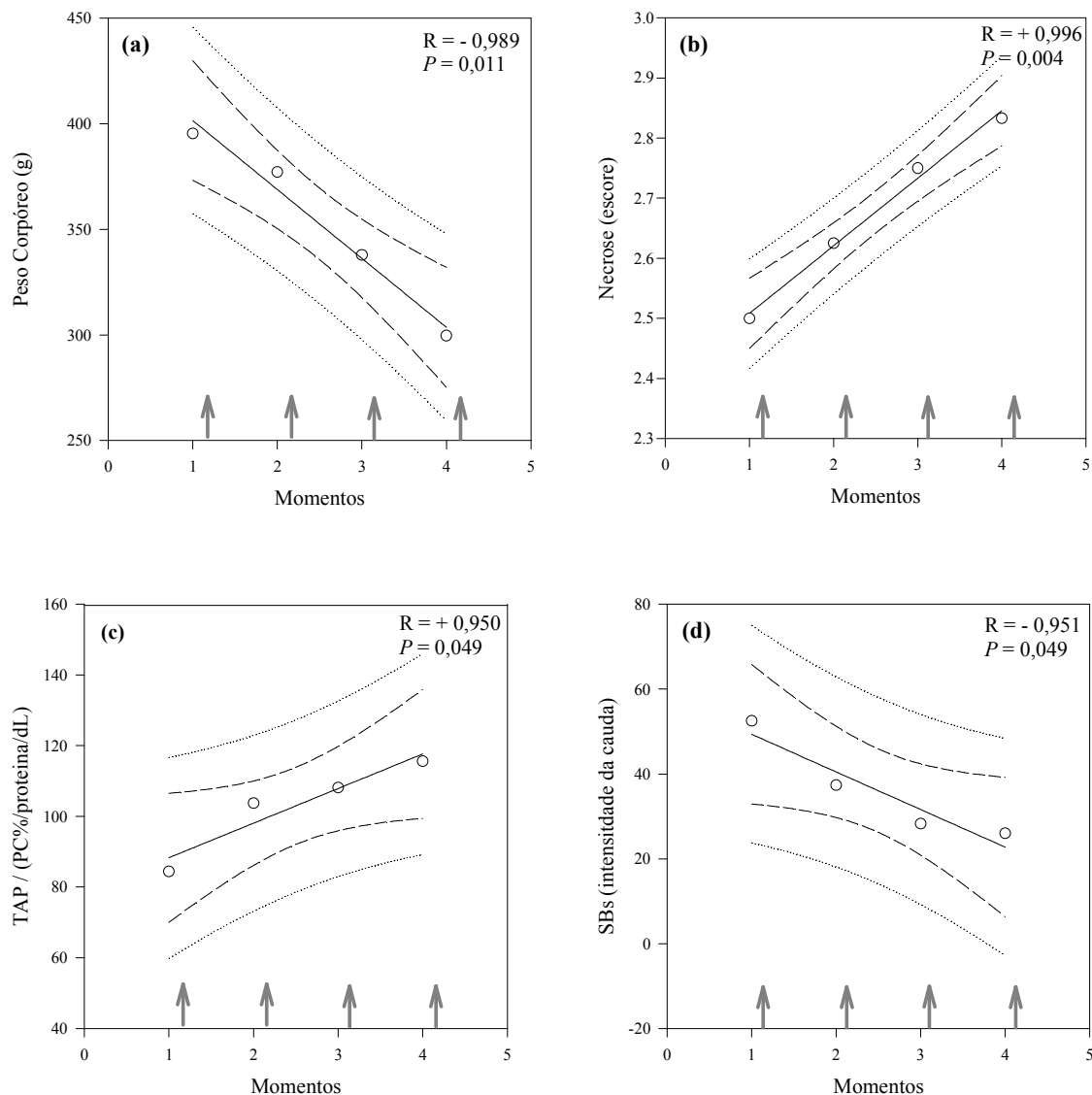


Figura 5. Efeito evolutivo de múltiplas doses de doxorubicina nas características gerais



Dados apresentados em media. Momentos: M1, 1 semana após a 1ª administração; M2, 1 semana após a 2ª dose; M3, 1 semana após a 3ª dose; M4, 1 semana após a 4ª dose. TAP, capacidade antioxidante total; SBs, quebra de bases de DNA. Regressão linear foi usada na associação entre as variáveis [peso (A), necrose miofibrilar (B), TAP (C) e dano DNA SBs (D)] e os momentos dos animais tratados.

Figura 6. Associação entre as variáveis e os momentos após tratamento com múltiplas doses de doxorrubicina

Em detalhe, as alterações detectadas na necropsia estão apresentadas na Tabela 3. Observou-se que as alterações se iniciaram a partir do momento M3. A magnitude de alterações foi registrada por meio de escores (0 a 4+), sendo que 0 correspondeu à ausência de alteração e 4+ correspondeu à alteração máxima.

Tabela 3. Efeito do acúmulo de doses de doxorubicina nas alterações verificadas na necropsia

Alterações	M0	M1	M2	M3	M4
Derrame peritoneal, plural, pericárdico	0	0	0	+2	+3
amolecimento cardíaco	0	0	0	+2	+3
palidez renal	0	0	0	+2	+3
Aderência					
coração/pericardio	0	0	0	+2	+4
lobos hepáticos	0	0	0	0	+3
fígado/estômago/baço	0	0	0	0	+3

Dados representam ausência (0) ou graus de alterações (+1 to +4) evidenciadas à necropsia. Momentos: M0, antes da 1ª injeção (n = 8); M1, 1 semana após 1ª injeção (n = 8); M2, 1 semana após 2ª injeção (n = 8); M3, 1 semana após 3ª injeção (n = 8); M4, 1 semana após 4ª injeção (n = 8)

Efeito evolutivo de múltiplas doses de DOX na morfologia cardíaca

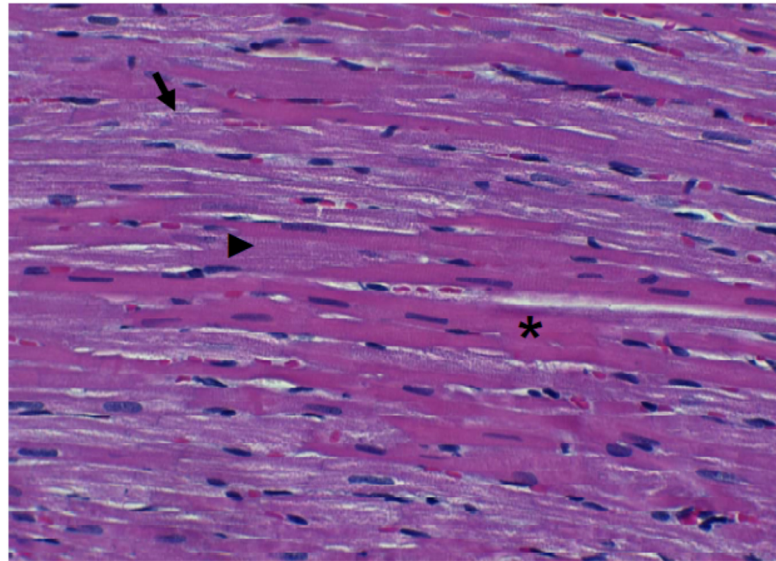
O tratamento com DOX foi associado a uma lesão histológica progressiva no cardiomiócito (Tabela 4). As lesões foram multifocais e foram caracterizadas por miofibrilas com progressiva hialinização, desorganização, fragmentação, rarefação, alterações morfologia (aumento do volume com posterior diminuição, retração e ausência do núcleo) e alteração na coloração do núcleo (hipercromático a pálido). Além disso, foram indentificados núcleos miofibrilares pareados em M3 e M4, sugerindo atrofia. Não foi identificado infiltrado inflamatório relevante no miocárdio.

Tabela 4. Efeito de múltiplas doses de DOX (4mg/Kg peso/semana) na morfologia do miocárdio do rato

Momentos	Necrose	Desorganização
M0	1,00 (1,00-1,00) ⁽⁸⁾	1,00 (1,00-1,00) ⁽⁸⁾
M1	2,50 (2,00-3,00) ^{(8)*}	2,50 (2,00-3,00) ^{(8)*}
M2	3,00 (2,00-3,00) ^{(8)*}	2,50 (2,00-3,00) ^{(8)*}
M3	3,00 (2,50-3,00) ^{(8)*}	2,00 (2,00-3,00) ^{(8)*}
M4	3,00 (3,00-3,00) ^{(6)*}	2,00 (2,00-3,00) ^{(6)*}

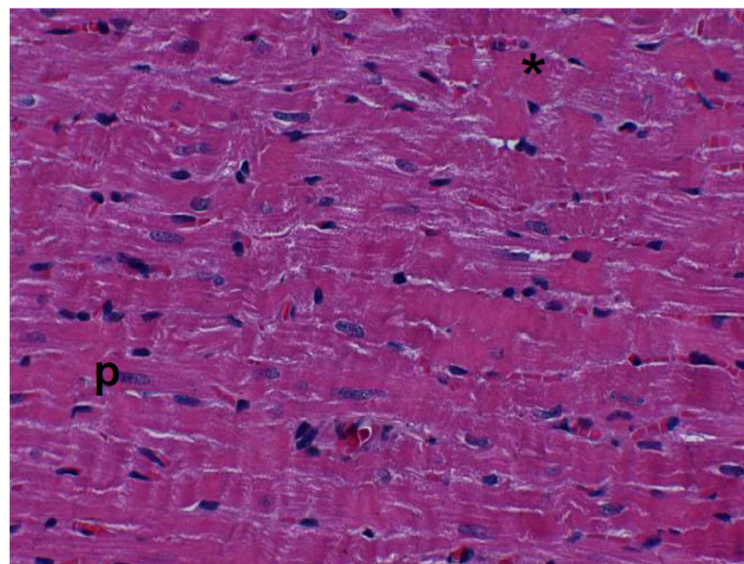
Valores em medianas (percentil 25%-75%); ⁽ⁿ⁾ amostra; Momento M0, antes da 1ª injeção; M1, 1 semana após a 1ª administração; M2, 1 semana após a 2ª dose; M3, 1 semana após a 3ª dose; M4, 1 semana após a 4ª dose; one way ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis análise univariada on ranks) complementada com método de Dunn's foi usada para comparações entre os momentos; * p<0,001 (comparado ao M0).

As legendas das figuras (Figuras 13 a 16) ilustram as alterações identificadas em cada momento (M1, M2, M3 e M4).



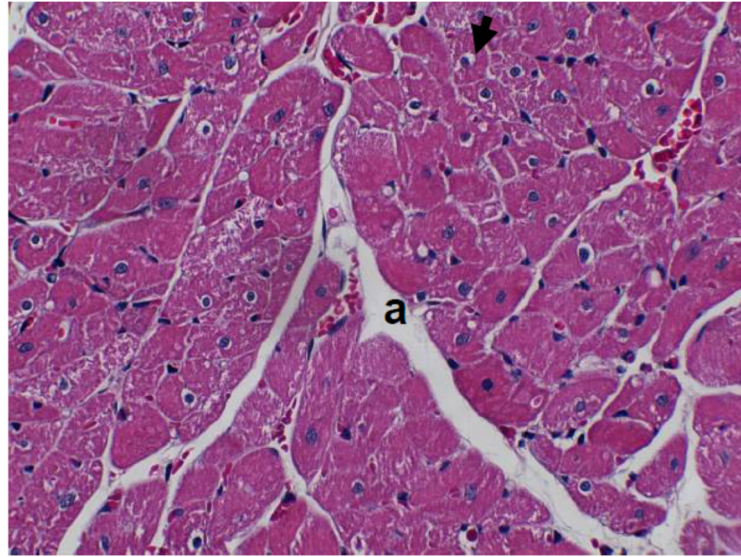
Miofibrilas de aspecto hialino (*) (cor avermelhada) com aumento de volume (▶) e degeneração hidrópica (seta). Núcleos com volume aumentado, porém com manutenção da vitalidade (sem necrose)

Figura 7. Análise morfológica por microscopia óptica no momento M1



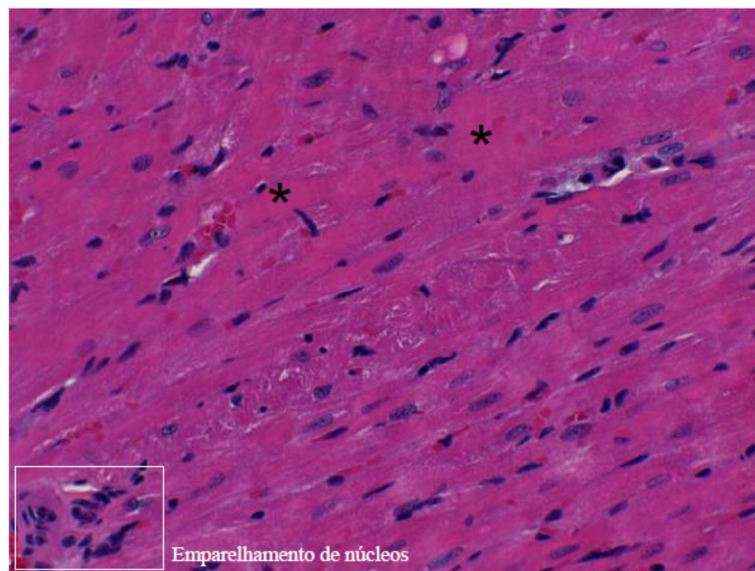
Miofibrilas com evidente desarranjo, acentuado grau de hialinização (*), perda da estriação (fragmentação) e rarefação focal, indicando um grau mais avançado da lesão do que o observado na Figura 8. Ausência de núcleo (necrose miofibrilar) ou presença de núcleo com volume reduzido e palidez (p), indicando morte celular

Figura 8. Análise morfológica por microscopia óptica no momento M2



Lesões mais graves do que no momento anterior, com rarefação miofibrilar difusa, evidente retração nuclear (seta, halo claro ao redor do núcleo), características que sugerem degeneração; extensas áreas de miofibrilas anucleadas. Ainda foram verificadas miofibrilas atroficas (espaço vazio (a) entre miofibrilas, desorganizadas e fragmentadas. Núcleos de tamanho variável (mas em geral estão aumentados) e pareados, sugerindo atrofia miofibrilar

Figura 9. Análise morfológica por microscopia óptica no momento M3

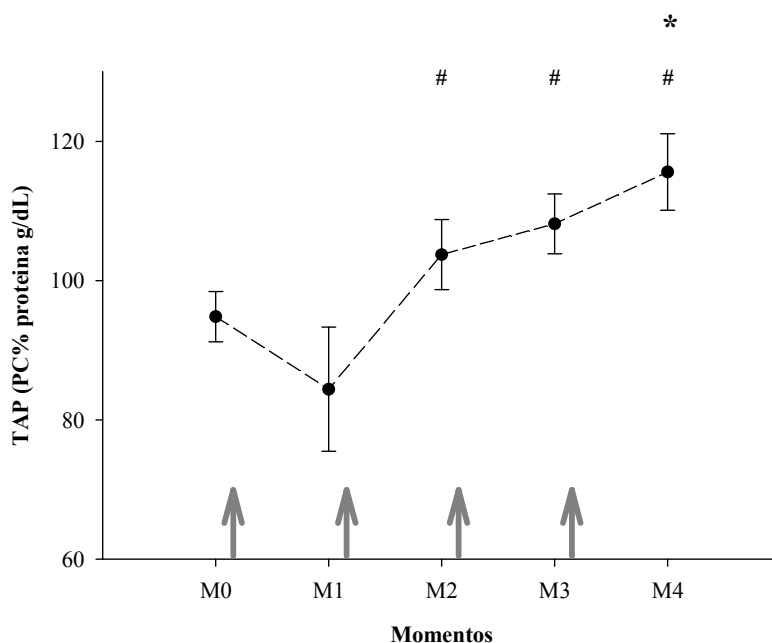


Miofibrilas fragmentadas, hialinizadas (*) e necrosadas. Quando presentes, os núcleos apresentavam-se emparelhados (quadrado) [(núcleos lado a lado) dando a falsa impressão de aumento do número de núcleos, mas de fato esta imagem sugere atrofia miofibrilar]. Núcleos com variação na forma (de fusiforme a arredondado) e na tonalidade (de hiper Cromático a pálido). Miofibrilas rarefeitas (a, fibras afastadas umas das outras, sugerindo atrofia), e núcleos com variação na forma e tonalidade. As lesões do momento M4 eram mais graves do que as do momento anterior pelas áreas de evidente rarefação miofibrilar difusa e acentuação da hialinização

Figura 10. Análise morfológica por microscopia óptica no momento M4

Efeito evolutivo de múltiplas doses de DOX no TAP cardíaco

A Figura 11 mostra os resultados da capacidade antioxidante total (TAP) no miocárdio de ratos tratados (M1, M2, M3, M4) e não tratados (M0) com DOX. Não houve queda significativa dos valores médios do TAP (ajustado para as concentrações da proteína do tecido cardíaco e ajustado ou não para o peso do tecido) nos momentos M0 e M1, mas houve um aumento significativo ($p=0,006$) observado a partir de M1 ($M0 < M4$; $M1 < M2, M3, M4$). Regressão linear nos animais tratados mostrou que os valores do TAP foram associados positivamente em relação ao tempo ($R=0,95$, $p=0,049$), sugerindo um aumento progressivo conforme doses adicionais de DOX foram administradas (Figura 6C).

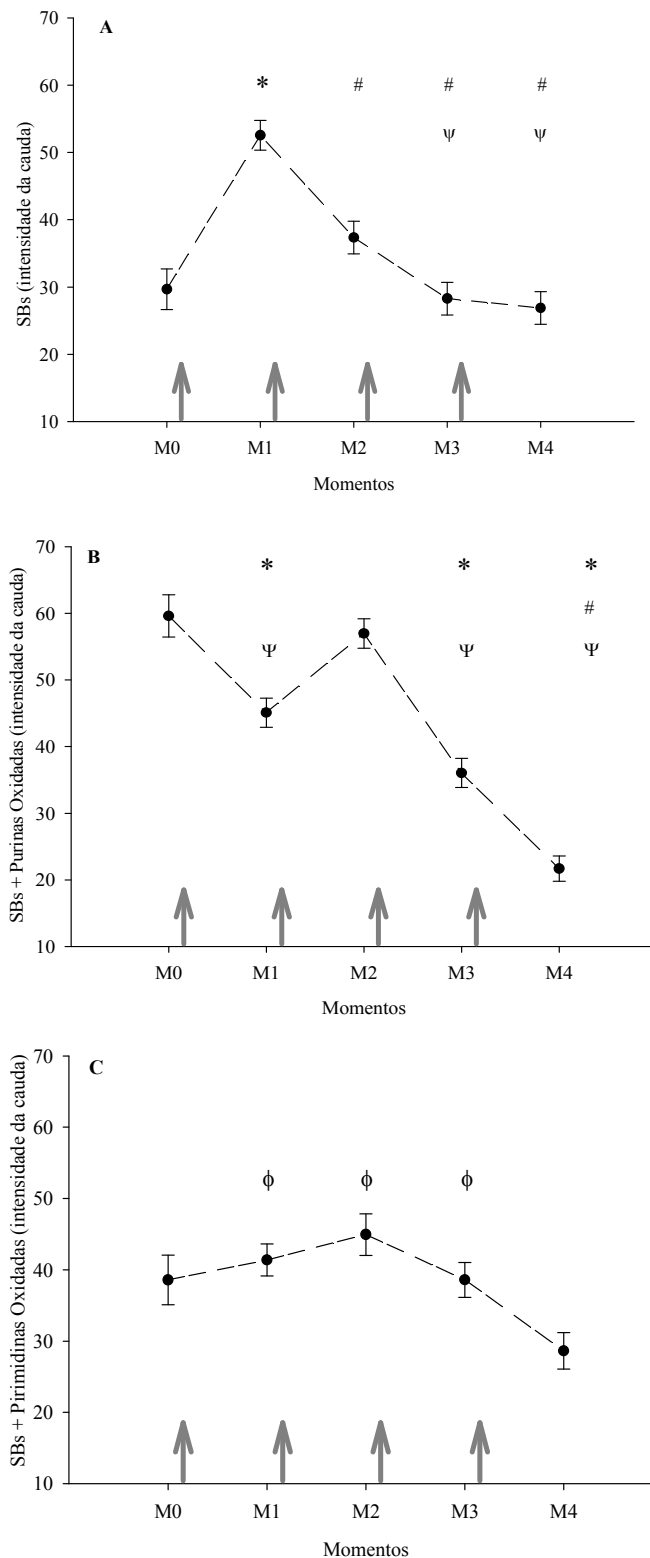


Dados em média. Momentos: M0, antes da 1ª injeção ($n = 7$); M1, 1 semana após a 1ª dose ($n = 7$); M2, 1 semana após a 2ª dose ($n = 8$); M3, 1 semana após a 3ª dose ($n = 8$); M4, 1 semana após a 4ª dose ($n = 8$). ANOVA uma via complementada pelo método de Duncan's usada para comparar os momento, $p=0,006$, (*, comparado com M0; #, comparado com M1). TAP, capacidade antioxidante total, PC fosfatidilcolina foi usada como padrão.

Figura 11. Efeito evolutivo de múltiplas doses de doxorubicina (4mg/kg/ semana/4 semanas) no TAP cardíaco

Efeito evolutivo de múltiplas doses de DOX no DNA

Globalmente, diminuição de lesões de DNA (SBs) e de purinas e pirimidinas oxidadas) foram detectadas a partir da segunda e terceira doses de DOX, respectivamente. O marco do aumento no DNA SBs foi entre os momentos M0 e M1 ($M1 > M0$), seguido de quedas significantes ($M2, M3, M4 < M1$; $M3, M4 < M2$) após doses adicionais de DOX (Figura 12A). Esses achados podem em parte sugerir que a atenuação da lesão do DNA ocorreu após a primeira dose de DOX. Quando SBs e purina oxidada são consideradas juntas, uma diminuição no dano no DNA foi observada em M1 ($M1 < M0$), M3 ($M3 < M0, M2$) e M4 ($M4 < M0, M1, M2$). Adicionalmente, um aumento foi detectado entre M1 e M2 (Figura 12B). Quando o dano no DNA foi associado a SBs e pirimidina oxidada, comportamento similar foi verificado, embora as comparações entre os momentos mostraram diferenças ($M4 < M1, M2, M3$) (Figura 12C). A regressão linear demonstrou associação inversa entre tempo e dano DNA apenas quando SBs foram avaliados ($R = -0,95, P = 0,049$) (Figura 6D). Nenhuma associação significativa foi detectada para o outro tipo de dano ao DNA (purinas e pirimidinas oxidadas).

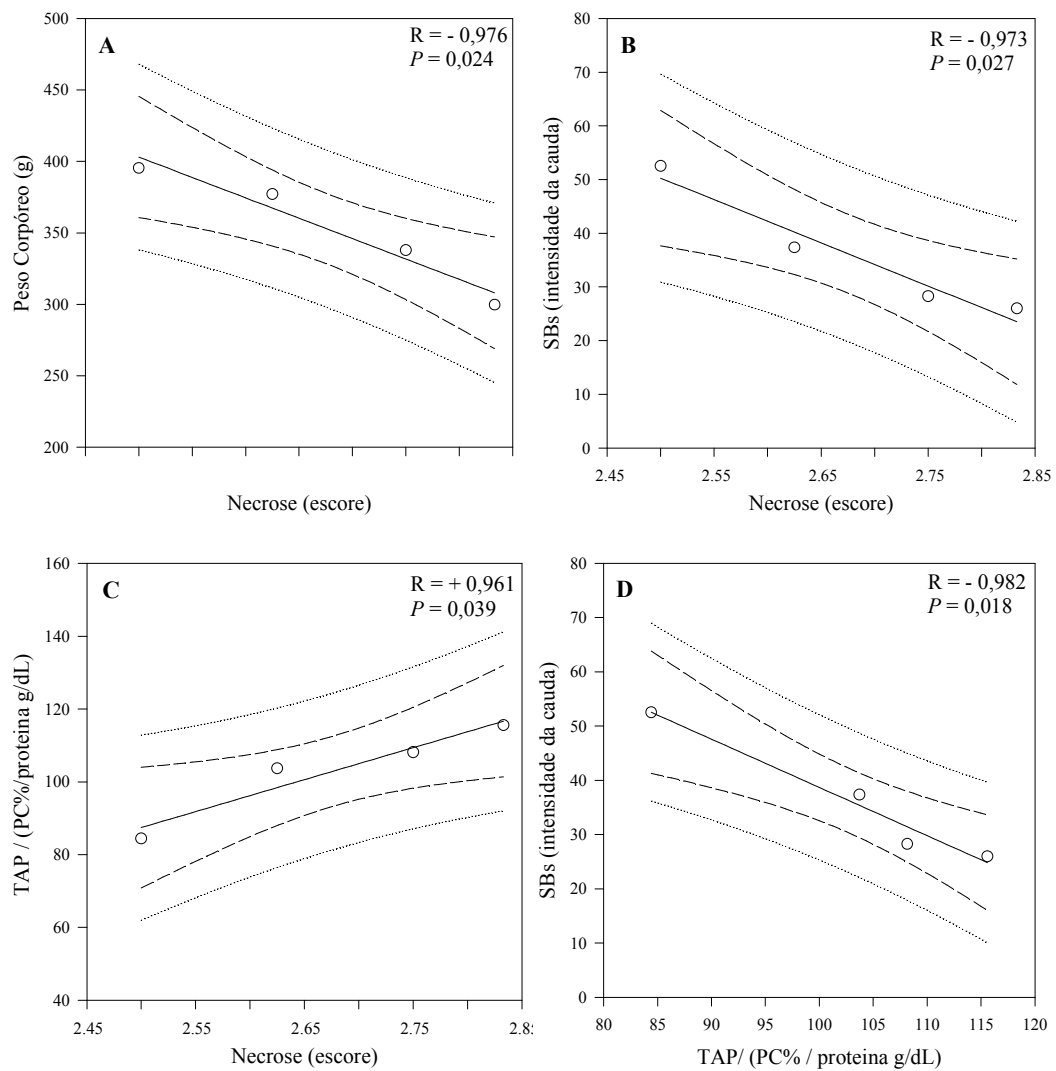


Dados em média \pm EP; \uparrow , injeção DOX (4 mg DOX / kg); Momentos: M0, antes 1ª injeção (250 nucleóides, n = 2); M1, 1 semana após 1ª injeção (450 nucleóides, n = 3); M2, 1 semana após 2ª injeção (375 nucleóides, n = 3); M3, 1 semana após 3ª injeção (425 nucleóides, n = 3); M4, 1 semana após 4ª injeção (384 nucleóides, n = 3). SBs, DNA strand breaks. One way ANOVA complementada pelo método de para comparar os momentos, $P < 0,001$ (*, diferença do M0; #, diferença de M1; ψ, diferença de M2; φ, diferença de M4). Dano DNA SBs (A), dano DNA SBs + purina oxidada (B), dano DNA SBs + pirimidina oxidada (C).

Figura 12. Efeito evolutivo de múltiplas doses de doxorubicina (4 mg/kg/semana/4 semanas) no dano no DNA (intensidade da cauda)

Associação entre as variáveis

Nos animais tratados com DOX, necrose obteve associação negativa com o peso ($R = - 0,98, P = 0,024$) (Figura 13A) e DNA SBs ($R = - 0,97, P = 0,027$) também foi identificado (Figura 13 B). Necrose foi associada positivamente com o TAP ($R = + 0,96, P = 0,039$) (Figura 13C). TAP foi negativamente associado com dano DNA (SBs) ($R = - 0,98, P = 0,018$) (Figure 13D). Purina oxidada teve associação positiva com pirimidina oxidada ($R = 0,97, P = 0,027$). Nenhuma associação foi identificada entre necrose versus purina oxidada ($R = - 0,80, P > 0,05$) e pirimidina ($R = - 0,78, P > 0,05$); e entre TAP versus purina oxidada ($R = - 0,561, P > 0,05$) e pirimidina ($R = - 0,618, P > 0,05$).



Dados são expressos em média \pm EP; cada ponto representa os momentos: M1 (1 semana após a primeira injeção); M2 (1 semana após a segunda injeção); M3 (1 semana após a terceira injeção); M4 (1 semana após a quarta injeção). Regressão Linear foi usada para examinar a associação entre as variáveis. [necrose vs. Peso (a), SBs (b), TAP (c); TAP vs. SBs (d)]. DOX: doxorubicina; SBs: strand breaks; TAP: capacidade antioxidante total.

Figura 13. Associação entre as variáveis

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que dose única de DOX está associada a um aumento da desorganização cardíaca, necrose e dano DNA, incluindo pirimidinas oxidadas e diminuição da capacidade antioxidante total (TAP). Enquanto, o efeito evolutivo de múltiplas doses de DOX foi associado a alterações progressivas e deletérias nos sinais gerais (clínico, peso, achados de necropsia). A regressão linear mostrou marcante diminuição do peso corpóreo, aumento da necrose e melhora da TAP e da lesão de DNA. Associações entre as diversas variáveis também foram identificadas pelo uso de múltiplas doses de DOX. Dano no DNA foi inversamente proporcional a TAP, enquanto necrose foi associada negativamente com dano DNA e peso corpóreo e positivamente a TAP.

O mecanismo de cardiotoxicidade induzida pela DOX permanece incerto. Várias hipóteses foram postuladas, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Singal *et al*, 1995). Porém, ainda não se confirmou que a produção de EROs é responsável pela indução da cardiotoxicidade e diferentes mecanismos podem estar envolvidos na toxicidade aguda *versus* toxicidade crônica. Numerosos estudos têm usado regimes de DOX em que os animais são tratados com uma dose única e extremamente alta de antraciclina. Portanto, os resultados desses estudos devem ser interpretados de maneira cautelosa. Também, dependendo do protocolo de estudo, existem riscos de misturar inadequadamente os efeitos cardiotoxicos agudos e crônicos (Simunek *et al*, 2009). De fato, estudos que utilizaram a suplementação de antioxidantes, como vitamina E (Van Vleet *et al*, 1980; Breed *et al*, 1980; Legha *et al*, 1982), n-acetilcisteína (Myers *et al*, 1983), quelante de ferro (Lopez *et al*, 1998) e polifenol (Bruynzeel *et al*, 2007), não mostraram o efeito protetor do antioxidante na toxicidade crônica.

Nós, previamente, observamos que o licopeno não melhora a disfunção ventricular esquerda induzida pela DOX em ratos que receberam 16 mg/kg DOX em doses fracionadas (Ferreira *et al*^a, 2007). Curiosamente, nós identificamos que DOX impediu o metabolismo do licopeno e aprimorou o TAP em tecido cardíaco de ratos uma semana após o término do tratamento com múltiplas doses de DOX, sugerindo uma ação antioxidante da DOX em um tratamento crônico (Ferreira *et al*^b, 2007).

É bem conhecido que a cardiomiopatia induzida pela DOX é dose-dependente (Deepa *et al*, 2006; Li T^a *et al*, 2000), e portanto, seria importante descobrir se o papel antioxidante da DOX sugerido no passado (Ferreira *et al*^b, 2007) também é dose-dependente. Esta resposta contribuiria para novas estratégias terapêuticas para pacientes que estão em quimioterapia com DOX.

No presente estudo, animais receberam dose cumulativa de 16 mg/kg (4 doses de 4 mg/kg/semana) que equivale a 500 mg/m² em humanos com 50kg (Hiroe *et al*, 1992). O estudo mimetiza situações clínicas nas quais múltiplas doses de antraciclínicos são administradas aos pacientes. É importante salientar que este protocolo foi escolhido para avaliar o efeito agudo de uma única dose de DOX e também o comportamento cinético de doses múltiplas no miocárdio.

Efeito agudo da DOX

Após 24h de dose única de DOX, diminuição nos valores do TAP e aumento da necrose e desorganização miofibrilar e dano DNA (DNA SBs, e DNA SBs mais pirimidinas oxidadas) foram identificados. Não obstante, não houve alterações no peso, sinais clínicos, óbitos e nas características da necropsia. Resultados similares em relação à ausência de óbitos foram observados em estudos usando dose única de DOX (Saad *et al*, 2001; Xin Y *et al*, 2011). A falta de estudos analisando o efeito agudo da DOX nas alterações clínicas e de necropsia impossibilita comparações.

Necrose precoce dos cardiomiócitos foi detectada em cultura de células 7 horas após exposição da DOX (0,5 µg/ mL)(L'Ecuyer *et al*, 2004) e em ratos Wistar, 48 horas após tratamento com DOX (Saad *et al*, 2001). Outros estudos mostraram desorganização miofibrilar (Saad *et al*, 2001) e diminuição dos antioxidantes hidrofílicos (glutationa (Bommu *et al*, 2008), catalase (Vijay *et al*, 2011), superóxido desmutase, glutaciona peroxidases (Vijay *et al*, 2011, Xin Y-F *et al*, 2011), depois 1° (Bommu *et al*, 2008), 2° (Xin Y-F *et al*, 2011) ou 3° (Vijay *et al*, 2011) dia da injeção de DOX em roedores. Estudo clínico identificou significativa redução dos antioxidantes hidrofílicos (TRAP, peroxil radical-trapping

antioxidante) 8 horas após a primeira administração de DOX nos pacientes (Erhola *et al*, 1996). Porém nenhum desses estudos utilizou a mesma metodologia que utilizamos.

Aumento no dano no DNA, incluindo pirimidinas e purinas oxidadas, foram identificads em cardiomiócitos H9c2 tratados com doxorubicina (0,5 µg/mL) por 4 horas, sugerindo que o dano no DNA ocorre precocemente na cardiotoxicidade induzida pela DOX (L'Ecuyer *et al*, 2006). Adicionalmente, mostrou-se que a superexpressão de glutathiona transferase (α 4-isoforma) nos miócitos (H9c2) eliminou o estresse oxidativo induzido pela DOX (0,5 µg/mL por 7 horas), mas não aboliu a apoptose celular. Tomando em conjunto todos esses dados reforçam que o estresse oxidativo é um mecanismo importante, mas não um mediador exclusivo da morte dos cardiomiócitos induzido por DOX (L'Ecuyer *et al*, 2004).

Efeito evolutivo de múltiplas doses de DOX

Já é bem estabelecido que a cardiotoxicidade induzida por antraciclínicos é dose - dependente (Deepa *et al*, 2006; Li *et al^a*, 2000). No entanto, poucos estudos têm avaliado evolutivamente os efeitos da droga nos danos cardíaco. O dano foi monitorado ao longo do tempo para: peso (Ghibu *et al*, 2012; Paiva *et al*, 2005), ecocardiograma (Popelova *et al*, 2009; Teraoka *et al*, 2000), histologia do cardiomiócito (Jackson *et al*, 1984) e marcadores do estresse oxidativo (malondialdeido cardíaco, anion superóxido (Ghibu *et al*, 2012), componentes antioxidantes hidrofílicos individuais (Li *et al^b*, 2000). Por outro lado, para nosso conhecimento, nenhum estudo monitorou cronologicamente *in vivo* o efeito de múltiplas doses de DOX no dano do DNA cardíaco (por meio do ensaio cometa), na defesa antioxidante total (por meio da TAP) e correlação do estresse oxidativo verus lesão histológica.

Aqui, nós detectamos danos progressivos nas características clínicas (estado geral, atividade física, brilho do pelo e perda de pelos) associados ao aumento da dose de DOX. Muitos animais (>86%) exibiram essas mudanças em M3.

Letargia (Siveski-Iliskovic *et al*, 1995; Rabelo *et al*, 2001) e diminuição progressiva no peso (Ferreira *et al*^a, 2007; Ferreira *et al*^c, 2007; Ghibu *et al*, 2012; Paiva *et al*, 2005) foram observados em ratos tratados com múltiplas doses de doxorubicina.

Alta mortalidade 31% (n = 18/58) foi consistente com outros estudos (Abdel-aleem *et al* 1997; Matsui *et al* 1999; Danelisen *et al* 2002).

Nossos achados de necropsia também estão de acordo com o observado em ratos tratados com adriamicina (2,2 mg/ kg/semana, durante 10 semanas) (Jackson *et al*, 1984). A maioria dos animais tratados com DOX apresentou amolecimento cardíaco, acúmulo de fluido seroso em cavidade abdominal e pleural, além de aderência entre órgãos. Essas alterações podem estar associadas às complicações de miocardiopatia, como identificada anteriormente (Ferreira *et al*^a, 2007). Embora não tenhamos avaliado a nefrotoxicidade, é relevante sugerir também que o acúmulo de fluido pode em parte ter sido decorrente da hipoalbuminemia, a qual é tipicamente relatada em pacientes (Deepa *et al*, 2006) ou ratos (Ferreira *et al*^b, 2007; Cusack *et al*, 1996) sob a ação da DOX.

Para o nosso conhecimento, não há na literatura estudos que tenham analisado progressivamente a morfologia do miocárdio ao longo do tratamento com DOX, como o adotado no presente estudo. Estudos que analisaram uma única vez o miocárdio após múltiplas doses de DOX, mostraram lesões histológicas tanto em animais (Ferreira *et al*^a, 2007; Saad *et al* 2001, Yagmurca *et al*, 2003) como em pacientes (Billingham *et al*, 1978). O expressivo aumento da necrose cardiomiocítica e da desorganização miofibrilar observado após a 1ª aplicação da DOX (4mg/Kg) indica que a lesão miocárdica já se inicia agudamente após dose equivalente a 125 mg/m² administrada em seres humanos de 50 kg (Hiroe *et al*, 1992). Essas alterações foram observadas em miocárdio de rato (Wistar albino) após 2 dias da dose de DOX (2.5 mg/Kg) (Saad *et al*, 2001). Por outro lado, essas alterações não foram identificadas em miocárdio de rato após 1 ou 10 dias da dose de DOX (0.44, ou 1.31 ou 2.19 mg/Kg) (Kapelko *et al*, 1999). As alterações identificadas após a 2ª dose apresentaram caráter progressivo no tangente à gravidade das lesões. As alterações que mais se destacaram foram degeneração miofibrilar (culminando em fragmentação/rarefação/atrofia de miofibrilas) e

variado grau de degeneração nuclear (culminando em necrose). Em nenhum momento houve sinais de recuperação. Prévios estudos mostraram que após a 24^a hora após a última dose de DOX ocorre extensiva necrose (rato, dose cumulativa: 17,5 mg/Kg) (Yu, Cui *et al* 2013) e vacualização (rato, dose cumulativa: 14 mg/Kg) (Santos *et al*, 2002) de cardiomiócitos. Utilizando semelhante protocolo de aplicação da DOX (4mg/Kg/semana, dose total, 16 mg/Kg), nosso grupo já havia identificado alterações morfológicas miocárdicas semelhantes (desorganização e rarefação da morfologia miofibrilar, necrose citoplasmática, e quando presentes, os núcleos se apresentavam com variados graus de degeneração) após 1 semana da última dose de DOX (em M4) em ratos Wistar (Ferreira *et al*^a, 2007). Examinando miocárdio de coelhos, após 1 semana da última dose de DOX (dose cumulativa 400 mg/m²) foram identificadas degeneração focal e difusa do miocárdio com substituição por fibrose, inflamação ocasional, miócitos com aspecto “enxuto” com áreas de edema intersticial. Além disso, alguns focos de degeneração miocárdica foram caracterizados por vacuolização múltipla, desorganização, desaparecimento do padrão miocárdico, e homogenização do sarcoplasma; nenhuma das alterações descritas foi referente às artérias coronárias (Breed *et al*, 1980).

Em relação à capacidade antioxidante total (TAP), nossos dados demonstraram, *in vivo*, que o aumento da defesa antioxidante cardíaca aumenta com o aumento da dose de DOX. Estes achados confirmam nosso estudo prévio *in vitro* que mostrou que a atividade antioxidante da DOX aumenta com o aumento da dose de doxorubicina (1 µM, 2 µM, 4 µM, e 8 µM) (Ferreira *et al*^b, 2007). Vários estudos avaliaram o efeito de múltiplas doses de DOX em componentes individuais do sistema antioxidante cardíaco em apenas 1 único momento e não houve mudanças na atividade da superóxido desmutase (Li *et al*^a, 2000; Li *et al*^b, 2000) e catalase (Li *et al*^a, 2000; Kang *et al*, 2002). Porém, aumento na atividade da catalase foi descrito (Robison *et al*, 1989).

Um importante aspecto a ser mencionado é o fato de poucos estudos terem avaliado evolutivamente o efeito de cada uma das múltiplas doses de DOX no sistema antioxidante. Esses poucos estudos reportaram apenas componentes do sistema antioxidante hidrofílico. Atividades da glutathione peroxidase e Mn-

superóxido dismutase diminuíram na primeira e segunda hora após a administração em ratos que receberam doses fracionadas de adriamicina (dose cumulativa de 15 mg/kg) (Li *et al*^b,2000). No entanto, estes resultados devem ser interpretados cautelosamente uma vez que os momentos analisados podem representar o efeito agudo transitório da última dose de DOX. Não houve relação linear entre o sistema antioxidante hidrofílico e o número de administrações de adriamicina em coelhos (glutathiona cardíaca total, reduzida e peroxidase (Jackson *et al*, 1984) e em humanos (TRAP plasmático) (Erhola *et al*, 1996). A diferença entre este e estudos prévios pode ser devida a metodologia empregada. Nós adotamos a capacidade antioxidante total (TAP) que mede a capacidade antioxidante tanto do compartimento hidrofílico como lipofílico. O teste TAP permite a avaliação dos antioxidantes nos dois compartimentos (Yeum *et al*,2009) contra o estresse oxidativo.

A diminuição no dano de DNA (Sbs e purinas e pirimidinas oxidadas) miocárdico foi detectada após a 2^a e 3^a administrações de DOX, respectivamente. Usando o mesmo protocolo (doses fracionadas), nós relatamos previamente níveis similares de dano DNA (SBs, SBs e purinas oxidadas e SBs e pirimidinas oxidadas) em miocárdio de ratos no momento M4 (Ferreira *et al*^c,2007). A atenuação progressiva no dano verificado em cardiomiócitos *in vivo* foi também observada em linfócitos de humanos após tratamento *in vitro* com DOX nas seguintes doses 0,25, 0,5, 0,75 e 1 µM (Wysokinski *et al*, 2012). Resultado similar foi observado em células de adenocarcinoma de mama tratadas com adriamicina. De acordo com os autores, esse efeito pode ser devido a indução de ambos DNA SBs e cross-links (Cullinane *et al*,2000). Por outro lado, um aumento no dano no DNA SBs foi identificado entre M0 e M1 (M1>M0), depois de dose única de DOX. Esse resultado está de acordo com outros estudos que mostraram aumento do dano no DNA *in vitro* (célula de incubação) (Wysokinski *et al*, 2012) e *in vivo* (pacientes com câncer) (Nadin *et al*, 2006) após tratamento com DOX.

Nosso estudo mostrou associações entre as variáveis nos animais tratados com múltiplas doses de DOX.O peso diminui e a necrose aumenta, ou seja, pioram juntos. A lesão oxidativa do DNA diminui e a necrose aumenta, ou seja,

mesmo com a lesão oxidativa do DNA melhorando, a necrose não melhora, sugerindo que a mesma não deve ser em decorrência do estresse oxidativo. O mesmo resultado foi observado em relação a TAP, melhora a TAO mas há uma piora da necrose, sugerindo que a mesma não deve ser decorrentes do estresse oxidativo. Além disso, TAP foi associada negativamente com dano do DNA, sugerindo que a atenuação progressiva no dano DNA está relacionada com a melhora da defesa antioxidante. Este último resultado pode ser explicado em parte pelo efeito antioxidante das múltiplas doses de DOX, como mostrado anteriormente por nosso grupo (Ferreira *et al*^b, 2007). Esses resultados sugerem que a necrose cardiomiocitária progressiva e perda de peso induzida por múltiplas doses de DOX ocorrem apesar da atenuação gradual do dano no DNA e aumento da defesa total antioxidante. Não encontramos estudos na literatura que avaliaram a associação entre essas variáveis.

CONCLUSÃO

A dose única de DOX levou à desorganização miocárdica, necrose e lesão oxidativa no DNA miocárdicos e diminuição da capacidade antioxidante total miocárdica.

O estudo do efeito evolutivo de múltiplas doses de DOX mostrou alterações progressivas nos sinais clínicos, necrose miocárdica, capacidade antioxidante total miocárdica e lesão do DNA. A melhora progressiva da lesão oxidativa do DNA e TAP foi associada ao aumento progressivo da necrose miocárdica.

Nossos resultados sugerem que a cardiotoxicidade aguda está associada a patogênese oxidativa e que a cardiotoxicidade crônica está associada a outros mecanismos diferentes do oxidativo. Além disso, nossos resultados indicam fortemente o caráter progressivo atenuante da lesão oxidativa cardíaca ao longo do tratamento com múltiplas doses de DOX.

FINANCIAMENTO

O presente estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil (FAPESP # 2007/07455-2), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq PQ-II # 302293/2012-4) e pela Pro-Reitoria de Pesquisa UNESP, São Paulo. Opiniões, resultados, conclusões ou recomendações expressas nesse estudo são dos autores e não necessariamente refletem a opinião das agências de fomentos.

REFERÊNCIAS

Abdel-aleem, S., El-Merzabani, M. M., Sayed-Ahmed, M., Taylor, D. A., & Lowe, J. E. Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 789 -797.

Aldini G, Yeum K, Russell RM, Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1043-1050.

Al-Majed, A. A., Mostafa, A. M., Al-Rikabi, A. C., & Al-Shabanah, O. A. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research* 2002; 46(5), 445-451.

Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI, Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 2006; 354: 290-298.

Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treatment Reports* 1978;62(6):865-72.

Bommu P, Nanjan CMJ, Joghee NM, Muthureddy Nataraj SM, Bhojraj S. *Phyllanthus maderaspatensis*, a dietary supplement for the amelioration of adriamycin-induced toxicity and oxidative stress in mice. *J Nat Med* 2008; 62: 149-154.

Boucek Jr, R. J., Miracle, A., Anderson, M., Engelman, R., Atkinson, J., & Dodd, D. A. Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1435-46.

Breed JG, Zimmerman AN, Dormans JA, Pinedo HM. Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin - induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res* 1980; 40: 2033-8.

Bristow MR, Billingham ME, Mason JW, et al. Clinical spectrum of anthracycline antibiotic cardiotoxicity. *Cancer Treat Rep* 1978; 62: 873-879.

Bruynzeel AM, Vormer-Bonne S, Bast A, Niessen HW, van der Vijgh WJ. Long-term effects of 7-mono-hydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007; 60: 509-514.

Chatterjee K, Zhang J, Honbo N e Karliner JS. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiologic* 2010; 115(2): 155-162.

Chen, P.-Y., Hou, C.-W., Shibu, M. A., et al. Protective effect of Co-enzyme Q10 On doxorubicin-induced cardiomyopathy of rat hearts. *Environ. Toxicol.* doi:10.1002/tox.22270 2016

Choi, H. S., Park, E. S., Kang, H. J., Shin, H. Y., Noh, C. I., Yun, Y. S et al. Dexrazoxane for preventing anthracycline cardiotoxicity in children with solid tumors, *J Korean Med Sci* 2010;25: 1336-1342.

Collins AR, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A, Vohnout B, et al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 373-377.

Cullinane C, Cutts SM, Panousis C, Phillips DR. Interstrand cross-linking by adriamycin in nuclear and mitochondrial DNA of MCF-7 cells. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 1019–1025.

Danelisen I, Palace V, Lou H and Singal PK. Maintenance of myocardial levels of vitamin A in heart failure due to adriamycin. *J Moll Cell Cardiol* 2002; 34(7): 789-95.

Deepa PR, Varalakshmi P. 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* 2006; 217: 176-183.

Erhola M, Kellokumpu-Lehtinen P, Metsa-Ketela T, Alanko K, Nieminen MM. Effects of anthracyclin-based chemotherapy on total plasma antioxidant capacity in small cell lung cancer patients. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 383-390.

Feng, W., Liu, G., Xia, R., Abramson, J. J., & Pessah, I. N. Site - selective modification of hyperreactive cysteines of ryanodine receptor complex by quinines. *Mol pharmacol* 1999; 55: 821-31.

Ferrans, V. J., Clark, J. R., Zhang, J., Yu, Z. X., & Herman, E. H. Pathogenesis and prevention of doxorubicin cardiomyopathy. *Tsitologiya* 1997; 39: 928-37.

Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, Ladeira MSP, Salvadori DMS, Nascimento MCMO, et al. Effect of Lycopene on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Echocardiographic, Histological, and Morphometrical Assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101: 16-24. A

Ferreira ALA, Yeum K-J, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, et al. Doxorubicin as na Antioxidant: Maintenance of Myocardial Levels of Lycopene under Doxorubicin Treatment. *Free Radic Biol Med* 2007; 43:740-751. B

Ferreira ALA, Salvadori DMF, Nascimento MCMO, Rocha NS, Correa CR, Pereira EJ, et al. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutat Res* 2007; 631: 26-35. C

Ferreira ALA, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline - Induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Med Chem* 2008; 6: 278-281.

Ghibu S, Delemasure S, Richard C, Guillard JC, Martin L, Gambert S, et al. General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: Absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid. *Biochimie* 2012; 94: 932-939.

Goorin, A. M., Chauvenet, A. R., Perez-Atayde, A. R., Cruz, J., McKone, R., & Lipshultz, S. E. Initial congestive heart failure, six to ten years after doxorubicin chemotherapy for childhood cancer. *J Pediatr* 1990; 116: 144-147.

Hale JP, Lewis IJ. Anthracyclines: cardiotoxicity and its prevention. *Arch Dis Child* 1994; 71: 457-462.

Hazari, M. S., Haykal-Coates, N., Winsett, D. W., Costa, D. L., & Farraj, A. K. Continuous electrocardiogram reveals differences in the short - term cardiotoxic

response of wistar - Kyoto and spontaneously hypertensive rats to doxorubicin. *Toxicol Sci* 2009 jul; 110 (1): 224-34.

Hiroe M, Ohta Y, Fujita N, et al. Myocardial uptake of ¹¹¹In monoclonal antimyosin Fab in detecting doxorubicin cardiotoxicity in rats. Morphological and hemodynamic findings. *Circulation* 1992; 86(6): 1965-72.

Jackson JA, Reeves JP, Muntz KH, Kruk D, Prough RA, Willerson JT, et al. Evaluation of free radical effects and catecholamine alterations in adriamycin cardiotoxicity. *Am J Pathol* 1984; 117: 140-153.

Kang YJ, Sun X, Chen Y, Zhou Z. Inhibition of doxorubicin chronic toxicity in catalase-overexpressing transgenic mouse hearts. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1-6.

Kapelko VI, Tsyplenkova VG, Khatkevich, Beskrovnova NN. Morphological and functional estimation of acute and protracted cardiomyocyte alterations caused by doxorubicin in varied doses. *Exp Clin Cardiol* 1999;4(1):35-42.

Kim, S., Kim, S., Kim, B., Rah, S., Chung, S. M., Im, M., & Kim, U. Doxorubicin - induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Exp Mol Med* 2006 Oct 31; 38 (5): 535-45.

Kim, C., Kim, N., Joo, H., Youm, J. B., Park, W. S., Van Cuong, D et al. Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of Adriamycin. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46(2): 200-10.

Lebrecht, D., Kokkori, A., Ketelsen, U. P., Setzer, B., & Walker, U. A. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *JPathol* 2005; 207: 436-444.

L'Ecuyer T, Allebban Z, Thomas R, Vander Heide R. Glutathione S-transferase overexpression protects against anthracycline-induced H9C2 cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H2057-H2064.

Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, et al. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 393: 411-418.

Li T, Danelisen I, Belló-Klein A, Singal PK. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 523-30. A

Li T, Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 2000; 102: 2105-10. B

Lim, C. C., Zuppinger, C., Guo, X., Kuster, G. M., Helmes, M., Eppenberger, H. M et al. Anthracyclines induce calpain - dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004; 279: 8290-99.

Lipshultz, S. E., Colan, S. D., Gelber, R. D., Perez-Atayde, A. R., Sallan, S. E., & Sanders, S. P. Late cardiac effects of doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood. *N Engl J Med* 1991; 324: 808-15.

Lipshultz, S. E., Lipsitz, S. R., Sallan, S. E., Dalton, V. M., Mone, S. M., Gelber, R. D., & Colan, S. D. Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2629-36.

Lopez M, Vici P, Di Lauro K, Conti F, Paoletti G, Ferraironi A, et al. Randomized prospective clinical trial of high-dose epirubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer and soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 1998; 16: 86-92.

Matsui H, Morishima I, Numaguchi Y, Toki Y, Okumura K, Hayakawa T. Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sciences* 1999; 65: 1265-74.

Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Doxorubicin degradation in cardiomyocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jul;322(1):408-19

Mettler FP, Young DM, e Ward JM. Adriamycin - induced Cardiotoxicity (Cardiomyopathy and congestive heart failure) in rats. *Cancer Res* 1977; 37 : 2705-13.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Ver* 2004 Jun;56(2):185-229.

Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, et al. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol* 1983; 10: 53-55.

Nadin SB, Vargas-Roig LM, Drago G, J. I, Ciocca DR. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: A pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. *Cancer Letters* 2006; 28: 84-97.

Nascimento MCM, Matsubara BB, Matsubara LS, Correa CR, Pereira EJ, Moreira PL, et al. Pharmacological dose of alpha-tocopherol induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30: 1540-48.

Ondrias K, Borgatta L Kim DH, Ehrlich BE. Biphasic effects of doxorubicin on the calcium release channel from sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle. *Circ Res* 1990; 67: 1167 - 74.

Ozdogan K, Taskin E, Dursun N. Protective effect of carnosine on adriamycin - induced oxidative heart damage in rats. *Anadolu Kardiyal Derg* 2011; 1: 3-10.

Paiva MG, Petrilli AS, Moisés VA, Macedo CRD, Tanaka C, Campos O. Cardioprotective effect of dexrazoxane during treatment with doxorubicin: A study using low-dose dobutamine stress echocardiography. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45: 902-8.

Piegari, E., Di Salvo, G., Castaldi, B., Vitelli, M. R., Rodolico, G., Golino, P. et al. Myocardial strain analysis in a doxorubicin - induced cardiomyopathy model. *Ultrasound Med Biol* 2008 Mar; 34(3): 370 - 8.

Pontes JCDV, Junior JFG, da Silva GVR, et al. Anatomopathological study of cardiomyopathy induced by doxorubicin in rats. *Acta Cir. Bras* 2010, 25 (2): 137-43.

Popelova O, Sterba M, Haskova P, Simunek T, Hroch M, Guncova I, et al. Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br J Cancer* 2009; 101: 792-802.

Robison TW, Giri SN, Wilson DW. Effects of chronic administration of doxorubicin on myocardial creatine phosphokinase and antioxidant defenses and levels of lipid peroxidation in tissues and plasma of rats. *J Biochem Toxicol* 1989; 4: 87-94.

Saad SY, Najja TA and Al - Rikabi AC. The preventive role of deferoxamine against acute doxorubicin - induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43 (3): 211-18.

Santos, D. L., Moreno, A. J. M., Leino, R. L., Froberg, M. K., & Wallace, K. B. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002; 185(3): 218-227.

Segredo, M. P. F., Salvadori, D. F., Rocha, N. S., Moretto, F. F., Correa, C. R., Camargo, E. A. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Human and Experimental Toxicology* 2013; online version: 1-13.

Šimůnek, T., Štěřba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., & Geršl, V. Anthracycline - induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Reports* 2009, 61: 154-71.

Singal PK, Deally C, Weinberg L. Subcellular effects of Adriamycin in the heart: a concise review. *J Mol Cell Cardiol* 1987; 19: 543-53.

Singal PK, Iliskovic N, Li T, Kumar D. Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *FASEB J* 1997 Oct, 11 (12): 931-6.

Singal, P. K., Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., Thomas, T. P., & Li, T. Combination therapy with probucol prevents adriamycin - induced cardiomyopathy. *Journal of Molecular and Cell Cardiol* 1995; 27 (7): 1055-63.

Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin - induced cardiomyopathy. *NEJM* 1998; 339: 900- 5.

Singal, P., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., & Iliskovic, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Mol and cell biochem* 2000: 207(1-2), 77-86.

Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, Schineider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-91.

Smith, L. A., Cornelius, V. R., Plummer, C. J., Levitt, G., Verrill, M., Canney, P., & Jones, A. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: Systematic review and meta - analysis of randomized controlled trials. *BMC Cancer* 2010; 10: 1-14.

Solem LH, Henry TR, Wallace KR. Disruption of mitochondrial calcium homeostasis following chronic doxorubicin administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994 dec; 129 (2): 214 -22.

Swain M, Whaley FS and Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*; 97(11): 2869-79.

Takahashi, S. S., Denvir, M. A., Harder, L., Miller, D. J., Cobbe, S. M., Kawakami, M. et al. Effects of in vitro and in vivo exposure to doxorubicin (adriamycin) on caffeine - induced Ca²⁺ release from sarcoplasmic reticulum and contractile protein function in chemically - skinned rabbit ventricular trabeculae. *Jpn J Pharmacol* 1998; 76: 405-13.

Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsk.Da. Daunomycin an Antitumor Antibiotic in Treatmentt of Neoplastic Disease - Clinical Evaluation with Special Reference to Childhood Leukemia. *Cancer*. 1967;20(3):333-53.

- Teraoka K, Hirano M, Yamaguchi K, Yamashina A. Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats. *Eur J Heart Fail* 2000; 2: 373-378.
- Todorova, V. K., Kaufmann, Y., Hennings, L., et al. Oral glutamine protects against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity of tumor-bearing rats. *J nutr*, 2010; 140(1), 44-8.
- Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol* 1980; 99: 13 - 42.
- Vijay T, Rajan D, Sarumathy K, Palani S, Sakthivel K. Cardioprotective, antioxidant activities and Phytochemical analysis by GC-MS of *Gmelina arborea* (GA) in Doxorubicin-induced myocardial necrosis in Albino rats. *J App Pharm Sci* 2011; 1: 198-204.
- Von Hoff, D. D., Layard, M. W., Basa, P., Davis, H. L., Von Hoff, A. L., Rozenzweig, M., & Muggia, F. M. Risk factors for doxorubicin - induced congestive heart failure. *Ann Intern Med* 1979; 91: 710-17.
- Wysokinski D, Blasiak J, Wozniak K. Zinc differentially modulates DNA damage induced by anthracyclines in normal and cancer cells. *Exp Oncol* 2012; 34: 327-31.
- Xin, Y., Zhang, S., Gu, L., Liu, S., Gao, H., You, Z. et al. Electrocardiographic and biochemical evidence for the cardioprotective effect of antioxidants in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in the beagle dogs. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2011; 34(10), 1523-6.
- Yagmurca M, Fadillioglu E, Erdogan H, Ucar M, Sogut S, Irmak MK. Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacological Research* 2003;48:377-82.
- Yeum, K. J., Beretta, G., Krinsky, N. I., Russell, R. M., & Aldini, G. Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. *Nutrition* 2009; 25:839-46.

Yu X.,Cui L, Zhang Z,Zhao Q and Li S. Alpha-Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2013; 45(10): 817-26.

ANEXOS

Anexo A - Certificado de aprovação do comitê de ética animal

 UNESP	 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA	 Comissão de Ética em Experimentação Animal
		
Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99		
<h1>Certificado</h1>		
<p>Certificamos que o (Protocolo CEEA 951/2012) "Efeito evolutivo da cardiotoxicidade induzida por múltiplas doses de doxorubicina. Avaliação morfológica, morfológica e ultraestrutural", a ser conduzido por Manuella Pacifico de Freitas Segredo, orientada pela Prof^a. Dr^a. Ana Lucia dos Anjos Ferreira, com a colaboração de Maeli Dal Pai Silva e Maria Carolina Munhoz de Oliveira Nascimento, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.</p>		
Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 31/05/2012.		
 Prof ^a Dr ^a Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA	 Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA	
<small>Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br</small>		

Human & Experimental Toxicology

<http://het.sagepub.com/>

Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin

M Pacifico de Freitas Segredo, DM Favero Salvadori, NS Rocha, FC Fontes Moretto, CR Correa, EA Camargo, DC de Almeida, RA Silva Reis, CM Murbach Freire, MG Braz, G Tang, LS Matsubara, BB Matsubara, K-J Yeum and ALA Ferreira

Hum Exp Toxicol 2014 33: 748 originally published online 25 November 2013

DOI: 10.1177/0960327113512342

The online version of this article can be found at:

<http://het.sagepub.com/content/33/7/748>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

Additional services and information for *Human & Experimental Toxicology* can be found at:

Email Alerts: <http://het.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://het.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

>> [Version of Record](#) - Jun 26, 2014

[OnlineFirst Version of Record](#) - Nov 25, 2013

[What is This?](#)

Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin

M Pacifico de Freitas Segredo¹, DM Favero Salvadori²,
 NS Rocha³, FC Fontes Moretto¹, CR Correa¹, EA Camargo²,
 DC de Almeida², RA Silva Reis¹, CM Murbach Freire²,
 MG Braz², G Tang⁴, LS Matsubara¹, BB Matsubara¹,
 K-J Yeum⁵ and ALA Ferreira¹

Abstract

The mechanism of doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity remains controversial. Wistar rats ($n = 66$) received DOX injections intraperitoneally and were randomly assigned to 2 experimental protocols: (1) rats were killed before (-24 h, $n = 8$) and 24 h after ($+24$ h, $n = 8$) a single dose of DOX (4 mg/kg body weight) to determine the DOX acute effect and (2) rats ($n = 58$) received 4 injections of DOX (4 mg/kg body weight/week) and were killed before the first injection (M_0) and 1 week after each injection (M_1 , M_2 , M_3 , and M_4) to determine the chronological effects. Animals used at M_0 ($n = 8$) were also used at moment -24 h of acute study. Cardiac total antioxidant performance (TAP), DNA damage, and morphology analyses were carried out at each time point. Single dose of DOX was associated with increased cardiac disarrangement, necrosis, and DNA damage (strand breaks (SBs) and oxidized pyrimidines) and decreased TAP. The chronological study showed an effect of a cumulative dose on body weight ($R = -0.99$, $p = 0.011$), necrosis ($R = 1.00$, $p = 0.004$), TAP ($R = 0.95$, $p = 0.049$), and DNA SBs ($R = -0.95$, $p = 0.049$). DNA SBs damage was negatively associated with TAP ($R = -0.98$, $p = 0.018$), and necrosis ($R = -0.97$, $p = 0.027$). Our results suggest that oxidative damage is associated with acute cardiotoxicity induced by a single dose of DOX only. Increased resistance to the oxidative stress is plausible for the multiple dose of DOX. Thus, different mechanisms may be involved in acute toxicity versus chronic toxicity.

Keywords

Doxorubicin, heart, rat, antioxidant capacity, DNA damage, morphology

Introduction

The use of anthracycline against malignant neoplasms is one of the major successful therapies for cancer.¹ Among anthracyclines, doxorubicin (DOX) is a powerful drug used for treating a wide variety of human tumors, including breast cancer, sarcomas, childhood solid tumors, leukemia, Hodgkin's disease, non-Hodgkin's lymphomas, and many others. However, its irreversible cardiotoxicity has limited its use.² Recent meta-analysis has shown that anthracyclines increase the risk for cardiac death by 4.94-fold as compared to non-anthracycline regimens.³ Consequently, therapeutic administration of DOX needs to be carefully

¹Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

²Department of Pathology, Botucatu Medical School, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

³Department of Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, São Paulo State University-UNESP, Botucatu, SP, Brazil

⁴United States Department of Agriculture, Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, MA, USA

⁵Division of Food Bioscience, College of Biomedical and Health Sciences, Konkuk University, Chungju-si, South Korea

Corresponding author:

ALA Ferreira, Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, São Paulo State University-UNESP, CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brazil.

Email: ferreira@fmb.unesp.br

monitored to minimize the incidence of cardiotoxicity, which may significantly reduce its effectiveness against tumors. While acute cardiotoxicity exhibits temporary clinical signs, chronic events can include irreparable cardiomyopathy that affects approximately 26% of patients receiving a 550 mg/m² total dose.⁴

Although DOX-induced injury appears to be multifactorial, a common denominator to most of the proposed mechanisms is cellular damage mediated by reactive oxygen species (ROS).^{5–8} However, it remains increasingly controversial as to whether oxidative stress is a determinant mechanism.^{9–18} Using an early chronic protocol assessment 1 week after the last injection of multiple DOX doses (cumulative dose, 16 mg/kg body weight), we found that lycopene supplementation does not improve left ventricular dysfunction induced by DOX.¹⁹ Interestingly, we have also discovered that DOX prevented lycopene metabolism and enhanced cardiac total antioxidant performance (TAP) in rats 1 week after ending treatment. These findings suggest DOX antioxidant activity after chronic treatment. This antioxidant activity was confirmed *in vitro* in a dose-dependent manner.¹⁷ As it is well known that cardiomyopathy induced by DOX is dose dependent, it would be important to determine whether or not the antioxidant role of DOX¹⁷ is also dose dependent. This would be especially important for new therapy strategies in patients undergoing chemotherapy with DOX.

The present study investigated the time course of DOX-induced cardiotoxicity using total antioxidant capacity, DNA damage, and morphological analysis in rat myocardium. First, we evaluated the acute effect of a single dose of DOX. Second, we studied the chronological effect of multiple DOX doses on cardiotoxicity by monitoring over time.

Materials and methods

Chemicals

Doxorubicin hydrochloride was purchased from Pharmacia (Milan, Italy). Sodium pentobarbital (Cristalia, Paulinia, São Paulo, Brazil) was used for anesthesia. Chemicals used in TAP analysis were fatty acid analog 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid (BODIPY 581/591) purchased from Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA); radical initiator 2,2'-azobis(4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile) (MeO-AMVN) purchased from Wako Chemicals (Richmond, Virginia, USA); L- α -phosphatidylcholine obtained from Sigma

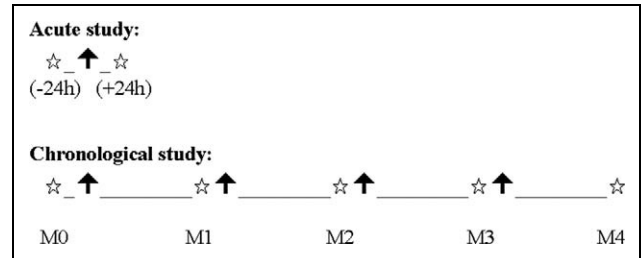


Figure 1. Experimental Protocols. ☆: animal killing; ↑: DOX injection (4 mg/kg body weight); acute study: –24 h, that is, 24 h before DOX injection; +24 h, that is, 24 h after DOX injection; chronological study: M₀, 24 h before (–24 h) before DOX treatment; M₁, M₂, M₃, and M₄: 1 week after 1st, 2nd, 3rd, and 4th DOX injection, respectively. DOX: doxorubicin.

Chemical (St Louis, Missouri, USA). Chemicals used in the comet assay that include fluorescein-diacetate, sybr gold, sodium chloride (NaCl), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Tris, sodium *N*-lauryl sarcosine, Triton X-100, dimethyl sulfoxide (DMSO), low-melting-point agarose were obtained from Sigma Chemical (St Louis, Missouri, USA), while normal agarose, proteinase K, collagenase type I, Dulbecco's phosphate-buffered saline, and Hanks balanced salt solution (HBSS) from Invitrogen (Grand Island, New York, USA) and buffer enzyme, endonuclease III (endo III), and formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG) from Trevigen (Gaithersburg, Maryland, USA).

Animals

Male Wistar rats ($n = 66$, 12-week-old, weighing 350–400 g) were purchased from CEMIB (Unicamp, Campinas, São Paulo, Brazil). Animals were housed for 7 weeks in the animal facility of the Experimental Laboratory at Botucatu Medical School, UNESP. They consumed water and a commercial diet *ad libitum*, were weighed weekly, and clinically evaluated.

Animals were subjected to two experimental protocols (Figure 1). To determine the DOX acute effect, animals were killed 24 h before (–24 h, $n = 8$) and 24 h after (+24 h, $n = 8$) an intraperitoneal (IP) single dose (4 mg/kg body weight). No deaths occurred during the study. To determine the chronological effect of multiple DOX doses, rats ($n = 58$) received IP injections of DOX (4 mg/kg body weight), once a week for 4 weeks (a cumulative dose of 16 mg/kg body weight). The cumulative dose was selected according to previous studies.^{20,21} Animals were randomly selected and killed before the first injection

(M₀) and one week after each injection. The times were designated as M₀, M₁, M₂, M₃, and M₄. A total of 58 animals were used for the chronological study (from 58, 8 animals were also used in the acute study). However, non-programmed deaths occurred between M₁ and M₂ ($n = 6$), M₂ and M₃ ($n = 5$), and M₃ and M₄ ($n = 7$). Therefore, those animals ($n = 18$) were excluded and the remaining 40 animals were used for the chronological study (M₀ ($n = 8$; they were the same animals used at -24 h of acute study); M₁ ($n = 8$); M₂ ($n = 8$); M₃ ($n = 8$); and M₄ ($n = 8$)).

Rats were fasted overnight, followed by euthanasia under sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight) IP injection, and were immediately necropsied. Hearts (left ventricle) were collected and appropriately stored for the following analyses: TAP, oxidative DNA damage (comet assay), and morphology.

The protocol used was in accordance with the Ethical Principles for Animal Research and was approved by the local ethical committee for animal research (protocol # 591).

Histology

A 3-mm thick coronal section of each left ventricle was fixed in 10% buffered formalin for 48 h and embedded in paraffin. Sections of 5 mm thick were cut from the blocked tissue and stained with hematoxylin–eosin (H&E). The severity of pathologic changes identified by H&E was blindly graded by two pathologists on a scale from one (none or minor alterations) to three (marked abnormality) using semiquantitative analysis.^{19,22} The analyses considered the myofibrillar disarrangement, myofibrillar necrosis, myocardial structure, and infiltrative changes. Disagreements between the pathologists were resolved by case-to-case discussion until a consensus decision was reached. These investigations were performed using an equipment from Carl Zeiss (Germany) and consisted of a light microscope (Axio Imager A1; magnification 400×) attached to a digital video camera (Zeiss Vision) and connected to a personal computer equipped with image analyzer software (Axio Vision Rel version 4.3, Carl Zeiss).

Total antioxidant performance

Liposome preparation. Liposomes were prepared as previously reported by Ferreira et al.¹⁷ Phospholipids phosphatidylcholine (PC) was dissolved in chloroform and evaporated very slowly under a gentle

stream of nitrogen while rolling the flask to deposit a thin lipid film. The flask was then maintained under nitrogen stream for an additional 20 min to eliminate residual solvent. Then, the lipid film was rehydrated with phosphate-buffered saline (PBS, 40 mM, pH 7.4) to a concentration of 2.5 mg of phospholipids per milliliter, frozen, and thawed three times and followed by sonication (Branson Sonifer 450, Danbury, Connecticut, USA) under ice for 30 s and repeated three times.

Cardiac TAP. The TAP of the heart (left ventricle wall) was quantified by comparing the area under the curve relative to the oxidation kinetics of PC liposome suspension used as the reference biological matrix.²³ The left ventricle, stored at -80°C , was weighed (0.1 g), minced, and homogenized for 20 s on ice with 2 mL of phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) using an IKA, Ultra-Turrax T8 homogenizer (Wilmington, North Carolina, USA). Aliquots of the supernatant were collected after centrifugation of the cardiac tissue homogenate at 800g for 15 min in a Sorvall RT 6000 refrigerated centrifuge (Du Pont Co., Newtown, Connecticut, USA) and used as a sample for the TAP procedures. Protein concentration in samples was determined using a bicinchoninic acid kit according to the manufacturer's protocol (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA). After adding 100 μL of sample and 300 μL of PBS, BODIPY 581/591 (100 μL) was incorporated into the lipid compartment of the tissue at a final concentration of 2 $\mu\text{mol/L}$ by vortexing gently for 10 s at low speed followed by a 10-min incubation at 37°C . After incubation, 485 μL of cold phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) was added, and it was vortexed gently for 10 s at low speed. The radical initiator, MeO-AMVN (15 μL , final concentration 2 mM), was added into the reaction mixture with gentle mixing using a magnetic stirring bar. External standard curves were obtained by the oxidation kinetics of a control solution in the presence of PC (100 μL). The oxidation of tissue samples was monitored by the green fluorescent oxidation product of BODIPY 581/591 (excitation wavelength = 500 nm, emission wavelength = 520 nm, slit 10 nm) using a microplate reader (Wallac Victor 2, Perkin-Elmer, Boston, Massachusetts, USA). All sample analyses were carried out in triplicate. The results are expressed as TAP values, representing the percentage of inhibition of BODIPY oxidation in the rat left ventricle as compared to that occurring in the external standard samples.^{23,24}

DNA damage

Cardiomyocyte isolation. DNA damage was assessed in cardiomyocytes isolated from the heart (left ventricle wall) fragments according to the methodology previously described by Ferreira et al.²⁵ Briefly, the fragment was incubated with 5.5 mg of proteinase K and 3 mg of collagenase I in 3 mL of HBSS for 30 min at 37°C, and then the cells were suspended into 10 mL of HBSS. The resulting suspension was centrifuged at 93g for 5 min, and the supernatant was discarded.

Comet assay. The alkaline comet assay was performed in order to detect DNA single- and double-strand breaks (SBs), labile sites, and oxidized purines and pyrimidines.²⁶ All procedures were conducted in the dark to minimize spurious sources of DNA damage. Briefly, 15 µL of the cardiomyocyte suspension were embedded into 0.5% low-melting point agarose (Sigma) and spread on agarose-precoated microscope slides. Six slides were prepared for each sample. Slides were immersed overnight in freshly prepared cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% sodium salt *N*-lauryl sarcosine, pH 10.0, with 1% Triton X-100, and 10% freshly added DMSO) at 4°C. After lysing, the slides were washed 3 times in enzyme buffer and then 2 slides for each treatment were incubated at 37°C for 45 min with 100 µL of endo III (1:1000), 100 µL of FPG (1:1000), or enzyme buffer only. Endo III recognizes oxidized pyrimidines, while FPG identifies oxidized purines, especially 8-oxo-guanine. Enzyme buffer only is used to identify SBs. Subsequently, the cells were exposed to alkali buffer (1 mM EDTA and 300 mM sodium hydroxide, pH approximately equal to 13.4), at 4°C, for 40 min to allow DNA unwinding and expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted on the same solution at 4°C for 30 min at 25 V (1 V/cm) and 300 mA. After electrophoresis, the slides were neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), fixed in absolute ethanol, stained with 70 µL Sybr Gold (2:10000), and analyzed in a fluorescent microscope at 40× magnification. Images from 50 nucleoids/animal/type of DNA lesion (from two replicate slides; SBs, oxidized pyrimidines, and oxidized purines) were scored using the comet assay II image system (Perceptive Instruments, Haverhill, Suffolk, UK). Tail intensity (percentage of DNA in the tail) was used to estimate the extent of DNA damage. Human lymphocytes treated with hydrogen peroxide (100 µM) were used as the electrophoresis positive control.

Table 1. Effect of a single dose of DOX ((4 mg/kg body weight) on the rat heart) on rat myocardium histological changes.^a

Moments	Necrosis	Disarrangement
−24h	1.00 (1.00–1.00) ⁽⁸⁾	1.00 (1.00–1.00) ⁽⁸⁾
+24h	2.50 (2.00–3.00) ^{(8),b}	2.50 (2.00–3.00) ^{(8),c}

DOX: doxorubicin; ⁿ): sample number.

^aValues are medians (25–75 percentiles); moments: −24 h (before) and +24 h (after) injection; Mann–Whitney rank sum test was used for comparisons between moments.

^b $p < 0.001$: different from −24 h.

^c $p = 0.002$: different from −24 h.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SE and median (25–75 percentile) for data with normal and nonnormal distributions, respectively. In the acute study, the significance of differences was calculated by *t* test or Mann–Whitney rank sum test. While in the chronological study, one-way analysis of variance complemented by all pairwise multiple comparison procedures was used. Myofibrillar necrosis and disarrangement were treated with Kruskal–Wallis one-way analysis of variance on ranks complemented by all pairwise multiple comparison procedures. Linear regression procedures were used to study the associations between variables in the chronological study. The data were analyzed using SigmaStat version 3.5 software (Systat Software, Point Richmond, California, USA). Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Acute effect of a single dose of DOX on cardiac histology, DNA damage, TAP, and body weight

A single dose of DOX caused impairment in several variables at +24 h when compared with −24 h. In detail, increase in myofibrillar necrosis ($p < 0.001$) and in myofibrillar disarrangement ($p = 0.002$) were verified (Table 1). Increase in DNA damage (DNA SBs, $p < 0.001$ and oxidized pyrimidines, $p = 0.002$) and decrease in TAP ($p = 0.010$) were identified (Figure 2). No relevant inflammatory infiltrate was seen in myocardium, and no significant changes were observed in body weight (in grams; 412.00 (378.00–436.50) vs. 401.50 (342.50–428.50), $p > 0.05$), as well as in clinical and necropsy findings. None of the animals died during this experimental protocol.

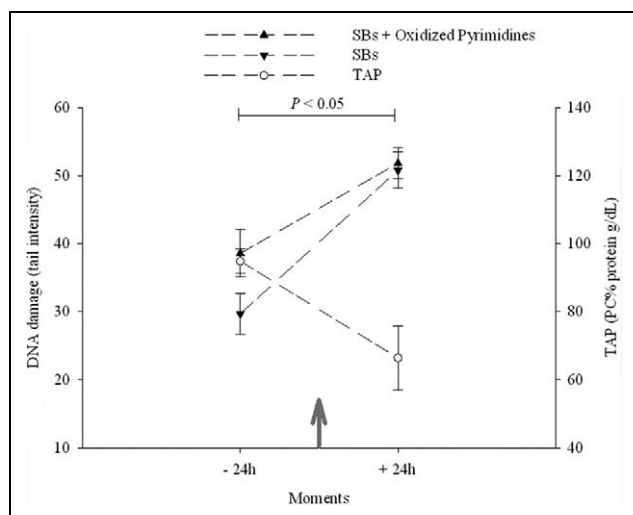


Figure 2. Effect of a single dose of DOX (4 mg/kg body weight) on the rat heart. Data are expressed as means \pm SE; \uparrow : DOX IP injection; moments: -24 h (before) and +24 h (after) injection; data obtained at -24 h ($n = 8$) and at +24 h ($n = 8$) were analyzed for DNA SBs and TAP with PC as the standard. Mann-Whitney rank sum test (for DNA damage) or *t* test (for TAP) were used to compare the moments, * $p < 0.05$: difference between moments. DOX: doxorubicin; SBs: strand breaks; TAP: total antioxidant performance; IP: intra-peritoneal; PC: phosphatidylcholine.

Chronological effect of multiple DOX doses on general changes

Figure 3 shows the relationship between variables and moments after treatment with multiple doses of DOX. Progressive deleterious clinical signs (general status, physical activity, hair brightness, and hair losses) were associated with the increasing doses of DOX therapy. Most animals (>86%) exhibited those clinical changes from M_3 . Animal weight (mean \pm SE sample number, in grams) significantly decreased (Tukey's test, $p < 0.05$) over time (M_4 (300.91 ± 11.08^8) $< M_0$ (409.88 ± 16.42^8), M_1 (395.38 ± 20.44^8), M_2 (377.13 ± 18.09^8) and M_3 (337.88 ± 18.88^8) $< M_0, M_1$). Linear regression showed that body weight was inversely associated with time ($R = -0.99$, $p = 0.011$), suggesting a progressive weight loss as additional doses of DOX were administered (Figure 3(a)). At necropsy, all the animals displayed evident and progressive cardiac softness, pericardium/myocardium adherence, and accumulation of serous fluid in the pericardial, pleural, and peritoneal cavities from M_2 (1 week after second DOX dose). Besides bilateral kidney pale, adherence among hepatic lobes and peritoneal organs (liver, stomach, and spleen)

at M_4 were noted. The mortality rate was 31% ($n = 18/58$) in the chronological protocol. Deaths occurred between M_1 and M_2 ($n = 6$), M_2 and M_3 ($n = 5$), and M_3 and M_4 ($n = 7$).

Chronological effect of multiple doses of DOX on cardiac histology

The treatment with DOX was associated with a progressive histological cardiomyocyte injury (Table 2). The lesions were multifocal and were characterized by myofibrils with progressive hyalinization, disarrangement, fragmentation, rarefaction, morphology alteration (increased volume followed by decreased volume, retraction, and culminating with nuclei absence), and staining tone variation of the nuclei (hyperchromatic followed by pale). In addition, it was verified that myofibrillar paired nuclei in M_3 and M_4 , suggesting atrophy. Necrosis was positively associated with time (M_1, M_2, M_3 , and M_4) in treated animals ($R = 1.00$, $p = 0.004$), suggesting a progressive increase as additional doses of DOX were administered (Figure 3(b)). No relevant inflammatory infiltrate was identified in myocardium.

Chronological effect of multiple doses of DOX on cardiac TAP

Figure 4 shows the results of the TAP assay in the myocardium from animals treated with (M_1, M_2, M_3 , and M_4) or without (M_0) DOX. No significant decrease in the mean TAP values (adjusted for cardiac tissue protein concentrations and not for tissue weight) was detected between M_0 and M_1 (data not shown), but significant increase ($p = 0.006$) was observed from M_1 ($M_0 < M_4, M_1 < M_2, M_3, M_4$). Linear regression in treated animals showed that TAP was positively ($R = 0.95$, $p = 0.049$) associated with time (M_1, M_2, M_3 , and M_4), suggesting a progressive increase as additional doses of DOX were administered (Figure 3(c)).

Chronological effect of multiple doses of DOX on DNA

Overall, decreased DNA SBs and oxidized purines and pyrimidines were detected from the second and third DOX doses, respectively. A marked increase in DNA SBs was identified between M_0 and M_1 ($M_1 > M_0$), which was followed by significant decreases ($M_2, M_3, M_4 < M_1, M_3, M_4 < M_2$) after additional doses of DOX (Figure 5(a)). These findings

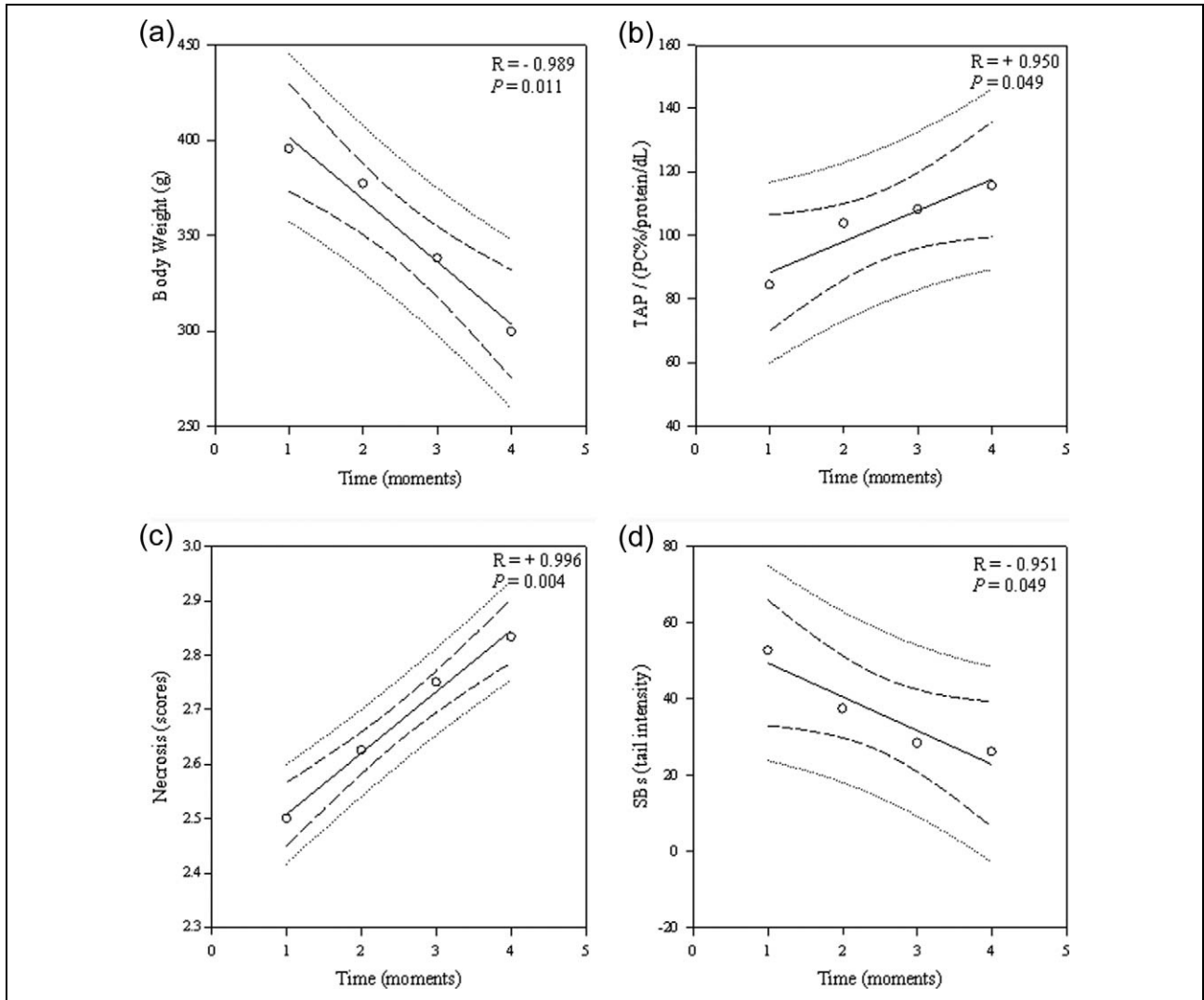


Figure 3. Associations between variables and moments after treatment with multiple doses of DOX. Data are expressed as means \pm SE; moments: M₁ (1 week after first injection); M₂ (1 week after second injection); M₃ (1 week after third injection); and M₄ (1 week after fourth injection). Data were analyzed for DNA SBs and TAP. Linear regression was used to examine the association between variables (body weight (a), myofibrillar necrosis (b), TAP (c), and DNA damage SBs (d)) and moments in treated animals. DOX: doxorubicin; TAP: total antioxidant performance; SBs: strand breaks.

may partially suggest a progressive attenuation of DNA damage from the first DOX dose. When SBs and oxidized purines were considered together, decreased DNA damage was observed at M₁ (M₁ < M₀), M₃ (M₃ < M₀, M₂), and M₄ (M₄ < M₀, M₁, M₂). Additionally, an increase was also detected between M₁ and M₂ (Figure 5(b)). When DNA damage was assessed by SBs and oxidized pyrimidines, similar behavior was verified, although comparisons among moments have shown differences (M₄ < M₁, M₂, M₃; Figure 5(c)). Linearity in regression of treated animals demonstrated significant inverse association between time (M₁, M₂, M₃, and M₄) and DNA

damage only when SBs were evaluated ($R = -0.95$, $p = 0.049$; Figure 3(d)). No significant association was detected for the other type of DNA damage (oxidized purines and pyrimidines).

Associations between variables

In DOX-treated animals, necrosis was negatively associated with body weight ($R = -0.98$, $p = 0.024$; Figure 6(a)), and DNA SBs ($R = -0.97$, $p = 0.027$) was also identified (Figure 6(b)). Necrosis was positively associated with TAP ($R = +0.96$, $p = 0.039$; Figure 6(c)). TAP was negatively associated

Table 2. Chronological effect of multiple doses of DOX (4 mg/kg body-weight/week/4 weeks) on rat myocardium histological changes.^a

Moments	Necrosis	Disarrangement
M ₀	1.00 (1.00–1.00) ⁽⁸⁾	1.00 (1.00–1.00) ⁽⁸⁾
M ₁	2.50 (2.00–3.00) ^{(8),b}	2.50 (2.00–3.00) ^{(8),b}
M ₂	3.00 (2.00–3.00) ^{(8),b}	2.50 (2.00–3.00) ^{(8),b}
M ₃	3.00 (2.50–3.00) ^{(8),b}	2.00 (2.00–3.00) ^{(8),b}
M ₄	3.00 (3.00–3.00) ^{(6),b}	2.00 (2.00–3.00) ^{(6),b}

DOX: doxorubicin; M₀: before first injection; M₁: 1 week after first injection; M₂: 1 week after second injection; M₃: 1 week after third injection; M₄: 1 week after fourth injection; ⁽ⁿ⁾: sample number; ANOVA: analysis of variance.

^aValues are medians (25–75 percentiles). One-way ANOVA on ranks (Kruskal–Wallis one-way ANOVA on ranks) complemented by Duncan's method was used for comparisons among moments.

^b $p < 0.001$: different from M₀.

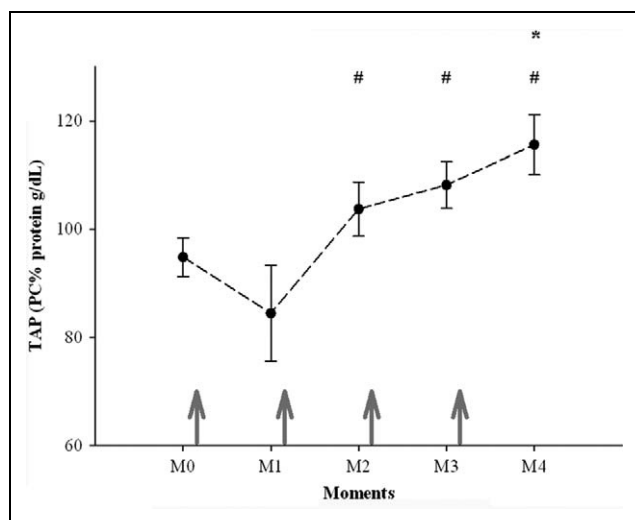


Figure 4. Chronological effect of multiple doses of DOX (4 mg/kg body weight/week/4 weeks) on rat heart TAP. Data are expressed as means \pm SE; \uparrow : DOX injection (4 mg/kg body weight). Moments: M₀ (before first injection; $n = 7$); M₁ (1 week after first injection; $n = 7$); M₂ (1 week after second injection; $n = 8$); M₃ (1 week after third injection; $n = 8$); and M₄ (1 week after fourth injection; $n = 8$). Data were analyzed for TAP and PC was used as the standard. One-way ANOVA complemented by Duncan's method was used to compare moments, $*p = 0.006$: different from M₀; $\# p = 0.006$: different from M₁. TAP: total antioxidant performance; PC: phosphatidylcholine; DOX: doxorubicin; ANOVA: analysis of variance.

with DNA damage (SBs; $R = -0.98$, $p = 0.018$; Figure 6(d)). Oxidized purine was positively associated with oxidized pyrimidine ($R = 0.97$, $p = 0.027$). No

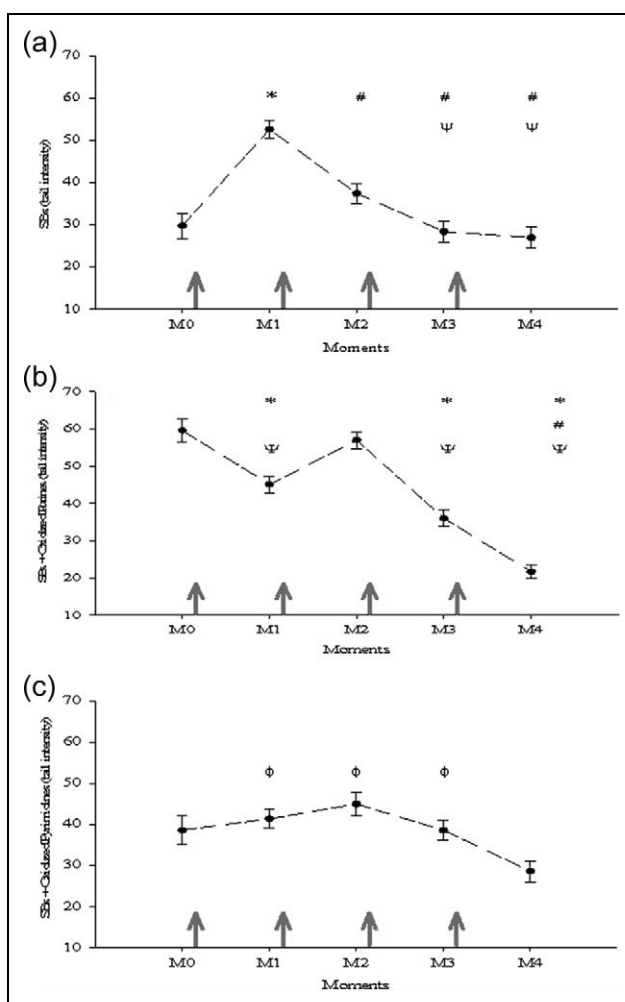


Figure 5. Chronological effect of multiple doses of DOX (4 mg/kg body weight/week/4 weeks) on DNA damage (tail intensity). Data are expressed as means \pm SE; \uparrow : DOX injection (4 mg/kg body weight); moments: M₀ (before first injection; 250 nucleoids, $n = 2$); M₁ (1 week after first injection; 450 nucleoids, $n = 3$); M₂ (1 week after second injection; 375 nucleoids, $n = 3$); M₃ (1 week after third injection; 425 nucleoids, $n = 3$); and M₄ (1 week after fourth injection; 384 nucleoids, $n = 3$). Data were analyzed for DNA SBs. One-way ANOVA complemented by Duncan's method was used to compare moments, $*p < 0.001$: different from M₀; $\# p < 0.001$: different from M₁; $\psi p < 0.001$: different from M₂; $\theta p < 0.001$: different from M₄. DNA damage SBs (a), DNA damage SBs + oxidized purines (b), DNA damage SBs + oxidized pyrimidines (c). DOX: doxorubicin; SBs: strand breaks; ANOVA: analysis of variance.

associations were identified between necrosis versus DNA-oxidized purine ($R = -0.80$, $p > 0.05$) and pyrimidine ($R = -0.78$, $p > 0.05$) and between TAP versus oxidized purine ($R = -0.561$, $p > 0.05$) and pyrimidine ($R = -0.618$, $p > 0.05$).

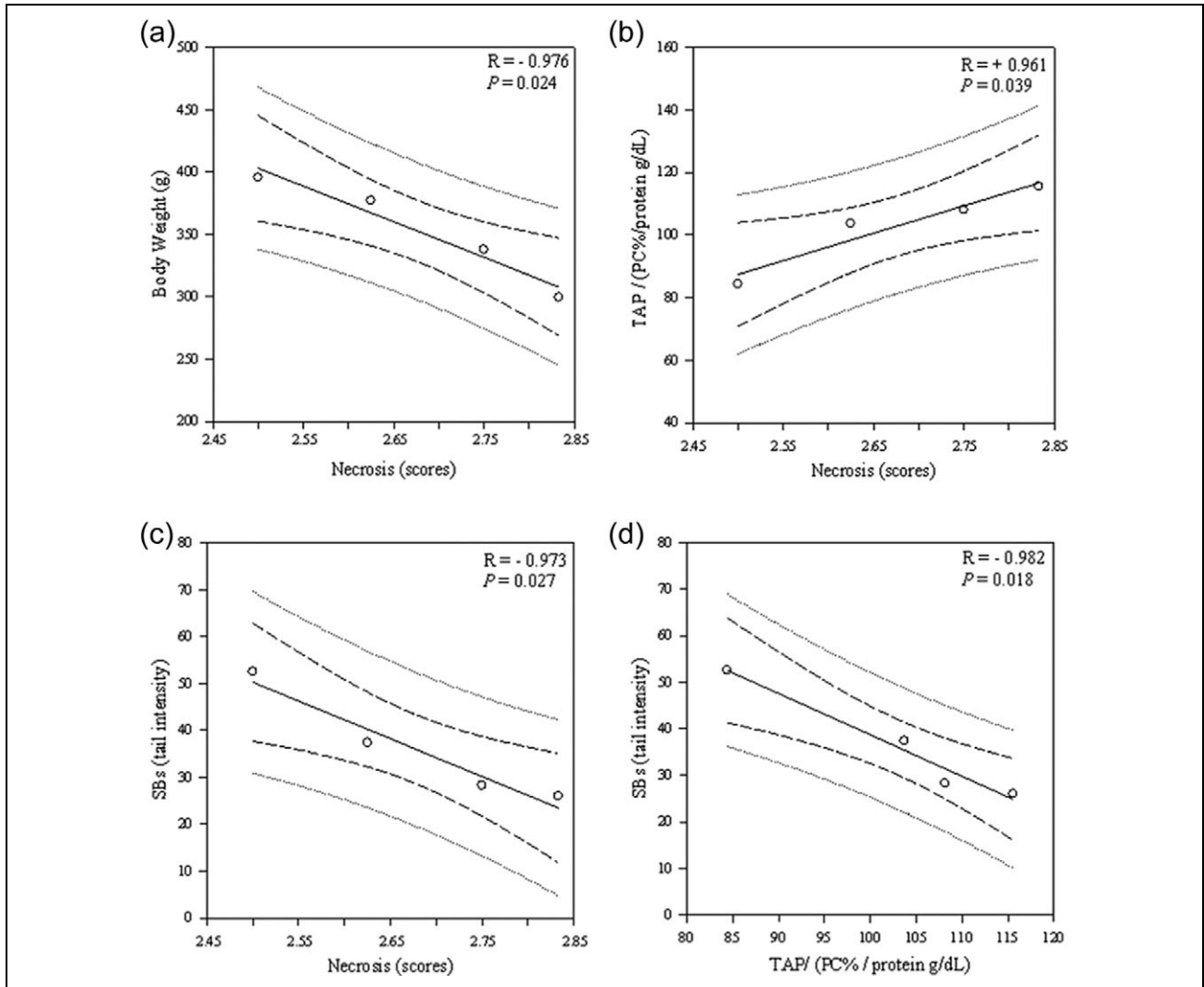


Figure 6. Associations between variables after treatment with multiple doses of doxorubicin. Data are expressed as means \pm SE; each plot represents moments: M1 (1 week after first injection); M2 (1 week after second injection); M3 (1 week after third injection); M4 (1 week after fourth injection). Linear regression was used to examine the association between variables (necrosis vs. body weight (a), SBs (b), TAP (c); TAP vs. SBs (d)) in treated animals. DOX: doxorubicin; SBs: strand breaks; TAP: total antioxidant performance.

Discussion

Our results showed that single dose of DOX was related with increased cardiac disarrangement, necrosis, and DNA damage, including oxidized pyrimidines and with decreased TAP. While, the chronological effect of multiple DOX doses was associated with progressive and deleterious general signs (clinical, body weight, and necropsy data). Linear regression analysis also showed progressive worsening of cardiac necrosis, enhanced TAP, and decrease in DNA damage. Associations between several variables also were identified when using multiple DOX doses. DNA damage was inversely associated with TAP, while necrosis was

negatively associated with DNA damage and body weight and positively associated with TAP.

The mechanism of DOX-induced cardiotoxicity still remains unclear. Several hypotheses have been postulated, including the generation of ROS.²⁷ However, ROS-induced cardiotoxicity has not been confirmed and different mechanisms may be involved in acute toxicity versus chronic toxicity. Numerous studies have used DOX regimes in which animals are treated with a single and extremely high anthracycline dose. Therefore, the outcomes from these studies must be cautiously interpreted. Also, depending on the protocol study, there are risks of oversimplification and

of inappropriately mixing acute and chronic cardiotoxic effects.¹ In fact, a number of studies using antioxidant supplements, such as vitamin E,^{28–30} *N*-acetylcysteine,³¹ iron chelator,³² and polyphenol³³ has failed to show a protective effect on chronic cardiomyopathy.

We have previously observed that lycopene did not improve left ventricular dysfunction induced by DOX treatment in an early chronic protocol (16 mg/kg body weight, fractionated doses).¹⁹ Interestingly, we have identified that DOX prevented the lycopene metabolism and enhanced total antioxidant capacity in the rat heart 1 week after the end of treatment with multiple DOX doses, suggesting an antioxidant function of DOX under chronic treatment.¹⁷ As it is well known that the cardiomyopathy induced by DOX is exponentially dose dependent,^{34,35} it would be important to figure out whether the antioxidant role of DOX suggested in the past¹⁷ is also dose dependent. This answer would be especially contributory for new therapy strategies in patients undergoing chemotherapy with DOX.

In the current study, animals received a cumulative dose of 16 mg/kg body weight (4 doses of 4 mg/kg body weight), which was equivalent to 500 mg/m² of DOX in a 50-kg human being.³⁶ The study design mimics clinical situations in which multiple doses of anthracycline are given to patients. It is important to underline that this protocol was chosen to evaluate the acute effect of a single dose of DOX and also the kinetic behavior of multiple doses on the heart.

The occurrence of cardiac disorders caused by DOX was monitored by several toxic end points (clinical features, necropsy findings, histology, TAP, and DNA damage). To determine the DOX acute effect on heart, animals were killed before (–24 h) and after (+24 h) a single dose (4 mg/kg body weight). To determine the chronological effect of multiple doses of DOX, rats received the drug dose (4 mg/kg body weight) once a week for 4 weeks and were killed before the 1st injection (M₀) and 1 week after each injection (M₁, M₂, M₃, and M₄).

Acute effect of DOX

After 24 h of a DOX single dose, decrease in TAP values and increase in myofibrillar necrosis, myofibrillar disarrangement, and DNA damage (DNA SBs and DNA SBs + oxidized pyrimidines) were identified. Nevertheless, no obits and no changes in body weight, or clinical signs and necropsy findings were observed. Similar results have been found in previous studies using a single dose of DOX.

Earlier cardiac myocytes necrosis has been detected in cell cultures 7 h after DOX exposure (0.5 µg/mL)³⁷ and in Wistar rats, 48 h after DOX treatment (25 mg/kg body weight).³⁸ Other studies have shown myofibrillar disarrangement³⁸ and decreased cardiac hydrophilic antioxidant defense (glutathione,³⁹ catalase,⁴⁰ superoxide dismutase, and glutathione peroxidase^{40,41}), after the first,³⁹ second,⁴¹ or third⁴⁰ day of DOX injection in rodents. Clinical study identified significant reduction of plasma total hydrophilic antioxidant defense (TRAP, peroxy radical-trapping antioxidant) at 8 h after the first adriamycin infusion in patients.⁴²

Increased DNA damage, including oxidized pyrimidines and purines, has been detected in H9c2 cardiac myocytes treated with DOX (0.5 µg/mL) for 4 h, suggesting that DNA damage occurs early in the DOX cardiotoxicity.⁴³ Additionally, it has been reported that the overexpression of glutathione transferase (α 4-isoform) in H9c2 cardiac myocytes eliminated oxidative stress induced by DOX (0.5 µg/mL for 7 h) but did not abolish the total and apoptotic cell death. Taken together, all these data reinforce oxidative stress as an important mechanism but not the exclusive mediator of cardiac myocyte death induced by acute DOX treatment.³⁷

Chronological effect of multiple DOX doses

It is well known that the dose dependency of cardiotoxicity is induced by anthracyclines.^{34,35} However, few studies have chronologically followed the drug's effect on cardiac damage. The damage was monitored over time for body weight,^{44,45} echocardiogram,^{46,47} cardiomyocyte histology,⁴⁸ and oxidative stress markers (cardiac malondialdehyde, superoxide anion,⁴⁴ and hydrophilic individual antioxidant components⁴⁹). On the other hand, to our knowledge, no study has ever chronologically monitored the *in vivo* effect of multiple DOX doses on cardiac DNA damage (using comet assay) or total antioxidant defense (using TAP).

Here, we detected progressive deleterious clinical signs (general status, physical activity, hair brightness, and hair losses) associated with increased DOX therapy. Most animals (>86%) exhibited those clinical changes from M₃. Similarly, lethargy^{20,50} and progressive decrease in body weight^{19,25,44,45} were observed in rats treated with multiple doses of DOX. Our findings of necropsy are also in accordance with those observed in rabbits treated with adriamycin (2.2

mg/kg body weight/week/10 weeks).⁴⁸ The progressive rise in cardiac myofibrillar necrosis observed with increasing DOX dosage is in accordance with a previous study that examined the effect of adriamycin (1.1 mg/kg body weight twice weekly for 10 weeks) on the hearts of rabbits at three different time points.⁴⁸ The mortality rate (31%) is consistent with other reports.^{21,51,52}

With regard to TAP, our data demonstrated that, *in vivo*, cardiac defense rises with increasing DOX dose. This finding is confirmed by our previous *in vitro* study that showed antioxidant activity of DOX increases in a dose-dependent manner (1, 2, 4, and 8 μ M).¹⁷ Various studies have evaluated the effect of multiple doses of DOX on individual components of the cardiac antioxidant system at only one time moment, and no changes in rodent superoxide dismutase^{35,49} and catalase^{35,53} activities have been found. However, increased catalase activity has also been described.⁵⁴

An important aspect to be mentioned is the fact that few studies have evaluated the chronological effect of DOX multiple doses on the antioxidant system. In addition, those few studies have reported antioxidant system hydrophilic components only. Cardiac glutathione peroxidase and manganese-superoxide dismutase activities were decreased at 1 and 2 h after the last injection in rats that received fractionated adriamycin doses (cumulative dose, 15 mg/kg body weight).⁴⁹ However, these results should be viewed cautiously since the moments (1 and 2 h) analyzed may represent a transient acute effect of the last drug injection. No linear relationship between hydrophilic antioxidant and the number of adriamycin injections have been found in rabbits (cardiac total glutathione, reduced glutathione, and glutathione peroxidase)⁴⁸ and in humans (plasma TRAP).⁴² The differences between this and previous studies may be due to the methodology used. We adopted the TAP assay that measures antioxidant capacity in both the hydrophilic and lipophilic compartments. Additionally, the TAP assay allows evaluation of the interaction between the antioxidants in the two compartments⁵⁵ against oxidative stress.

A decrease in cardiomyocyte DNA SBs and oxidized purines and pyrimidines were currently detected after the second and 3rd DOX injections, respectively. Using the same DOX protocol (fractionated doses), we have previously reported similar levels of DNA damage (SBs, SBs + oxidized purines, and SBs + oxidized pyrimidines) in rat heart cells at M_4 .²⁵ The progressive attenuation of damage verified

in cardiomyocytes *in vivo* was also observed in peripheral blood lymphocytes in healthy adult humans after *in vitro* treatments with DOX at 0.25, 0.5, 0.75, and 1 μ M.⁵⁶ Similar data were also found in human breast adenocarcinoma cell lines treated with adriamycin. According to the authors, this effect might be due to the induction of both DNA SBs and cross-links.⁵⁷ On the other hand, marked increase of DNA damage (SBs) was presently identified between M_0 and M_1 ($M_1 > M_0$), after a single dose of DOX. This result is in agreement with other studies that have shown increased DNA damage *in vitro* (normal cell incubation)⁵⁶ and *in vivo* (cancer patients)⁵⁸ after DOX treatment.

Our study also showed identifying associations between some variables in animals treated with multiple doses of DOX. Necrosis was progressive and negatively associated with body weight and DNA damage, and positively with TAP, indicating that oxidative stress is not a determinant mechanism for the necrosis induced by multiple doses of DOX. Furthermore, TAP was negatively associated with DNA damage, suggesting that the progressive DNA damage attenuation is related with the total antioxidant defense improvement. This last result could be explained in part by the antioxidant effect of multiple doses of DOX, as previously shown by our group.¹⁷ These results suggest that the progressive cardiomyofibrillar necrosis and weight loss induced by multiple DOX doses occur despite the gradual DNA damage attenuation and the total antioxidant defense increase.

In conclusion, our study showed that (1) single dose of DOX was associated with augmented cardiac disarrangement, necrosis, and DNA damage, including oxidized pyrimidines, and with diminished TAP; (2) the chronological effect of multiple DOX doses was associated with progressive and deleterious general signs (clinical, body weight, and necropsy data). Linear regression analysis also showed gradual worsening of cardiac necrosis, gradual increase in TAP, and decrease in DNA damage. Moreover, DNA damage was inversely associated with TAP, while necrosis was negatively associated with DNA damage and body weight and positively associated with TAP.

Taken together, our data indicated that the oxidative stress mechanism is an early event in the DOX-induced cardiotoxicity. Additionally, the results demonstrated that the cardiomyocyte injury induced by multiple DOX doses occurred despite DNA damage attenuation and the total antioxidant defense

increase. Therefore, it is highly probable that cardiotoxicity induced by multiple DOX doses is not related to an oxidative stress mechanism. Although the experimental design using single and multiple doses of DOX mimics clinical situations, it would be imprudent to extrapolate the current results to humans. However, the present study represents a contribution to our understanding of the myocardium damage mechanism in acute and chronic DOX treatment. Further studies are needed to confirm that different mechanisms may be involved in acute versus chronic cardiotoxicity induced by DOX. Moreover, chronological evaluations should be considered while studying chronic cardiotoxicity.

Acknowledgments

We appreciate Barbara B Golner's editing of the English grammar. We thank Alexandre L Loureiro, Corina Correa, Elenize Jamas Pereira, Jose A Souza, Jose C Georgete, Jian Qin, Mario A Dallaqua, Mario B Bruno, Rogerio A Monteiro, Sandra A Fábio, Sueli Clara, and Vitor M Souza for their technical help during this study.

Funding

The present study was financially supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil (FAPESP # 2007/07455-2), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq PQ-II # 302293/2012-4), by Pro-Reitoria de Pesquisa UNESP, São Paulo, Brazil, and by a grant from the U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (# 58-1950-7-0707). Any opinions, findings, conclusion, or recommendations expressed in this publication are those of the authors and do not necessarily reflect the view of the funders.

References

1. Simunek T, Stirba M, Popelova O, Adamcova M, Hrdina R and Gers V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 1734–1140.
2. Buja LM, Ferrans VJ, Mayer RJ, Roberts WC and Henderson ES. Cardiac ultrastructural changes induced by daunorubicin therapy. *Cancer* 1973; 32: 771–788.
3. Smith LA, Cornelius VR, Plummer CJ, Levitt G, Verrill M, Canney P, et al. Cardiotoxicity of anthracycline agents for the treatment of cancer: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMC Canc* 2010; 10: 337.
4. Swain SM, Whaley FS and Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer* 2003; 97: 2869–2879.
5. Li T, Danelisen I and Singal PK. Early changes in myocardial antioxidant enzymes in rats treated with adriamycin. *Mol Cell Biochem* 2002; 232: 19–26.
6. Lee V, Randhawa AK and Singal PK. Adriamycin-induced myocardial dysfunction in vitro is mediated by free radicals. *Am J Physiol* 1991; 261: H989–H995.
7. Menna P, Salvatorelli E and Minotti G. Anthracycline degradation in cardiomyocytes: a journey to oxidative survival. *Chem Res Toxicol* 2010; 23: 6–10.
8. Zhao Y, McLaughlin D, Robinson E, Harvey AP, Hookham MB, Shah AM, et al. Nox2 NADPH oxidase promotes pathologic cardiac remodeling associated with doxorubicin chemotherapy. *Canc Res* 2010; 70: 9287–9297.
9. Wahab MHA, Akoul EEMS and Abdelaziz AH. Modulatory effects of melatonin and vitamin-E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. *Tumori* 2000; 86: 157–162.
10. Antunes LM and Takahashi CS. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutat Res* 1998; 419: 137–143.
11. Vile GF and Winterbourn CC. Inhibition of adriamycin-promoted microsomal lipid peroxidation by beta-carotene, alpha-tocopherol and retinol at high and low oxygen partial pressures. *FEBS Lett* 1988; 238: 353–356.
12. Teicher BA, Schwartz JL, Holden SA, Ara G and Northey D. In vivo modulation of several anticancer agents by beta-carotene. *Canc Chemother Pharmacol* 1994; 34: 235–241.
13. van Acker FA, Hulshof JW, Haenen GR, Menge WM, van der Vijgh WJ and Bast A. New synthetic flavonoids as potent protectors against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 31–37.
14. Kishi T, Takahasi K, Mayumi T and Hama T. Protective effect of Coenzyme Q on adriamycin toxicity in beating heart cells. In: Folkers K and Yamamura Y (eds) *Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1984, pp. 181–188.
15. Judy WV, Hall JM, Dugan W, Toth PD and Folkers K. Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q. In: Folkers K and Yamamura Y (eds) *Biomedical and clinical aspects of coenzyme Q*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1984, pp. 231–240.
16. Corna G, Santambrogio P, Minotti G and Cairo G. Doxorubicin paradoxically protects cardiomyocytes against iron-mediated toxicity: role of reactive oxygen

- species and ferritin. *J Biol Chem* 2004; 279: 13738–13745.
17. Ferreira ALA, Yeum K-J, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, et al. Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 740–751.
 18. Minotti G, Mancuso C, Frustaci A, Mordente A, Santini SA, Calafiore AM, et al. Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin. Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. *J Clin Invest* 1996; 98: 650–661.
 19. Ferreira ALA, Russell RM, Rocha N, Ladeira MSP, Salvadori DMS, Nascimento MCMO, et al. Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological, and morphometrical assessment. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007; 101: 16–24.
 20. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA and Singal PK. Probuco protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation* 1995; 91: 10–15.
 21. Danelisen I, Palace V, Lou H and Singal PK. Maintenance of myocardial levels of vitamin A in heart failure due to adriamycin. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 789–795.
 22. Nascimento MCM, Matsubara BB, Matsubara LS, Correa CR, Pereira EJ, Moreira PL, et al. Pharmacological dose of alpha-tocopherol induces cardiotoxicity in Wistar rats determined by echocardiography and histology. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30: 1540–1548.
 23. Beretta G, Aldini G, Facino RM, Russell RM, Krinsky NI and Yeum KJ. Total antioxidant performance: a validated fluorescence assay for the measurement of plasma oxidizability. *Anal Biochem* 2006; 354: 290–298.
 24. Aldini G, Yeum K, Russell RM and Krinsky NI. A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1043–1050.
 25. Ferreira ALA, Salvadori DMF, Nascimento MCMO, Rocha NS, Correa CR, Pereira EJ, et al. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutat Res* 2007; 631: 26–35.
 26. Collins AR, Raslova K, Somorovska M, Petrovska H, Ondrusova A, Vohnout B, et al. DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 373–377.
 27. Singal PK, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Thomas TP and Li. T Combination therapy with probucon prevents adriamycin-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1055–1063.
 28. Van Vleet JF, Ferrans VJ and Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol* 1980; 99: 13–42.
 29. Breed JG, Zimmerman AN, Dormans JA and Pinedo HM. Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Canc Res* 1980; 40: 2033–2038.
 30. Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, et al. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1982; 393: 411–418.
 31. Myers C, Bonow R, Palmeri S, Jenkins J, Corden B, Locker G, et al. A randomized controlled trial assessing the prevention of doxorubicin cardiomyopathy by N-acetylcysteine. *Semin Oncol* 1983; 10: 53–55.
 32. Lopez M, Vici P, Di Lauro K, Conti F, Paoletti G, Ferraironi A, et al. Randomized prospective clinical trial of high-dose epirubicin and dexrazoxane in patients with advanced breast cancer and soft tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 1998; 16: 86–92.
 33. Bruynzeel AM, Vormer-Bonne S, Bast A, Niessen HW and van der Vijgh WJ. Long-term effects of 7-mono hydroxyethylrutoside (monoHER) on DOX-induced cardiotoxicity in mice. *Canc Chemother Pharmacol* 2007; 60: 509–514.
 34. Deepa PR and Varalakshmi P. 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* 2006; 217: 176–183.
 35. Li T, Danelisen I, Belló-Klein A and Singal PK. Effects of probucon on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Cardiovasc Res* 2000; 46: 523–530.
 36. Hiroe M, Ohta Y, Fujita N, Nagata M, Toyozaki T, Kusakabe K, et al. Myocardial uptake of ¹¹¹In monoclonal antimyosin Fab in detecting doxorubicin cardiotoxicity in rats. Morphological and hemodynamic findings. *Circulation* 1992; 86: 1965–1972.
 37. L'Ecuyer T, Allebban Z, Thomas R and Vander Heide R. Glutathione S-transferase overexpression protects against anthracycline-induced H9C2 cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H2057–H2064.
 38. Saad SY, Najjar TA and Al-Rikabi AC. The preventive role of deferroxamine against acute doxorubicin-induced cardiac, renal and hepatic toxicity in rats. *Pharmacol Res* 2001; 43: 211–218.

39. Bommu P, Nanjan CMJ, Joghee NM, Muthureddy Nataraj SM and Bhojraj S. Phyllanthus maderaspatensis, a dietary supplement for the amelioration of adriamycin-induced toxicity and oxidative stress in mice. *J Nat Med* 2008; 62: 149–154.
40. Vijay T, Rajan D, Sarumathy K, Palani S and Sakthivel K. Cardioprotective, antioxidant activities and phytochemical analysis by GC-MS of Gmelina arborea (GA) in Doxorubicin-induced myocardial necrosis in Albino rats. *J App Pharm Sci* 2011; 1: 198–204.
41. Xin Y-F, Wan L-L, Peng J-L and Guo C. Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by Lycium barbarum polysaccharides through the suppression of oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 259–264.
42. Erhola M, Kellokumpu-Lehtinen P, Metsa-Ketela T, Alanko K and Nieminen MM. Effects of anthracyclin-based chemotherapy on total plasma antioxidant capacity in small cell lung cancer patients. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 383–390.
43. L'Ecuyer T, Sanjeev S, Thomas R, Novak R, Das L, Campbell W, et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H1273–H1280.
44. Ghibu S, Delemasure S, Richard C, Guiland JC, Martin L, Gambert S, et al. General oxidative stress during doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: absence of cardioprotection and low antioxidant efficiency of alpha-lipoic acid. *Biochimie* 2012; 94: 932–939.
45. Paiva MG, Petrilli AS, Moisés VA, Macedo CRD, Tanaka C and Campos O. Cardioprotective effect of dexrazoxane during treatment with doxorubicin: a study using low-dose dobutamine stress echocardiography†. *Pediatr Blood Canc* 2005; 45: 902–908.
46. Popelova O, Sterba M, Haskova P, Simunek T, Hroch M, Guncova I, et al. Dexrazoxane-afforded protection against chronic anthracycline cardiotoxicity in vivo: effective rescue of cardiomyocytes from apoptotic cell death. *Br J Canc* 2009; 101: 792–802.
47. Teraoka K, Hirano M, Yamaguchi K and Yamashina A. Progressive cardiac dysfunction in adriamycin-induced cardiomyopathy rats. *Eur J Heart Fail* 2000; 2: 373–378.
48. Jackson JA, Reeves JP, Muntz KH, Kruk D, Prough RA, Willerson JT, et al. Evaluation of free radical effects and catecholamine alterations in adriamycin cardiotoxicity. *Am J Pathol* 1984; 117: 140–153.
49. Li T and Singal PK. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation* 2000; 102: 2105–2110.
50. Rabelo E, De Angelis K, Bock P, Fernandes TG, Cervo F, Klein AB, et al. Baroreflex sensitivity and oxidative stress in adriamycin-induced heart failure. *Hypertension* 2001; 38: 576–580.
51. Abdel-aleem S, el-Merzabani MM, Sayed-Ahmed M, Taylor DA and Lowe JE. Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 789–797.
52. Matsui H, Morishima I, Numaguchi Y, Toki Y, Okumura K and Hayakawa T. Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sci* 1999; 65: 1265–1274.
53. Kang YJ, Sun X, Chen Y and Zhou Z. Inhibition of doxorubicin chronic toxicity in catalase-overexpressing transgenic mouse hearts. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1–6.
54. Robison TW, Giri SN and Wilson DW. Effects of chronic administration of doxorubicin on myocardial creatine phosphokinase and antioxidant defenses and levels of lipid peroxidation in tissues and plasma of rats. *J Biochem Toxicol* 1989; 4: 87–94.
55. Yeum K-J, Beretta G, Krinsky NI, Russell RM and Aldini G. Synergistic interactions of antioxidant nutrients in a biological model system. *Nutrition* 2009; 25: 839–846.
56. Wysokinski D, Blasiak J and Wozniak K. Zinc differentially modulates DNA damage induced by anthracyclines in normal and cancer cells. *Exp Oncol* 2012; 34: 327–331.
57. Cullinane C, Cutts SM, Panousis C and Phillips DR. Interstrand cross-linking by adriamycin in nuclear and mitochondrial DNA of MCF-7 cells. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 1019–1025.
58. Nadin SB, Vargas-Roig LM, Drago G, Ibarra J and Ciocca DR. DNA damage and repair in peripheral blood lymphocytes from healthy individuals and cancer patients: a pilot study on the implications in the clinical response to chemotherapy. *Canc Lett* 2006; 28: 84–97.