

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta tese será disponibilizado
somente a partir de 26/02/2021.



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

Pamela Nayara Modesto

Influência do extrato do chá verde (*Camellia sinensis*) no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos a doxorubicina.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa.Dra. Paula S. Azevedo Gaiolla
Coorientadora: Profa.Dra. Bertha Furlan Polegato

**Botucatu
2019**

Pamela Nayara Modesto

Influência do extrato do chá verde (*Camellia sinensis*) no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos a doxorrubicina.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Paula S. Azevedo Gaiolla
Co-orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Modesto, Pamela Nayara.

Influência do extrato do chá verde (*Camellia sinensis*)
no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos a
doxorubicina / Pamela Nayara Modesto. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Paula S. Azevedo Gaiolla

Coorientador: Bertha Furlan Polegato

Capes: 40101100

1. Chá verde. 2. Cardiotoxicidade. 3. Doxorubicina. 4.
Estresse oxidativo. 5. Metabolismo energético.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade; Chá verde;
Doxorubicina; Estresse oxidativo; Metabolismo Energético.

Dedicatória

A minha mãe, a quem devo tudo o que sou. Obrigada por me mostrar o real sentido da palavra “fé” e por me ensinar com seus exemplos de humildade e amor ao próximo a ser uma pessoa melhor a cada dia. O seu amor me fortalece e me dá segurança para seguir em frente, te amo!

Ao meu pai, uma pessoa simples, mas de coração enorme, sempre me incentivou buscar o melhor e a lutar pelos meus sonhos, obrigada por ser tão presente em minha vida, amo você!

A minha tia Elisabete, que é meu exemplo de vida, de força, esperança e fé! Obrigada por me ensinar a não desistir e estar sempre ao meu lado.

A minha irmã Natalia, minha cúmplice e companheira, que me impulsiona todos os dias com palavras de carinho e apoio. Você é essencial em minha vida!

A minha sobrinha Elisa, que é o amor da minha vida, chegou para trazer ainda mais alegria e amor a nossa família.

Ao meu pai de coração Marcello, que participou de cada momento dessa minha caminhada e não mediu esforços algum para me incentivar e me ajudar no que fosse necessário, muito obrigada por tudo!

Á toda minha família, pela presença e incentivo constante.

*Agradecimentos
especiais*

A Deus,

muita gratidão por ter colocado todos esses sonhos em meu coração e me ensinado a ter fé, me sustentando, me dando forças e sabedoria para busca-los.

À minha orientadora Paula Schmidt Azevedo Gaiolla,

o meu agradecimento especial por me aceitar como sua orientada e ao longo desses anos não me deixar desamparada em nenhum momento. Obrigada por dividir comigo seus ensinamentos, e me ajudar a evoluir a cada dia, sempre com muita paciência e amizade. Sou muito grata pelas oportunidades que você me ofereceu, a você minha gratidão!

Agradecimientos

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por todo suporte financeiro, para que fosse possível a realização desse trabalho.

Professora Bertha Furlan Polegato, obrigada pela co-orientação desse trabalho, por contribuir com suas experiências como excelente pesquisadora, ensinamentos e correções. Suas colaborações foram fundamentais para a evolução desse trabalho, muito obrigada!

Aos professores Sergio Paiva, Leonardo Zornoff e Marcos Ferreira Minicucci agradeço pelos valiosos ensinamentos e contribuições durante o percurso de desenvolvimento do trabalho. É imensa a admiração e respeito que tenho por vocês.

Dra Silmeia Garcia Zanati Bazan e agradeço pela colaboração em realizar o ecocardiograma dos animais e por sua paciência em dividir comigo suas orientações sobre a metodologia do exame. Além disso, agradeço também por tê-la compondo minha banca do exame geral de qualificação, oferecendo sua contribuição científica.

Priscila Portugal dos Santos, que além de colega de laboratório, foi parte indispensável para conclusão desse trabalho. Pri, obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação que tem por todos nós do grupo. Obrigada por simplesmente tudo, te admiro muito como pessoa e excelente profissional que é.

Vickeline Namba Androcioli, que me auxiliou muito com o preparo e leitura das lâminas de imunofluorescência e imunohistoquímica, obrigada pela paciência, pelo carinho e amizade.

Elenize Jamas Pereira desde o início me amparou dentro do laboratório com carinho e amizade e dedicou seu tempo, dividindo comigo toda sua experiência. Obrigada pela sua colaboração, amizade, companheirismo e paciência.

Funcionários do Departamento de Clínica Médica, Alexandre, Bruno, Elisângela, Laura, Mário e Renato, e funcionários da seção de pós-graduação e biblioteca, obrigada por estarem sempre dispostos e disponíveis, e pela contribuição de alguma forma ao longo desses anos.

Queridos amigos, agradeço a cada um de vocês, que de pertinho ou de longe, estavam torcendo por mim. Obrigada pelos momentos de descontração e boas risadas durante todos esses anos e principalmente por entenderem a minha ausência em alguns momentos importantes na vida de vocês. Vocês são muito especiais!

Epígrafe

“Se você pode sonhar, você pode realizar.”

Walt Disney

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doxorubicina (DOX) é um medicamento muito eficaz no tratamento de vários tipos de câncer, mas seu uso em larga escala tem causado preocupação devido à cardiotoxicidade causada pela droga. Não se sabe exatamente quais mecanismos estão envolvidos, mas acredita-se nos papéis centrais da ligação da DOX com a topoisomerase 2- β (Top2- β), que é uma enzima que protege a célula da citotoxicidade e destruição; da interação DOX-ferro gerando espécies reativas de oxigênio; além de disfunção mitocondrial, seguida por muitas outras vias secundárias ativadas por essas primárias, como inflamação e fatores da matriz extracelular (MEC). Por outro lado, o chá verde, uma bebida muito popular em todo o mundo, tem efeitos antioxidantes e antitumorais.

MÉTODOS: Foram utilizados 60 ratos Wistar machos. Estes animais foram divididos em grupos: C=20 (controle) que recebeu ração padrão e administração intraperitoneal de salina, CV=20 (controle + chá verde) que receberam ração adicionada de extrato de chá verde e administração intraperitoneal de solução salina, D=20 (doxorubicina) que recebeu ração padrão e administração intraperitoneal de doxorubicina e DCV=20 (doxorubicina + chá verde) que receberam ração adicionada de extrato de chá verde e administração intraperitoneal de doxorubicina. A ração foi oferecida por 35 dias e no 33º dia a infusão de doxorubicina ou soro fisiológico foi realizada na mesma proporção (20 mg / kg em dose única) e os animais foram eutanasiados 48 horas após a injeção do fármaco. Os ratos foram submetidos ao ecocardiograma para avaliação da morfologia e função cardíacas e foram realizadas análises de atividade enzimática, expressão de proteínas, relacionadas à proteção celular, estresse oxidativo, metabolismo energético, inflamação e MEC. **RESULTADOS:** O estudo ecocardiográfico mostrou que a DOX aumentou o átrio esquerdo, a espessura relativa da parede e reduziu a FC que foram atenuados pelo chá verde. No grupo D houve aumento do estresse oxidativo caracterizado pela maior formação de hidroperóxido de lipídios (HP) e redução da glutatona peroxidase (GPx), que foram atenuados no grupo DCV. Em relação ao metabolismo energético, houve

aumento de enzimas da via glicolítica anaeróbia (fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase), diminuição de enzima da oxidação de ácidos graxos (3-hidroxiacil coenzima A desidrogenase), redução da atividade de enzimas do ciclo do citrato (citrato sintase), complexos mitocondriais (complexo I e II) e ATP sintase, no grupo D. O grupo DCV restabeleceu o padrão de uso da via glicolítica e oxidação de ácidos graxos. Embora a DOX tenha reduzido a fosforilação da proteína quinase B em relação a sua expressão total (p-AKT/t-AKT), o chá verde não participou dessa via. Houve diminuição da expressão da Top2- β no grupo D, sendo que o chá verde aumentou a expressão dessa enzima, tanto no grupo DCV quanto no grupo CV. A inflamação foi maior no grupo D, evidenciada por maior expressão de TNF- α , CD45 e metaloprotease 2 de atividade intermediária (MMP-2int), porém o chá verde não influenciou esses achados. Não houve alteração na expressão do colágeno I e III ou na presença de fibrose. **CONCLUSÃO:** A administração aguda de doxorubicina causou remodelação cardíaca, sugerindo a presença de remodelamento concêntrico, disfunção diastólica e sistólica, atenuados pelo chá verde. Observou-se diminuição do Top2- β , aumento do estresse oxidativo e da inflamação e desbalanço do metabolismo energético, induzidos pela DOX. O chá verde aumentou a Top2- β , reduziu o estresse oxidativo e recuperou o metabolismo energético para valores próximos ao grupo controle. Portanto, este modelo experimental identificou potenciais mecanismos cardiotoxicidade induzida pela DOX e sugere os potenciais benefícios do chá verde, por provável ação em reduzir a citotoxicidade, a destruição celular e o estresse oxidativo, além de melhorar o metabolismo energético.

Palavras chave: Extrato de chá verde • Doxorubicina • Cardiotoxicidade • Estresse oxidativo • Metabolismo energético

ABSTRACT

INTRODUCTION: doxorubicin (dox) is a very effective drug in the treatment of several types of cancer, but it plays an important role in cardiotoxicity. The mechanisms of DOX-induced cardiotoxicity include: binding to Top2- β , an enzyme that protects cells from cytotoxicity and destruction; interaction with iron and altering intracellular and mitochondrial antioxidants enzymes activities, followed by many other secondary pathways activated by these primary, for example inflammation, extracellular matrix (ECM) factors and others. On the other hand, green tea, a very popular beverage all over the world, has antioxidants and antitumor properties. **METHODS:** Sixty male Wistar rats were used. These animals were divided into groups: C = 20 (control) that received standard chow and intraperitoneal administration of saline, GT = 20 (control + green tea) receiving added chow of green tea extract and intraperitoneal administration of saline solution, D = 20 (doxorubicin) who received standard chow and intraperitoneal administration of doxorubicin and DGT = 20 (doxorubicin + green tea) who received added ration of green tea extract and intraperitoneal administration of doxorubicin. The feed was offered for 35 days and on the 33rd day the infusion of doxorubicin or saline was performed in the same proportion (20 mg / kg in a single dose) and the animals were euthanized 48 hours after the injection of the drug. The rats were submitted to echocardiogram to evaluate the cardiac morphology and function. Analyzes of enzymatic activity, protein expression, related to cell protection, oxidative stress, energy metabolism, inflammation and ECM were performed. **RESULTS:** DOX increased left atrium and relative wall thickness, aside of reducing heart rate, all of them were attenuated by green tea. In D group it was observed greater oxidative stress marked by lipid hydroperoxide (HP) and reduction of glutathione peroxidase (GPx), which was attenuated in the DGT group. In relation to energy metabolism, it was evidenced higher activity of anaerobic glycolytic pathway (phosphofructokinase and lactate dehydrogenase) enzymes, reduction in the activity of fatty acid oxidation (3-hydroxyacyl coenzyme a dehydrogenase),

reduction of the enzymatic activity of the citrate cycle (citrate synthase), mitochondrial complexes (complex I and II) and ATP synthase in group D. The DGT group recovery the pattern of glycolytic fatty acids oxidation pathways. Although DOX reduced the protein kinase phosphorylation with respect to the total expression (p-akt / t-akt), green tea did not influenced this. There was a decrease in the expression of Top2- β in group D, and green tea increased expression of this enzyme, both in the DGT group and in the GT group. The inflammation was higher in group D, evidenced by greater expression of TNF- α , CD45 and metalloprotease 2 of intermediate activity (MMP-2int), but green tea did not influence these findings. There was no change in the expression of collagen I and III or in the presence of fibrosis. **CONCLUSION:** the acute administration of doxorubicin caused cardiac remodeling, suggesting the presence of concentric remodeling, diastolic and systolic dysfunction, attenuated by green tea. It was observed a decrease of the Top2- β , increase of the oxidative stress and the inflammation and imbalance of the energetic metabolism, induced by DOX. Green tea increased Top2- β , reduced oxidative stress, and recovered energy metabolism to values close to the control group. Therefore, this experimental model identified potential mechanisms of DOX-induced cardiotoxicity and suggests the potential benefits of green tea for its likely action in reducing cytotoxicity, cell destruction and oxidative stress, as well as improving energy metabolism.

Key words: Green tea extract • Doxorubicin • cardiotoxicity. • oxidative stress • energy metabolism

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Ilustração da realização do procedimento, desde a aquisição dos animais, oferta de ração, aplicação da doxorubicina ou solução salina até o ecocardiograma final, eutanásia e coleta de material..... | 17 |
| Figura 2 - Imagem de laminas de imunohistoquímica de CD45..... | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – Concentração de anticorpo primário para western blot..... | 23 |
| TABELA 2 – Concentração de anticorpo primário para western blot..... | 24 |
| TABELA 3 – Variáveis Ecocardiográficas de ratos após 48 horas da aplicação da doxorubicina..... | 27 |
| TABELA 4 – Enzimas do metabolismo energético após aplicação da doxorubicina..... | 28 |
| TABELA 5. Resultados das análises de AKT, AMPK α , PPAR α e Topoisomerase II β pelo método de western blotting após aplicação da doxorubicina..... | 29 |
| TABELA 6. Resultados da análise de CD45 por Imunohistoquímica..... | 30 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 7 |
| 1.2 HIPÓTESE..... | 14 |
| 1.3 OBJETIVOS..... | 15 |
| 2 METODOLOGIA..... | 16 |
| 2.1 DELINEAMENTO..... | 16 |
| 2.2 INDUÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE PELA DOXORRUBICINA e EUTANÁSIA..... | 16 |
| 2.3 PREPARO DA RAÇÃO..... | 17 |
| 2.4 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA..... | 17 |
| 2.5 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS..... | 18 |
| 2.6 ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO ENERGÉTICO..... | 19 |
| 2.6.a ESTRESSE OXIDATIVO..... | 19 |
| 2.6.b METABOLISMO ENERGÉTICO..... | 20 |
| 2.7 WESTERN BLOT..... | 21 |
| 2.8 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE: ZIMOGRÁFIA..... | 24 |
| 2.9 ESTUDO MORFOLÓGICO..... | 25 |
| 2.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 25 |
| 3 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 26 |
| 4 RESULTADOS..... | 27 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 31 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 36 |
| REFERÊNCIAS..... | 37 |
| ANEXOS..... | 40 |
| ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA FMB/UNESP..... | 41 |
| ANEXO B – AUTORIZAÇÃO APROVADA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA FMB/UNESP, PARA ALTERAÇÃO DE TÍTULO..... | 42 |

1 INTRODUÇÃO

Utilizada desde 1960, a Doxorubicina (Dox) ou Adriamicina é um antibiótico da classe das Antraciclinas, que vem sendo descrita como potente agente quimioterápico usada no tratamento de diversos tipos de câncer, sendo a Dox uma das primeiras drogas a serem utilizadas na prática clínica (MCGOWAN, CHUNG, *et al.*, 2017).

A descoberta de atividade antineoplásica das antraciclinas levou a sua utilização em larga escala e observou-se que com o uso da droga há melhora no câncer, mas a doença cardiovascular tornou-se uma principal causa de morbidade e mortalidade entre sobrevivente (GHIGO, LI e HIRSCH, 2016)

Evidências clínicas demonstraram que o uso da Dox resulta no surgimento e desenvolvimento de cardiotoxicidade, cardiomiopatia dilatada irreversível e insuficiência cardíaca (ZENG *et al.*, 2019).

Quatro tipos de cardiotoxicidade causados pela Dox são descritos: toxicidade aguda, subaguda, crônica e tardia (GHIGO, LI e HIRSCH, 2016). Esses tipos de cardiotoxicidade são caracterizados por arritmia, dilatação ventricular, disfunção diastólica e sistólica (YU, WANG, *et al.*, 2018).

Estudos observacionais mostram que a cardiotoxicidade induzida pela Dox geralmente ocorre dentro de 2 a 3 dias após receber uma dose da droga, sendo referida como cardiotoxicidade aguda (SHABALALA, MULLER *et al.*, 2017; HYDOCK, WONDERS, *et al.*, 2009; TKEMURA, FYJIWARA, 2007).

Não se sabe ao certo quais os mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade, porém acredita-se que o estresse oxidativo, inibição da topoisomerase II β (Top 2 β), disfunção mitocondrial, danos ao DNA, alterações bioenergéticas e inflamação podem colaborar de forma significativa (RENU, ARUNACHALAM, 2018; YU, WANG, *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo acontece quando a Dox atravessa a membrana sarcoplasmática e se acumula no citoplasma dos cardiomiócitos formando um radical semiquinona. Uma vez lá dentro as antraciclinas se interagem ao ferro,

formando um complexo ferro-antraciclina, reduzindo o oxigênio e formando superóxido (SHABALALA, MULLER, *et al.*, 2017)

O superóxido apresenta alta afinidade à cardiolipina, principal componente da membrana interna da mitocôndria, sendo necessária para que ocorra a fosforilação oxidativa. Estudos mostram, ainda que existe afinidade direta da doxorubicina pela cardiolipina. A cardiolipina é rica em fosfolípidos e, portanto, quando interage com superóxido ou Dox, é susceptível a lipoperoxidação (CAPPETTA, A., *et al.*, 2017).

A peroxidação lipídica da membrana interna da mitocôndria impede o trânsito de transportadores iônicos gerando comprometimento da transferência de energia e favorecendo maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Outro ponto importante é que foram observadas menores concentrações de antioxidantes na vigência da cardiotoxicidade pela Dox. Adicionalmente, a Dox pode se ligar a óxido nítrico sintase, aumentando a produção de superóxido e reduzindo a produção de óxido nítrico (LAMBERTI, GIOVANE, *et al.*, 2014)

Além do estresse oxidativo, a inflamação cardíaca também contribui para o processo de cardiotoxicidade. A Dox promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que são relacionadas a várias manifestações, variando de cardiotoxicidade a astenia. Ela estimula monócitos e macrófagos pela liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que ativa o receptor do TNF (TNFR). Esta ação possivelmente está relacionada alterações estruturais e cardiomiopatia dilatada (YU, WANG, *et al.*, 2018).

Estudos mostraram que dosagens de Dox consideradas clinicamente altas, podem aumentar a expressão e os níveis de genes inflamatórios interleucina (IL) - 1 β e IL-6 cuja expressão é relevante para a indução da cardiotoxicidade induzida por Dox (WONG, SMITH, *et al.*, 2013).

Outro mediador importante que vem sendo descrito na cardiotoxicidade é a Topoisomerase 2 β (Top II β). Acredita-se que ela seja mediadora chave no processo de cardiotoxicidade induzida por antraciclina (VEJPONGSA e YEH, 2014).

As topoisomerasas são proteínas que participam de processos que permitem

alterações no grau de superenrolamento do DNA, para realizar processos cruciais como transcrição e replicação (BOLLIMPELLI, S., *et al.*, 2017).

Existem 2 tipos de topoisomerase: a Top 2 α que é indetectável em cardiomiócitos de adultos e a Top 2 β é altamente abundante no miocárdio, e acredita-se que a Dox seja um potente inibidor da Top 2 β (YU, WANG, *et al.*, 2018).

Quanto ao metabolismo energético, em condições normais o coração utiliza principalmente ácidos graxos como fonte energética para a contração dos miócitos (de 50 a 70%). Porém outra fonte energética importante é o carboidrato que é oxidado e transformado em lactato, glicose e piruvato (LOPASCHUK, USSHER, *et al.*, 2010).

Várias reações enzimáticas configuram o metabolismo energético cardíaco normal.

De modo geral, dentro da mitocôndria o piruvato é oxidado em a acetil-Coenzima A (acetil Co-A), que por sua vez, a beta oxidação de ácidos graxos ou oxidação do piruvato entra no ciclo do ácido cítrico resultando na produção de adicional de NADH⁺ e FADH². Estas transportam elétrons, por meio dos complexos I ao IV, na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. A fosforilação oxidativa é o processo responsável pela produção de ATP (adenosina trifosfato), esse processo envolve a cadeia transportadora de elétrons, oxigênio, translocador de nucleotídeos da adenina, transportador de fosfato, fosfato inorgânico e ATP sintase (AZEVEDO, MINICUCCI, *et al.*, 2013).

Os receptores finais dos elétrons são moléculas de oxigênio que vão ser convertidas em H₂O. O ATP é transferido para a creatinaquinase formando fosfo-creatinoquinase (CK-PCr), o qual é o transportador de energia para as células, como por exemplo, os miócitos. Neles, a ATP é clivada em ADP + Pi pela ATPase liberando energia necessária para contração (LOPASCHUK, USSHER, *et al.*, 2010).

Quando há disfunção cardíaca, ocorrem alterações na utilização de substratos, na geração e no transporte de energia para os tecidos (LUSTOSA, *et al.*, 2016).

A cardiotoxicidade induzida pela Dox reduz a utilização dos substratos, tanto

os ácidos graxos quanto a glicose, além de danificar a estrutura e função mitocondrial (LOPASCHUK, USSHER, *et al.*, 2010)

Durante o início do processo de remodelação cardíaca, para se proteger, o coração passa a utilizar mais glicose e menos ácidos graxos. Entretanto, estes quando não são oxidados, são estocados no coração na forma de triacilgliceróis. Este processo é denominado lipotoxicidade, fazendo parte da disfunção miocárdica, que se desenvolve com o decorrer do processo de remodelação (AZEVEDO, MINICUCCI, *et al.*, 2013)

Além da mudança na utilização dos substratos, outro ponto importante no metabolismo energético cardíaco refere-se à mitocôndria. Durante o processo de remodelação ocorre redução da função e da massa mitocondrial, que resultam em alteração no transporte de elétrons. Esse transporte inadequado favorece o desemparelhamento de elétrons, com conseqüente formação de EROS, levando a uma menor geração de energia para a contração dos miócitos (RIMBAUD, RUIZ, *et al.*, 2011).

O impacto da Dox no metabolismo global do coração vem sendo demonstrado não só por diminuir a produção de ATP mitocondrial em geral, mas conduzir a uma diminuição de isoenzimas de CK, incluindo isoenzimas mitocondrial (MtCK) e proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). Além disso, a sinalização da AMPK diminuída reduz a capacidade da célula para iniciar um aumento compensatório na taxa glicolítica e para estimular a captação de glicose (CARVALHO, BURGEIRO, *et al.*, 2013).

Tanto a utilização de glicose, como a β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa são prejudicados na cardiomiopatia induzida pela Dox, que levado ao extremo pode implicar um quebra geral do metabolismo energético. Curiosamente, uma ligação entre o estresse oxidativo geral e respostas metabólicas já foi proposta. Depois de uma hora de tratamento com Dox, a peroxidação lipídica aumentou e causou uma resposta adaptativa resultando num aumento da absorção de glicose, que se manifesta por um aumento da proteína GLUT1, presumivelmente para restaurar a energia celular, estabelecendo uma relação entre a Dox, peroxidação lipídica e alterações agudas no transporte de glicose

(CARVALHO, BURGEIRO, *et al.*, 2013).

Um aumento da produção de lactato, que é subproduto da glicólise é um sinal de provável redução da função mitocondrial. Através da análise de ressonância magnética nuclear de metabólitos intracelulares, os níveis de acetato foram propostos como novos biomarcadores para cardiotoxicidade e estavam aumentados nos animais tratados com Dox em comparação com os controles, o que correlaciona a conversão não enzimática de piruvato para acetato. Os níveis de aminoácidos ramificados (AACR) valina, leucina, isoleucina também estão diminuídas no coração desses animais, mostrando que os ácidos graxos de cadeia longa e a β -oxidação são inibidas e ciclo de Krebs é prejudicado (CARVALHO, BURGEIRO, *et al.*, 2013).

Os benefícios de se utilizar doxorrubicina como quimioterápico é indiscutível e aparentemente os mecanismos de ação antitumoral e cardiotoxico são diferentes. Porém, o aparecimento de insuficiência cardíaca pode comprometer o tratamento da neoplasia. Este fato pode ser evidenciado pela alta mortalidade atribuída à combinação entre doença cardiovascular e câncer querepresenta 68% de toda a taxa global de mortalidade (SHABALALA, MULLER, *et al.*, 2017)

Portanto o estudo de compostos que possam atenuar a cardiotoxicidade da Dox faz-se necessário para otimização do tratamento de alguns pacientes com neoplasias

Dentre os diferentes alimentos que possuem função antioxidante, encontram-se os chás. Originário da China, o chá verde é cultivado e consumido pelas suas características de aroma, sabor e propriedades medicinais em mais de 160 países, especialmente asiáticos (XU, JI, *et al.*, 2018).

O chá verde (*Camellia Sinensis*), após a água, é a bebida mais consumida no mundo. Entre os vários benefícios relacionados à saúde estão a prevenção de doenças cardiovascular, câncer e diabetes (OLIVEIRA, 2012).

Conhecido também por suas atividades antiinflamatória, antiproliferativa, antiaterosclerótica, o chá verde é rico em polifenóis, que são poderosos antioxidantes e agentes quimiopreventivos desempenhando um papel em neutralizar os radicais livres, reduzindo a inflamação e diminuindo a velocidade

crescimento do tumor, o que levou a inclusão do chá verde em suplementos dietéticos, nutracêuticos e alimentos funcionais (ENG, THANIKACHALAM e RAMAMURTHY, 2018).

A maioria dos benefícios do chá verde podem ser atribuídos ao flavonóides polifenólicos, conhecidos como as catequinas (GUO et al, 2017) que são compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e a adstringência do chá verde (XU, JI, *et al.*, 2018).

Atualmente as catequinas consideradas mais importantes são: catequina (C), epicatequina (EC), epigalocatequina-epicatequina (ECG), epigalocatequina (EGC), e epigalocatequina galato (EGCG); sendo este último o mais ativo no chá verde (OLIVEIRA, 2012).

O teor de catequinas no vegetal depende de alguns fatores externos, tais como forma do processamento das folhas antes da secagem, localização geográfica do plantio e condições de cultivo (XU, JI, *et al.*, 2018). Os efeitos potenciais das catequinas sobre a saúde não dependem somente da quantidade consumida, mas também sobre sua biodisponibilidade, que parece ser muito variável (CABRERA, ARTACHO e GIMÉNEZ, 2006).

O metabolismo de polifenóis ocorre através de uma via comum. Durante o processo de absorção, os polifenóis são conjugados no intestino delgado e no fígado. Este processo inclui metilação, sulfatação e glucuronidação. Os polifenóis circulantes também são conjugados, são amplamente ligados à albumina. Os polifenóis são capazes de penetrar nos tecidos, particularmente naqueles em que são metabolizados, mas a sua capacidade de acumular nos tecidos-alvo específicos precisa ser mais investigada (MANACH, SCALBERT, *et al.*, 2004).

O impacto favorável do chá verde nas doenças cardiovasculares parece estar relacionado à ação das catequinas sobre o sistema vascular. As propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antitrombóticas, antiproliferativas e redutoras de LDL conferidas ao chá verde, atenuam a aterogênese e melhoram a função endotelial (JOCHMANN, BAUMANN e STANGL, 2008).

Apesar dos estudos apontarem para os potenciais efeitos benéficos do chá verde no sistema vascular, pouco se sabe sobre as ações deste composto

diretamente sobre o miocárdio (JOCHMANN, BAUMANN e STANGL, 2008).

Dentre os poucos estudos que avaliaram o papel do chá verde no miocárdio podemos destacar modelos de isquemia-reperfusão, miocardite e insuficiência renal crônica. Nestes modelos observou-se que o chá verde melhorou o inotropismo, diminuiu a inflamação e reduziu hipertrofia cardíaca (HSIEH, TSAI e CHEN, 2009).

Com relação a estudo com chá verde, as catequinas demonstraram efeitos positivos na funcionalidade da mitocôndria e conseqüentemente melhorou o metabolismo energético cardíaco. E estudos com ratos com cardiotoxicidade induzida pelo uso de Isoproterenol, mostrou que as catequinas tiveram efeito preventivo sobre o dano mitocondrial, através da diminuição da peroxidação lipídica e do seu efeito antioxidante. Além disso, o pré tratamento com as catequinas manteve a função mitocondrial normal, neutralizou o aumento dos níveis de Ca^{2+} e manteve a atividade da ATPase e a concentração de ATP (HERNÁNDEZ, GIAMPIERI, *et al.*, 2014).

Dessa forma, é possível observar que muitas das alterações que ocorrem no metabolismo energético cardíaco durante o processo de remodelação, são potenciais sítios de ação das catequinas do extrato de chá verde.

6. CONCLUSÃO

Neste modelo foi possível evidenciar mecanismos importantes envolvidos na cardiotoxicidade induzido pela doxorubicina. O extrato de chá verde mostrou-se eficaz por sua provável ação na redução da citotoxicidade, inibindo da destruição celular, redução do estresse oxidativo e melhora do metabolismo energético, contribuindo para atenuação dos mecanismos de remodelação cardíaca.

REFERENCIAS

1. AKHLAGHI, M.; BANDY, B. Dietary green tea extract increases phase 2 enzyme activities in protecting against myocardial ischemia-reperfusion. **Nutrition Research**, v. 30, p. 32-39, January 2010.
2. AZEVEDO, P. S. et al. Energy Metabolism in Cardiac Remodeling and Heart Failure. **Cardiology in Review**., v. 21, p. 135-140, May/June 2013.
3. BASS, A. et al. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. **European J. Biochem.**, March/May 1969. 198-206.
4. BOLLIMPELLI, V. S. et al. Topoisomerase IIb and its role in different biological contexts.. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 633, p. 78-84, 2017.
5. CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. 1.Beneficial Effects of Green Tea: A Review. **J. of the Amer, Coll. of Nutrit**, v. 25, n. 2, p. 79–99, April 2006.
6. CAPPETTA, D. et al. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. **Oxid Med Cell Longev.**, p. 13, October 2017.
7. CARVALHO, F. S. et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. **Medicinal Research Reviews**, n. 34, p. 106-135, Jan. 2013.
8. DESAI, V. G. et al. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. **Arch Biochem Biophys**, v. 333, p. 145-151, September 1996.
9. ENG, Q. I.; THANIKACHALAM, P. V.; RAMAMURTHY, S. 1Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases.. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 296–310, August 2018.
10. EWING, J. F.; JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzimatic superoxide generator., v. 232, p. 243-248. , December 1995.
11. GHIGO, A.; LI, M.; HIRSCH, E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1916–1925, July 2016.
12. GUO, Y. et al. Green tea and the risk of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis.. **Medicine (Baltimore)**, v. 13, p. 96, Mar 2017.
13. HERNÁNDEZ, T. Y. et al. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms.. **Food and Chemical Toxicology**., v. 68, p. 154–182, Jun 2014.
14. HSIEH, S.; TSAI, D.; CHEN, J. Green tea extract protects rats against myocardial infarction associated with left anterior descending coronary artery ligation. *Eur J Physiol.* **Eur J Physiol**, v. 458, p. 631-642, April 2009.
15. HYDOCK, D. S. et al. 1. HVoluntary wheel running in rats receiving

- doxorubicin: effects on running activity and cardiac myosin heavychain.. **Anticancer research**, p. 429:440, November 2009.
16. JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidative of Fe³ in the presence of xylenol orange Lipids.. **Elsevier**, v. 26, p. 853-856, October 1991.
 17. JOCHMANN, N.; BAUMANN, G.; STANGL, V. Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.**, v. 11, p. 758–765, November 2008.
 18. KURIYAMA, S. The Relation between Green Tea Consumption and Cardiovascular Disease as Evidenced by Epidemiological Studies. **American Society Nutrition.** , v. 138, p. 1548 - 1553, August 2008.
 19. LAMBERTI, M. et al. Animal models in studies of cardiotoxicity side effects from antineoplastic drugs in patients and occupationally exposed workers. **Biomed Res Int**, p. 2406-2442., Feb 2014.
 20. LANG, R. M., et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **J Am Soc Echocardiogr.**, 18. p.1440–1463. 2005.
 21. LUSTOSA B. B. et al. Green tea (*Cammellia sinensis*) attenuates ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, 225.p 147–153. 2016.
 22. LOPASCHUK, G. D. et al. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. **Physiol Rev.**, v. 90, p. 207 - 258, January 2010.
 23. MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v. 79, p. 727 - 747, May 2004.
 24. MCGOWAN, J. V. et al. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 31, p. 63-75, Feb 2017.
 25. MOURA, R. A. **Técnicas de Laboratório**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1982.
 26. NAKAMURA, W.; HOJODA, S.; HAYASHI, K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochem Biophys Acta**, v. 358, p. 251-261, 1974.
 27. POLEGATO, B. F. et al. Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity is Associated with Matrix Metalloproteinase-2 Alterations in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 1924-1933, MAR 2015.
 28. REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, v. 22, p. 659-661, MAR 2008.
 29. RENU, K.; ARUNACHALAM, S. Molecular Mechanism of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **An Update Eur J Pharmacol**, v. 5, p. 241-253, JAN 2018.
 30. RIMBAUD, S. et al. Resveratrol Improves Survival, Hemodynamics and Energetics in a Rat Model of Hypertension Leading to Heart Failure. **Plos**

- one, v. 1813, p. 1360-1372, October 2011.
31. SHABALALA, S. et al. Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Life Sciences**, p. 160-180, MAY 2017.
 32. SHI, W. et al. Mitochondria-Targeting Small Molecules Effectively Prevent Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin.. **Molecules**, v. 23, p. 19-23, JUN 2018.
 33. TAKEMURA G.; FUJIWARA H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. Progress in cardiovascular diseases. v 49. p. 330-352. April 2007.
 34. VEJPONGSA, P.; YEH, E. T. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. **J Am Coll Cardiol.**, v. 64, p. 938-945, Sept 2014.
 35. WATSON, L. E. et al. Baseline echocardiographic values for adult male rats. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 1, p. 161-167, Feb 2004.
 36. WILKINSON JH. Introducción al diagnóstico enzimático. 3a. ed. Buenos Aires: Ediciones Toray, 1965; p. 310.
 37. WONG, J. et al. Small molecule Kinase inhibitors block the ZAK dependent inflammatory effects of doxorubicin. **Cancer boil ther**, v. 14, p. 56-63, JAN 2013.
 38. XIN, Y. F. et al. Alleviation of the acute doxorubicin induced cardiotoxicity by Lycium barbarum polysaccherides through the suppression of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 259-264, Jan 2011.
 39. XU, Y. Q. et al. Effect of extraction methods on the chemical components and taste quality of green tea extract.. **Food Chemistry**, v. 248, p. 146-154, May 2018.
 40. YU, J. et al. Recent progress in doxorubicin-induced cardiotoxicity and protective potential of natural products. **Phytomedicine**, v. 40, p. 125-139, Feb 2018.
 41. ZENG W. F., et al. C1qTNF-related protein-6 protects against doxorubicin-induced cardiac injury. **J Cell Biochem.** p 1 – 8. 2019.