



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

HELENA BEATRIZ MOURA MARTINS

**Influência da suplementação de ácidos graxos ômega-3 no
metabolismo celular hepático em ratos tratados cronicamente com
doxorubicina**

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

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Coorientadora: Marina Monte Gaiato

Botucatu
2026

HELENA BEATRIZ MOURA MARTINS

**Influência da suplementação de ácidos graxos ômega-3 no
metabolismo celular hepático em ratos tratados cronicamente com
doxorubicina**

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

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato
Coorientadora: Marina Monte Gaiato

**Botucatu
2026**

M386i

Martins, Helena Beatriz Moura

Influência da suplementação de ácidos graxos ômega-3 no metabolismo celular hepático em ratos tratados cronicamente com doxorrubicina / Helena Beatriz Moura Martins. -- Botucatu, 2026

66 f. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientadora: Bertha Furlan Polegato

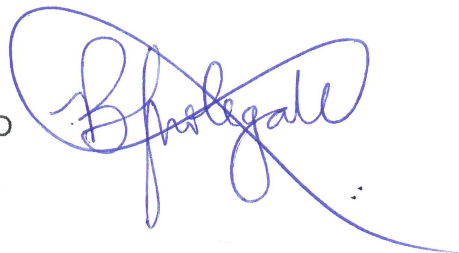
1. Hepatotoxicologia. 2. Doxorrubicina. 3. Ácidos graxos Ômega-3. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE HELENA BEATRIZ MOURA MARTINS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 27 de março de 2026, às 14h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de HELENA BEATRIZ MOURA MARTINS, intitulada " **INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 NO METABOLISMO CELULAR HEPÁTICO EM RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM DOXORRUBICINA** ". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. BERTHA FURLAN POLEGATO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica Médica / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMB, Profa. Dra. CAROLINA RODRIGUES TONON (Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica Médica / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMB, Profa. Dra. MARIA ANGÉLICA MARTINS LOURENÇO REZENDE (Participação Virtual) do(a) Centro Universitário Sagrado Coração, Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. BERTHA FURLAN POLEGATO



EPÍGRAFE

“Deixemos de coisas
Cuidemos da vida
Se não chega a morte ou coisa parecida
E nos arrasta moço
Sem ter visto a vida”
Belchior

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jandira e Léo, que são a base de tudo o que eu sou. Obrigada por cada renúncia silenciosa, por cada incentivo e por acreditarem em mim mesmo quando o caminho parecia difícil demais. Esse título também é de vocês.

Ao Allan, meu esposo e companheiro de vida, por caminhar comigo em cada etapa, por compreender minhas ausências, acolher meus medos e celebrar comigo cada conquista. Seu amor foi meu combustível nos momentos mais difíceis.

Às minhas irmãs, Léa e Rebeca, por serem meu apoio constante, meu abrigo e minha alegria nos dias mais desafiadores. Ter vocês ao meu lado torna qualquer jornada mais leve.

À minha tia Nézia, pelo carinho, pelas orações e por sempre torcer por mim com tanto amor.

A Antônio e Iva, pelo apoio no processo mais difícil da minha vida. O cuidado e o suporte de vocês foram essenciais para que eu conseguisse continuar.

Ao Maurício Lisboa (*in memoriam*), por todo apoio, pelas risadas compartilhadas e pelos momentos de alegria que levarei sempre comigo. Sua lembrança permanece viva em meu coração.

Às minhas amigas — Marina M. Gaiato, Mariana Ferreira, Letycia Netto, Lara Pompiane e Nayane Vieira — por compartilharem não apenas o espaço de pesquisa, mas também risadas, angústias, aprendizados e crescimento. Vocês tornaram essa trajetória mais leve, mais forte e infinitamente mais especial.

Este trabalho carrega um pedaço de cada um de vocês.

Amo demais vocês!

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

À **Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato**, minha orientadora, minha profunda e sincera gratidão. Obrigada por acreditar em mim, pela orientação segura, pela exigência que me fez crescer e pela confiança ao longo de toda essa jornada. Sua dedicação à ciência e à formação de pesquisadores é inspiradora, e sou imensamente grata por cada ensinamento.

À minha coorientadora e amiga, **Dra. Marina Gaiato Monte**, agradeço não apenas pela contribuição científica essencial para este trabalho, mas também pelo apoio constante, pelas conversas, pelos conselhos e pela amizade construída ao longo desse caminho. Sua presença tornou os desafios mais leves e as conquistas ainda mais significativas.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da minha bolsa de mestrado.

Aos docentes do grupo Remodelação Cardíaca e Nutrição (RECAN), Prof. Dr. Leonardo A. M. Zornoff, Prof. Dr. Marcos F. Minicucci, Profa. Dra. Paula S. A. Gaiolla, Prof. Dr. Sergio A. R. de Paiva e Prof. Dra. Carolina Rodrigues Tonon pela contribuição científica e pelas valiosas discussões que enriqueceram este trabalho.

Aos integrantes e ex-integrantes do RECAN pela parceria e amizade que desenvolvemos durante esse tempo. Vocês foram essenciais para realização desse estudo.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), em especial, Paulo C. Geogerte e Sara R. S. Sampaio pelo suporte.

Aos funcionários da pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

Muito obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
HIPÓTESE.....	24
OBJETIVO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	4646
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS	61

Lista de tabelas

Tabela 1. Marcadores do dano oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes44

Tabela 2. Análise da atividade das enzimas do metabolismo energético celular44

Lista de figuras

Figura 1. Delineamento do estudo.....31

Figura 2. Consumo de ração e evolução de peso corporal.....38

Figura 3. Peso absoluto do fígado e peso hepático normalizado pelo peso corporal dos animais estudados.....39

Figura 4. Análise histológica do tecido hepático.....40

Figura 5. Expressão dos complexos I, II, III e V do coquetel OXPHOS e da proteína CPT-1.41

Figura 6. Lipídeos séricos e glicemia.42

Figura 7. TGO e TGP séricos.....43

Lista de quadros

Quadro 1. Composição do ácido graxo ômega 329

RESUMO

Introdução: A doxorrubicina é um quimioterápico altamente efetivo contra diversos tipos de câncer, porém apresenta efeitos colaterais sistêmicos graves, como a hepatotoxicidade. Um dos mecanismos envolvidos na lesão hepática é a disfunção mitocondrial, que é acompanhada de aumento do estresse oxidativo, dislipidemia e hiperglicemia. Os ácidos graxos ômega-3 são capazes de reduzir a deposição de gordura no fígado e possuem efeitos anti-inflamatórios, o que poderia contribuir para a prevenção da doença hepática. Entretanto, é desconhecido o seu efeito no metabolismo celular e na biogênese mitocondrial hepática em animais tratados com doxorrubicina. **Objetivo:** Avaliar a influência da suplementação de ácidos graxos ômega-3 na hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina em ratos. **Material e Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar machos (n=48); alocados em 4 grupos: controle (C), administração de ácidos graxos ômega-3 (W), administração de doxorrubicina (D) e administração de doxorrubicina + ácidos graxos ômega-3 (DW). Os ácidos graxos ômega-3 (400 mg/kg/dia) foram administrados via gavagem por 6 semanas. Após 2 semanas do início da administração de ácidos graxos ômega-3, foi iniciada administração de doxorrubicina (4 mg/kg, ip, 1x/semana) por 4 semanas. Foi realizada eutanásia dos animais para coleta de material biológico, utilizado para dosagem de perfil lipídico e glicemia séricos, western blot do tecido hepático para as proteínas envolvidas na dinâmica e no funcionamento mitocondrial e atividade das enzimas envolvidas no metabolismo glicídico e lipídico no fígado. A análise estatística foi feita por *GLM (Generalized Linear Model)* com distribuição gama e considerado $p < 5\%$ para todas as análises. **Resultados:** A doxorrubicina causou perda de peso corporal, aumento do estresse oxidativo, alterações no metabolismo energético e piora no perfil lipídico e glicêmico, além de alterar as enzimas TGO e TGP. A suplementação de ácidos graxos ômega-3 atenuou parcialmente o estresse oxidativo e modulou a atividade das enzimas aldolase, citrato quinase e piruvato quinase no metabolismo energético, mas não foi capaz de reverter as alterações bioquímicas séricas. Esses achados sugerem que os ácidos graxos ômega-3 exercem efeitos protetores parciais no fígado de animais tratados com doxorrubicina. **Conclusão:** A suplementação de ácidos graxos ômega-3 atenuou parcialmente os efeitos hepatotóxicos induzidos pela doxorrubicina, promovendo redução dos marcadores de estresse oxidativo e modulação da atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo energético hepático. Contudo, não foi capaz de reverter as alterações bioquímicas séricas nem de restaurar completamente a função mitocondrial comprometida, indicando efeito protetor parcial frente à hepatotoxicidade induzida pelo quimioterápico.

Palavras-chave: hepatotoxicidade; doxorrubicina; ácidos graxos ômega-3; mitocôndria; dislipidemia; hiperglicemia.

ABSTRACT

Introduction: Doxorubicin is a highly effective chemotherapeutic agent against various types of cancer; however, it presents serious systemic side effects, such as hepatotoxicity. One of the mechanisms involved in liver injury is mitochondrial dysfunction, which is accompanied by increased oxidative stress, dyslipidemia, and hyperglycemia. Omega-3 fatty acids can reduce fat deposition in the liver and have anti-inflammatory effects, which could contribute to the prevention of liver disease. However, the effects of these compounds on cellular metabolism and hepatic mitochondrial biogenesis in animals treated with doxorubicin remain unknown. **Objective:** to evaluate the influence of omega-3 fatty acid supplementation on doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats. **Material and methods:** Forty-eight male Wistar rats were used and allocated into four groups: control (C), omega-3 administration (W), doxorubicin administration (D), and doxorubicin + omega-3 administration (DW). Omega-3 (400 mg/kg/day) was administered by gavage for six weeks. Two weeks after starting omega-3 administration, doxorubicin (4 mg/kg, intraperitoneally, once a week) was administered for four weeks. Animals were euthanized to collect biological samples, which were used to measure serum lipid profiles and glucose levels. These samples were also used to perform western blotting on liver tissue to identify proteins involved in mitochondrial dynamics and function, and to assess the activity of enzymes involved in hepatic glucose and lipid metabolism. Statistical analysis was performed using a Generalized Linear Model (GLM) with a gamma distribution, and significance was considered at $p < 0.05$. **Results:** Doxorubicin treatment resulted in body weight loss, increased oxidative stress, alterations in energy metabolism, worsening of lipid and glycemic profiles, and changes in ALT and AST enzyme levels. Omega-3 fatty acid supplementation partially attenuated oxidative stress and modulated the activity of aldolase, citrate kinase, and pyruvate kinase in energy metabolism; however, it did not reverse the serum biochemical alterations. These findings suggest that omega-3 fatty acids exert partial protective effects on the liver of doxorubicin-treated animals. **Conclusion:** Omega-3 fatty acid supplementation partially attenuated doxorubicin-induced hepatotoxic effects by reducing oxidative stress markers and modulating the activity of enzymes related to hepatic energy metabolism. However, it was not able to reverse serum biochemical alterations nor fully restore mitochondrial function, indicating a partial protective effect against chemotherapeutic-induced hepatotoxicity.

Keywords: hepatotoxicity; doxorubicin; omega-3 fatty acids; mitochondria; dyslipidemia; hyperglycemia.

INTRODUÇÃO

O câncer está entre as principais causas de morte no mundo. Estimativas do Global Cancer Observatory indicam que, em 2020, ocorreram aproximadamente 19,3 milhões de novos casos de câncer e cerca de 10 milhões de óbitos pela doença no mundo, configurando-se como um importante problema de saúde pública mundial. Projeções apontam que o número de novos casos pode ultrapassar 28 milhões até 2040, impulsionado principalmente pelo envelhecimento populacional e pelo aumento da exposição a fatores de risco modificáveis (2). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), são estimados cerca de 704 mil novos casos de câncer para o triênio 2023–2025, com maior incidência dos cânceres de pele não melanoma, mama, próstata, colorretal, pulmão e estômago, reforçando a relevância epidemiológica da doença no contexto nacional (3).

A quimioterapia está entre os tratamentos oncológicos mais utilizados. A doxorrubicina é um quimioterápico da classe das antraciclinas amplamente utilizado desde a década de 60. Ela é produzida a partir da espécie *Streptomyces peucetius* e seu mecanismo de ação envolve a interação com o DNA que resulta em um complexo genotóxico DNA-doxorrubicina, que inibe a enzima topoisomerase 2 e gera morte celular. Clinicamente, a doxorrubicina é empregada no tratamento de neoplasias sólidas e hematológicas, incluindo câncer de mama, linfomas de Hodgkin e não Hodgkin, leucemias, sarcomas de partes moles e ósseos, câncer de pulmão, ovário, bexiga e tumores pediátricos, sendo frequentemente utilizada em esquemas quimioterápicos combinados devido à sua elevada eficácia antitumoral (4). Apesar disso, sua ação sistêmica resulta em diversos efeitos colaterais como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e a hepatotoxicidade (5,6).

A hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina é caracterizada por alterações histopatológicas como aumento do infiltrado mononuclear, congestão vascular, lesão hepatocelular e necrose (7). Esses efeitos decorrem de diversos mecanismos fisiopatológicos, entre os quais se destaca a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) durante o metabolismo da droga. A produção aumentada dessas espécies reativas promove estresse oxidativo que resulta na disfunção mitocondrial, alteração do metabolismo energético celular e, consequentemente, no dano hepatocelular (7,8).

As mitocôndrias são organelas altamente específicas, responsáveis pelo controle, principalmente, do metabolismo energético celular. Sob estímulos

fisiológicos, como exercício físico e mudanças dietéticas, as mitocôndrias podem aumentar em número e tamanho, processo denominado biogênese mitocondrial.

Por ser uma organela dinâmica, a mitocôndria apresenta ciclos de fusão e fissão. Esses processos desempenham papel fundamental na manutenção da qualidade e da integridade mitocondrial, estando diretamente envolvidos na regulação da atividade mitocondrial, apoptose, homeostase do cálcio intracelular e sobrevivência celular (10,11). O processo de fusão é ativado em condições de déficit energético ou situações de estresse celular. A proteína Atrofia Ótica I (OPA1) é responsável por mediar a fusão da membrana interna da mitocôndria, enquanto as proteínas Mitofusina I (Mfn1) e Mitofusina II (Mfn2) medeiam a fusão da membrana externa da organela. Esse processo gera mitocôndrias com maiores dimensões e capacidade metabólica superior às mitocôndrias convencionais, o que favorece a redução da produção de EROs (11,12). De modo oposto, a fissão ocorre quando a célula é exposta a ambiente com excesso de nutrientes. A interação entre a Proteína 1 Relacionada com a Dinamina (Drp1) e Proteína de Fissão 1 (Fis1) promove a divisão mitocondrial, processo que contribui para a remoção de mitocôndrias danificadas por meio de mecanismos de controle de qualidade mitocondrial (11, 13).

A alta afinidade da doxorubicina pela mitocôndria se dá pela presença abundante da cardiolipina, um fosfolípido da membrana interna dessa organela. A ligação do quimioterápico com a cardiolipina bloqueia a ligação e a ativação de enzimas essenciais para produção de ATP. Na mitocôndria, a doxorubicina pode ser reduzida ao reagir com o complexo I da cadeia fosforilativa, gerando a semiquinona que, posteriormente, reage com oxigênio (O_2), dando origem às EROs, com destaque para superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (14). O desbalanço entre a formação das EROs e a capacidade antioxidante endógena gera um estado celular pró-oxidativo, que leva à lesão de proteínas celulares, DNA e lipídeos de membrana, situação denominada estresse oxidativo.

Nessas situações de estresse oxidativo exacerbado, ocorre intensificação da peroxidação lipídica das membranas celulares, com maior formação de malondialdeído (MDA), maior incorporação de radicais carbonil às proteínas, alterando suas conformações, além da redução dos agentes antioxidantes endógenos (15). Além disso, as EROs podem ativar fatores de transcrição, como o fator nuclear κB (NF- κB) via IKK, resultando em maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (16,17).

O acúmulo de EROs causa oxidação de grupamentos tióis (S-H) em proteínas de membrana, levando a polimerização dessas proteínas por pontes dissulfeto (S-S) e formação de poros de transição de permeabilidade de membrana, um canal não-seletivo de alta-condutância que contribui para a disfunção mitocondrial. De fato, em ratos tratados com doxorubicina é possível encontrar achados microscópicos indicativos de lesão mitocondrial, como vacuolização, presença de figuras mielínicas e lesões em suas membranas (18).

Além da lesão mitocondrial, a via do Citocromo P450 redutase, da carbonil reductase 1 e da NADPH-oxidase também são responsáveis pela geração de EROs no fígado. Essa última é a principal enzima produtora de EROs no citosol e tem sua expressão aumentada mediante a presença da doxorubicina (19-21).

Outro efeito colateral atribuído à doxorubicina é o aumento sérico de colesterol total (CT), fração de colesterol de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TGL), levando à dislipidemia (22, 23). A presença concomitante de dislipidemia pode contribuir para os efeitos adversos do quimioterápico, pois favorece a lesão hepática por meio da lipotoxicidade celular (24, 25).

A dislipidemia induzida pela doxorubicina está associada à modulação da expressão de receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPARs). A droga induz a *down-regulation* do PPAR γ , um fator de transcrição com papel fundamental na expressão de proteínas envolvidas no transporte de glicose e ácidos graxos para os adipócitos, como o transportador GLUT4 e a lipase lipoproteica, resultando em inibição da adipogênese (25). Estudo prévio demonstrou que a doxorubicina promove a modulação positiva do PPAR α e da enzima lipase de triglicerídeos do tecido adiposo (ATGL). Diferentemente do PPAR γ , o PPAR α atua na expressão de genes relacionados à lipólise no tecido adiposo, codificando enzimas essenciais para a β -oxidação de ácidos graxos, como a carnitina palmitoiltransferase I (CPT1) e a acetil-CoA sintase (ACS). Nesse contexto, o aumento da expressão da ATGL induzido pela doxorubicina desempenha papel fundamental no desenvolvimento da dislipidemia associada ao quimioterápico (26).

Assim como no tecido adiposo, a doxorubicina leva à diminuição de expressão de PPAR γ hepático, o que resulta na redução da síntese de transportadores de ácidos graxos para o fígado, como o CD36 (26). Além disso, no fígado, o fator de transcrição AHR (receptor aril-hidrocarbono) e a proteína ACOX1 (Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1), ambos envolvidos na β -oxidação de ácidos graxos, encontram-se infra-

regulados, assim como a ATGL. Essas alterações favorecem o acúmulo de gordura hepática (8). De fato, o conteúdo de triglicerídeos hepáticos aumenta em mais de 50% em ratos tratados com dose cumulativa de 15 mg/Kg de doxorrubicina (26). Somado a isso, o hepatócito apresenta comprometimento do transporte de triglicerídeos para a circulação, uma vez que a apolipoproteína B (APO-B), proteína essencial para a secreção de lipoproteínas hepáticas, também se encontra subexpressa na presença do quimioterápico (27).

Além das alterações no metabolismo lipídico, a doxorrubicina também perturba a homeostase da glicose. Na presença do quimioterápico, observa-se diminuição da expressão gênica do GLUT4, associada ao aumento das concentrações séricas de glicose, ácidos graxos e insulina, bem como à redução da sensibilidade à insulina (28,29). Essas alterações sugerem um comprometimento da captação e da utilização da glicose pelo fígado.

O metabolismo energético é essencial para a manutenção da homeostase celular, fornecendo a energia necessária para processos vitais, como contração muscular, síntese de macromoléculas e sinalização celular. A eficiência e a regulação dessas vias dependem da atividade de enzimas-chave, que determinam o fluxo de substratos e a produção de ATP nas principais rotas metabólicas (30).

No metabolismo da glicose, destacam-se enzimas glicolíticas como a hexoquinase, responsável pela fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato e, portanto, pelo controle da entrada desse substrato na célula. A fosfofrutoquinase, considerada um dos principais pontos de regulação da glicólise, catalisa a conversão da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato de acordo com o estado energético celular. A aldolase promove a clivagem da frutose-1,6-bisfosfato em dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, assegurando a continuidade da via, enquanto a piruvato quinase catalisa a formação de piruvato a partir do fosfoenolpiruvato, em uma etapa irreversível acoplada à geração de ATP (30).

No metabolismo mitocondrial, a citrato sintase catalisa a condensação do acetil-CoA com o oxaloacetato para formar citrato, iniciando o ciclo de Krebs e integrando a oxidação de carboidratos e ácidos graxos (31). A carnitina palmitoiltransferase I (CPTI) regula a entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria para β -oxidação, sendo essencial na utilização de lipídios como fonte de energia (32). Por fim, a creatinoquinase catalisa a transferência de grupos fosfato entre ATP e creatina,

formando fosfocreatina, que atua como um reservatório rápido de energia em tecidos de alta demanda, como músculo e coração (33).

A presença de hepatotoxicidade pode agravar a saúde debilitada do paciente com câncer, diminuindo sua qualidade e expectativa de vida, além de comprometer a adesão e a continuidade do tratamento quimioterápico (4). Também pode ser um fator limitante para o uso do quimioterápico em doses efetivas (34). Dessa forma, como o dano orgânico provocado pela doxorrubicina pode não ser reversível, estratégias que possam mitigar esse efeito colateral são de grande interesse (35).

Assim, a investigação de agentes com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e hepatoprotetoras torna-se relevante, uma vez que tais substâncias podem reduzir o dano hepático, preservar a função do órgão e possibilitar a manutenção do tratamento quimioterápico em doses terapêuticas eficazes, sem comprometer ainda mais o estado clínico do paciente (36).

Os ácidos graxos ômega-3 são uma família de ácidos graxos poliinsaturados dos quais o ácido α -linolênico (ALA; 18: 3 ω -3), ácido eicosapentaenóico (EPA; 20: 5 ω -3) e ácido docosahexaenóico (DHA; 22: 6 ω -3) são os mais estudados. O ALA pode ser encontrado em nozes, sementes e óleos vegetais. Ele é precursor de EPA e DHA, entretanto essa conversão é muito baixa e por isso são considerados ácidos graxos essenciais, ou seja, que devem ser adquiridos por meio da dieta. Por isso, o consumo de peixes com maior concentração de EPA e DHA como cavala, truta, salmão, arenque, atum branco e sardinha, é incentivado (37).

Muitos efeitos benéficos são atribuídos à ingestão de ácidos graxos ômega-3. Entre eles, podemos citar sua influência na composição lipídica da membrana, atuando na biossíntese de eicosanóides, cascatas de sinalização celular e expressão gênica de proteínas ligadas ao desenvolvimento da aterosclerose e estímulo de vias de inflamação. Além disso, os ácidos graxos ômega-3 são capazes de melhorar o perfil lipídico e há evidência de que possam atuar de modo positivo em doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, doenças mentais, doença periodontal e artrite reumatoide (38, 39).

Estudos sugerem que os ácidos graxos ômega-3 promovem a quebra de gordura no fígado, levando a menor acúmulo de gordura hepática, e apresentam efeitos anti-inflamatórios, o que contribui para a prevenção do desenvolvimento ou da progressão da doença hepática (40,41). Parker et al., em uma metanálise, mostraram que a suplementação de ácidos graxos ômega-3 reduziu a gordura hepática (41).

Estudo de coorte mostrou que a presença de doenças hepáticas foi menor em pacientes que realizavam suplementação de ácidos graxos ômega-3 (40).

Em estudos experimentais, observamos melhora das alterações histológicas e proliferação de hepatócitos induzidas pela doxorrubicina, diminuição dos marcadores bioquímicos de lesão hepática e redução do estresse oxidativo hepático, com diminuição de MDA e NF- κ B, em ratos que foram tratados com ácidos graxos ômega-3 e doxorrubicina quando comparado com ratos tratados apenas com doxorrubicina (43,44).

No entanto, apesar dos reconhecidos efeitos anti-inflamatórios e metabólicos dos ácidos graxos ômega-3, há escassez de estudos sobre sua influência direta na toxicidade hepática induzida pela doxorrubicina. Até o momento, a literatura disponível concentra-se predominantemente na cardiotoxicidade associada a esse quimioterápico ou em abordagens gerais de hepatoproteção, não havendo evidências consistentes sobre o impacto dos ácidos graxos ômega-3 nos mecanismos celulares e metabólicos envolvidos na lesão hepática induzida pela doxorrubicina (45). Ademais, não foram identificados estudos que investigaram de forma integrada os efeitos dos ácidos graxos ômega-3 sobre o metabolismo energético e a biogênese mitocondrial hepática nesse contexto de toxicidade, os quais são aspectos centrais na manutenção da função hepática. Dessa forma, o presente estudo propõe-se a preencher essa lacuna, avaliando de maneira inédita o potencial modulador dos ácidos graxos ômega-3 sobre alterações metabólicas e mitocondriais associadas à hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina, contribuindo para o avanço do conhecimento e para o desenvolvimento de estratégias adjuvantes mais seguras e eficazes na terapêutica oncológica (45).

HIPÓTESE

A suplementação de ácidos graxos ômega-3 atenua a hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina em ratos por meio de sua ação junto às mitocôndrias, do hepatócito.

OBJETIVO

Avaliar a influência da suplementação de ácidos graxos ômega-3 na hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina, principalmente no metabolismo celular e estresse oxidativo de hepatócitos, em ratos tratados cronicamente com a droga.

MATERIAL E MÉTODOS

Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho amostral, utilizamos dados de estudo prévio de nosso grupo de pesquisa que avaliou hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina (dados ainda não publicados). Utilizamos como marcador de hepatotoxicidade o valor de aspartato aminotransferase (AST) e o cálculo foi feito com auxílio do programa *SigmaPlot* 12.0. Considerando a diferença entre as médias dos grupos controle e tratado com doxorrubicina de 110 e desvio padrão esperado de 80, poder de teste de 80%, *alfa* de 0,05 e presença de 4 grupos experimentais, chegamos ao número necessário mínimo de 12 animais por grupo.

Ácidos graxos ômega-3

O suplemento de ácidos graxos ômega-3 utilizado no presente estudo foi da marca *Essential Nutrition*®, que é constituído por:

Quadro 1. Composição do ácido graxo ômega-3

Composição Ácidos Graxos Ômega 3	Quantidade em 1 g do produto
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	360 mg
Ácido docosahexaneico (DHA)	240 mg
Outros ácidos graxos	350 mg
DL-alfa-tocopherol (vitamina E)	1,6 mg

Fonte: Essential Nutrition. Informações descritas no rótulo do produto.

Delineamento experimental

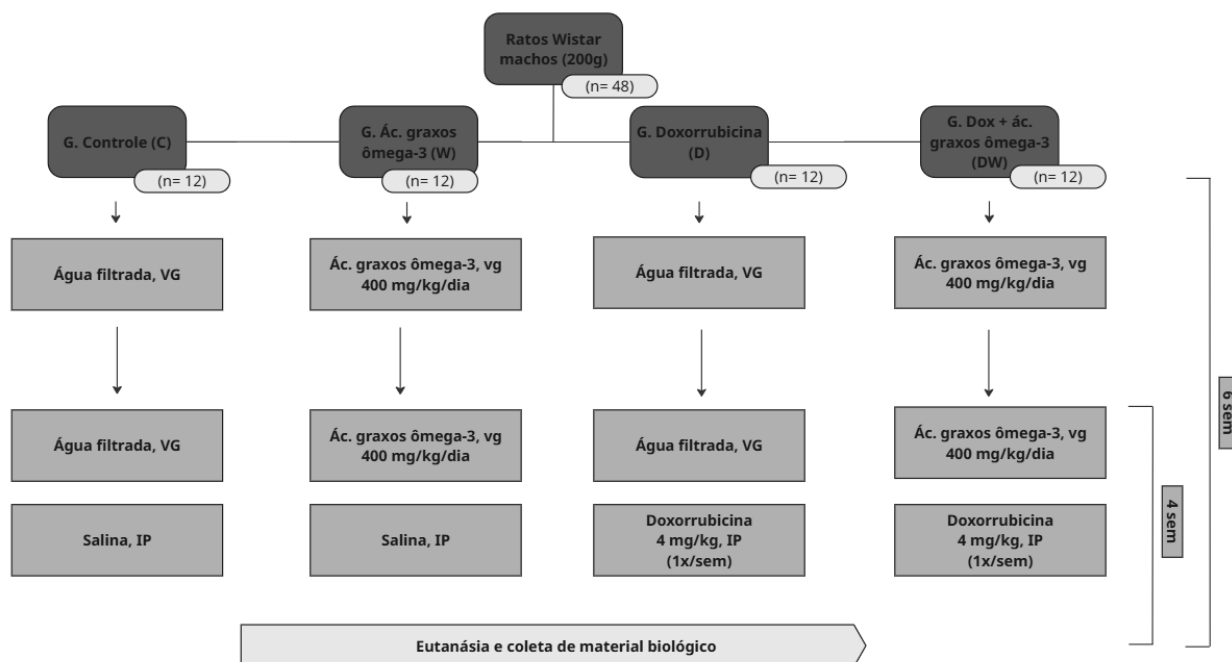
O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp (CEUA-1428/2023). Foram utilizados 48 ratos Wistar machos, com peso corporal aproximado de 200 g, mantidos em ambiente com temperatura controlada (25 °C), ciclo claro-escuro de 12 horas e livre acesso à água e à ração, com 2 animais por caixa (41x34x18 cm), em ambiente enriquecido com bolinhas de plástico, cordas de sisal e papéis toalha amassados. O peso corporal e a ingestão de ração dos animais foram mensurados no início e no final do experimento. Os ratos foram alocados em 4 grupos, com 12 animais cada: controle (C), doxorrubicina (D), suplementação de ácidos graxos ômega-3 (W) e doxorrubicina + suplementação de ácidos graxos ômega-3 (DW), conforme mostrado na Figura 1.

O experimento teve duração de 6 semanas. Durante essas 6 semanas, os animais dos grupos W e DW receberam ácidos graxos ômega-3 na dose de 400

mg/kg/dia, via gavagem, enquanto os grupos C e D receberam água filtrada via gavagem, em volume equivalente e na mesma frequência. A dose da suplementação foi definida com base em estudos experimentais prévios. Em ratos Wistar, a suplementação diária de ácidos graxos ômega-3 na dose de 400 mg/kg/dia por seis semanas mostrou-se segura e eficaz na atenuação de efeitos deletérios hepáticos e renais induzidos por doxorrubicina, evidenciando seu potencial anti-inflamatório e citoprotetor (43). Adicionalmente, protocolos experimentais que empregaram a mesma dosagem de ômega-3 (400 mg/kg/dia) em ratas durante a gestação e lactação relataram ausência de toxicidade significativa, reforçando a segurança dessa dose para investigações fisiológicas e metabólicas em modelos animais (46).

Na terceira semana de experimento, foi iniciado o tratamento com doxorrubicina nos animais dos grupos D e DW, via intraperitoneal (ip), na dose de 4 mg/kg/1x por semana, por 4 semanas, chegando à dose cumulativa de 16 mg/kg. Os animais dos grupos C e W receberam injeção de salina em volume equivalente, na mesma frequência que os demais grupos.

Ao final do período experimental, todos os animais foram submetidos à eutanásia, que foi realizada com dose excessiva de tiopental (120 mg/kg, ip), seguida de abertura do abdome para retirada do fígado. O fígado foi pesado, cortado em pequenos fragmentos que foram armazenados a -80 °C até o momento das análises biomoleculares ou fixados em formol para análises histológicas. Também foram coletadas amostras de 3 ml de sangue em tubo seco. O sangue foi centrifugado a 21°C por 15 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado a -80 °C.

Figura 1. Representação do delineamento do estudo**Figura 1.** C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega-3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega-3. VG: via gavagem. IP: via intraperitoneal.

Histologia

Após a eutanásia, foi obtida amostra do tecido hepático, que foi fixado em solução tamponada de formol a 10% por período de 24 horas. Após a fixação, a inclusão do tecido em bloco de parafina foi realizada para obtenção de cortes histológicos de 4 μ m. A coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) foi realizada para análise da estrutura geral do tecido e da presença de infiltrado inflamatório. As imagens foram capturadas por câmera acoplada ao microscópio utilizando objetiva 40X e analisadas pelo software *Image Pro-plus* (Media Cybernetics, Sever Spring, Maryland, EUA). Foram analisados 10 campos por lâmina.

Determinação de expressão proteica por Western blot

A técnica de *western blot* foi utilizada para quantificar as proteínas CPT1 e OXPHOS. Primeiramente, foram feitos a extração e o fracionamento subcelular das amostras com tampão RIPA na concentração 1:1, além de protease e inibidores de fosfatase, em aparelho *Bullet Blender Standard®* (de modelo BBX24, fabricado nos Estados Unidos) para romper e homogeneizar tecidos. O homogenato foi centrifugado a 15.000 rpm por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi transposto para novo tubo e

armazenado a -80 °C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de *Bradford* utilizando curva de *BSA Protein Standard* (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) como padrão.

Após a quantificação da concentração de proteína, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCl 240 mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200 mM) e aquecidas a 100 °C por 5 min, com exceção do coquetel OXPHOS, para o qual as amostras não podem ser aquecidas. Posteriormente, as amostras (contendo 30 μ g de proteína total) foram separadas por eletroforese utilizando sistema *Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell* (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCl 240 mM pH 15,6, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e resolução (Tris-HCl 240 mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4 °C. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução foi de 10 e 12%. Em um dos poços do gel foi aplicado padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) e nos demais poços foram pipetadas amostras aleatoriamente. A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2 horas a 120 V (*Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) com tampão de corrida (Tris 0,25 M, glicina 192 mM e SDS 1%).

A seguir, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema *Mini-Trans Blot* (*Bio-Rad, Hercules, CA, USA*) com auxílio do tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 60 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação.

Depois do bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos em solução de 3% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal. As membranas permaneceram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e incubadas com os anticorpos secundários específicos, diluídos em solução de 1% de leite em pó desnatado e dissolvida em basal. As membranas permaneceram incubadas por 90 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante.

Posteriormente, a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodetecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o *Immobilon® Classic Western HRP Substrate* (Millipore, made in the USA). A expressão de todas as proteínas analisadas foi normalizada pela expressão de proteínas na coloração de *Ponceau*. A análise das imagens foi realizada no programa *Image Pro Plus* (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EUA).

Anticorpos utilizados:

- CPT-1, *mouse monoclonal* (Santa Cruz Biotechnology, Inc., SC-393070), diluição [1:100];
- OXPHOS, *mouse monoclonal cocktail* (Abcam plc, Inc., 45-8099), diluição [1:250]. Anticorpos secundários utilizados:
- *Anti-mouse goat IgG H&L* (HRP), Abcam plc, Inc., AB-97023, diluição [1:5000] para CPT-1 e OXPHOS;

Análise de estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado pela concentração de malondialdeído (MDA) e da carbonilação de proteínas no tecido hepático. A concentração de MDA foi obtida pelo método TBARS (*Thiobarbituric acid-reactive substances*). Para quantificação, foram diluídos 200 µl de sobrenadante do homogenato de cada amostra com 500 µl de solução (TBA 0,67%, TCA 10%, HCl 0,25 N) e centrifugados por 10 minutos a 3500 rpm. Após, as amostras foram incubadas em banho-maria (aproximadamente 100 °C) por 45 minutos e, posteriormente, transferidas para microplaca (200 µl). A leitura foi realizada a 532 nm e 600 nm em leitor de microplaca Spectra Max190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos como concentração de MDA-TBA2 [µmol/L] corrigida por miligrama (mg) de proteína.

Para a análise da carbonilação de proteínas, foram adicionados 100 µl de sobrenadante de tecido para 100 µl de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M). As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, seguidas de adição de 50 µl de NaOH (6 M) e incubadas por mais 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA), sendo obtidos o valor da absorbância das amostras e o coeficiente de extinção molar (22000 M⁻¹ cm⁻¹). O resultado é expresso em nmol/mg de proteínas.

A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) também foi realizada no tecido hepático. A técnica para determinação da SOD se baseia na inibição da reação do ânion radical superóxido com o pirogalol. Para isso, utilizamos uma solução tampão (Tris-base 50 mmol/L; EDTA 1 mmol/L em pH 8,5) e pirogalol 2,6 mmol/L (em ácido clorídrico a 10 mmol/L). A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado por espectrofotometria a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado. Os resultados foram expressos em USOD/mg de proteína.

A atividade da CAT foi medida por meio da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio. Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, sendo esse comprimento onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Neste ensaio, foram utilizados os seguintes reagentes: solução tampão de fosfato de sódio 50 mmol/L + EDTA 1 mmol/L (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 0,3 mol/L. Foi monitorada a diminuição da absorbância do peróxido de hidrogênio no comprimento de onda selecionado. A concentração é expressa em moles/mg de proteína.

Dosagens bioquímicas

Foram dosadas as concentrações séricas de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicérides (TG) e glicemia dos animais utilizando kit comercial de método enzimático calorimétrico (*Bioclin*, Minas Gerais, BR), segundo orientações presentes nas bulas dos kits.

Análise de TGO e TGP

As atividades séricas de TGO (AST) e TGP (ALT) foram determinadas ao final do protocolo experimental. O sangue foi coletado, centrifugado para obtenção do soro e as amostras foram armazenadas a -80 °C até o momento das análises.

As dosagens foram realizadas por método cinético em ultravioleta (UV), utilizando kits comerciais da Bioclin (metodologia ITS.LB.027), conforme instruções do fabricante. As análises foram conduzidas em analisador bioquímico automático BS-200 Mindray (Mindray, China). Os resultados foram expressos em U/L.

Atividade das enzimas do metabolismo energético

Aproximadamente 30 mg de amostras do fígado foram homogeneizadas em 300 µl de solução tampão com 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, inibidor de protease e 0,1% Triton X-100, sob pH 7,4, usando mini esferas de vidro (0,5 mm), a 12000 rpm por 5 minutos a 4 °C em homogeneizador *Bullet Blender®* (Next Advance, Inc., NY, EUA). O homogenato foi centrifugado a 4000 rpm por 10 minutos, a 4°C. Amostras de 10 µl do sobrenadante foi utilizado para avaliar a atividade máxima das principais enzimas do metabolismo energético: hexoquinase (HK, EC 2.7.1.1), fosfofrutoquinase (PFK, EC 2.7.1.11), piruvato quinase (PK, EC 2.7.1.40), aldolase (EC 4.1.2.13), D-lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.28), citrato sintase (CS, EC 4.1.3.7), carnitina palmitoiltransferase I (CPTI, EC 2.3.1.21), e creatina quinase (CK, EC 2.7.3.2). Os ensaios foram realizados em duplicatas a 25 °C; a absorbância foi medida a cada 60 segundos durante 10 minutos no espectrofotômetro de microplacas *Agilent BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), na absorbância sob espectrofotometria a 340 nm ou 412 nm. O tampão de ensaio sem amostra foi utilizado como branco. A concentração de proteína foi analisada de acordo com o método de *Bradford*.

- Atividade enzimática da hexoquinase: o ensaio foi realizado em uma solução de pH 8,2 contendo 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 5 mM KCl, 0,2 mM NADH, 1 mM ATP, 1 mM glicose, 2 mM fosfoenolpiruvato, 2 U de lactato desidrogenase, 4 U de piruvato quinase e 0,05% de Triton X-100. O ensaio foi iniciado por adição de glicose.
- Atividade enzimática da fosfofrutoquinase: o ensaio foi realizado em uma solução de pH 8,2 contendo 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 5 mM KCl, 0,2 mM NADH, 1 mM ATP, 3 mM frutose-6-fosfato, 2 mM fosfoenolpiruvato, 2 U de lactato desidrogenase, 4 U de piruvato quinase e 0,05% de Triton X-100. O ensaio foi iniciado com adição de frutose-6-fosfato.
- Atividade enzimática da piruvato quinase: o ensaio foi realizado em uma solução de pH 7,4, contendo 38 mM de fosfato de potássio, 0,43 mM de fosfoenolpiruvato, 0,2 mM de β-NADH, 6,7 mM de sulfato de magnésio, 1,3 mM de adenosina-5'-difosfato, 20 U de lactato desidrogenase, 1 mM de frutose 1,6-difosfato e 0,05% de Triton X-100. O ensaio foi iniciado com adição de fosfoenolpiruvato (2 mM).
- Atividade enzimática da aldolase: o ensaio foi realizado em uma solução de 90 mM Tris, 1,9 mM frutose 1,6-diFosfato, 0,13 mM β-nicotinamida adenina

nucleotídeo, 5 a glicerofosfato desidrogenase/trifosfato isomerase e 0,025 – 0,050 aldolase. O ensaio foi iniciado com adição de frutose 1,6-bisfosfato (1,9 mM).

- Atividade enzimática da citrato sintase: o ensaio foi realizado em uma solução de 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 0,2 mM de DTNB, 0,1 mM de acetil-CoA, 0,5 mM de oxaloacetato e 0,05% de Triton X-100, pH 8,2. O ensaio foi iniciado pela adição de oxaloacetato (0,5 mM).
- Atividade enzimática da CPTI: o ensaio foi realizado em uma solução de 60 mM de Tris-HCl, 1,5 mM EDTA, 0,25 mM de DTNB, Triton X-100 0,05% (v/v), 0,035 mM palmitoil CoA e o homogeneizado (pH 8,1). A reação foi iniciada com a adição de L-carnitina (1,25 mM).
- Atividade enzimática da creatinoquinase: o ensaio foi realizado em uma solução de concentração final, 91,1 mM Tris-HCl, 1 mM ATP, 0,262 mM β -nicotinamida adenina nucleotídeo, 0,728 mM PEP, 10 mM creatina, 5 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 10 LDH e 0,4-0,06 piruvato quinase. A reação foi iniciada com a adição de creatina (10 mM).

Análise estatística

Os dados estão apresentados em média $\pm$ desvio padrão. A comparação entre os grupos foi realizada utilizando o teste estatístico *GLM (Generalized Linear Model)* com distribuição gama. Quando houve interação entre os fatores, ou seja, valor de p da interação $<0,05$, foram apresentados os resultados comparando os grupos de interesse por pós-teste de *Bonferroni*. Quando o p da interação foi $> 0,05$, foram apresentados os dados marginais, referentes ao efeito de cada fator isoladamente. Foi considerada significância estatística de 5% para todas as análises. O software estatístico Jamovi versão 2.3.18.0 foi utilizado para realização das análises.

RESULTADOS

Consumo de ração e peso corporal

Inicialmente, não foi observado diferença significativa no peso corporal e consumo de ração entre os grupos experimentais (figura 2A). Ao final do experimento, todos os animais que receberam doxorrubicina apresentaram perda de peso corporal e redução no consumo de ração significativos em comparação aos animais que não receberam doxorrubicina (figura 2B-C).

Figura 2. Consumo de ração e evolução de peso corporal

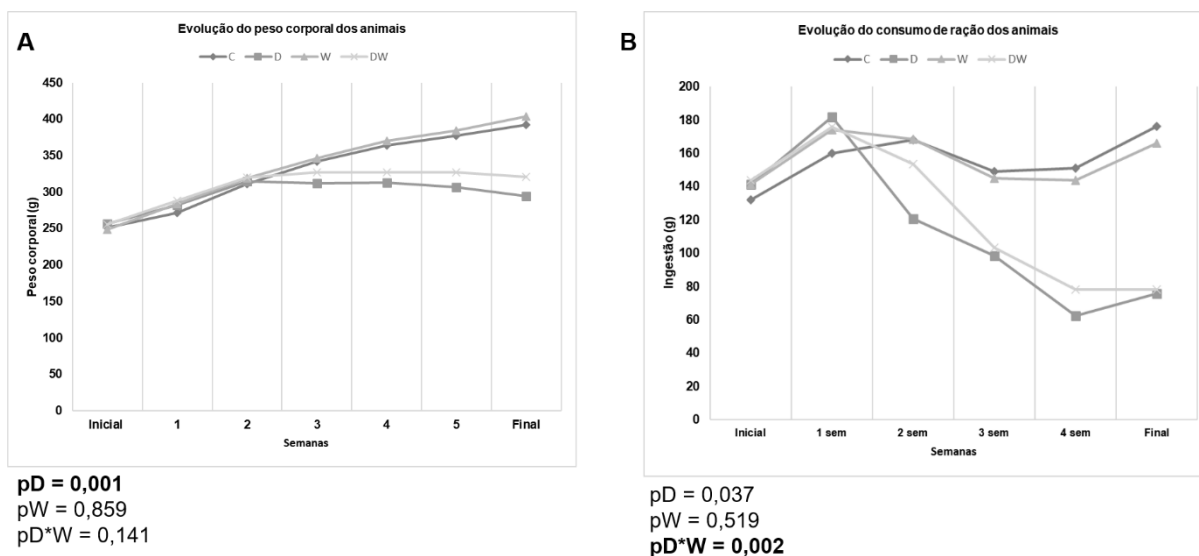


Figura 2. A: peso corporal inicial e final. **B:** consumo de ração inicial e final. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega-3; DW: grupo doxorrubicina + ácidos graxos ômega-3; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega-3; pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pDxW: valor de p para a interação entre os dois fatores. *Animais que receberam doxorrubicina foram diferentes dos animais que não receberam.

Peso do fígado dos animais

Todos os animais tratados com doxorrubicina apresentaram redução do peso do fígado em relação a todos os animais não tratados com o quimioterápico. Entretanto, quando o peso do fígado foi normalizado pelo peso corporal do animal, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos (figura 3).

Figura 3. Peso absoluto do fígado e peso hepático normalizado pelo peso corporal dos animais estudados.

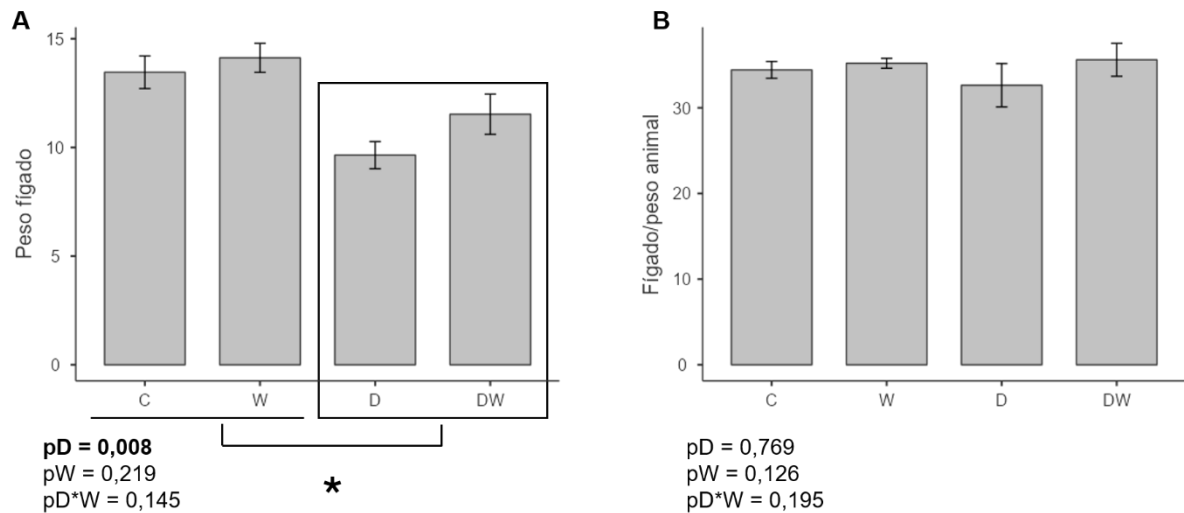


Figura 3. A: Peso do fígado. **B:** Peso do fígado normalizado pelo peso corporal. C: grupo controle; D: grupo doxorubicina; W: grupo ácidos graxos ômega-3; DW: grupo doxorubicina + ácidos graxos ômega-3; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega-3; pD: valor de p para o efeito da doxorubicina; pDxW: valor de p para a interação entre os dois fatores. *Animais que receberam doxorubicina foram diferentes dos animais que não receberam.

Análise histológica do tecido hepático

De acordo com a análise qualitativa do tecido hepático, não foram observadas diferenças histológicas relevantes entre os grupos experimentais (figura 4).

Figura 4. Análise histológica do tecido hepático.

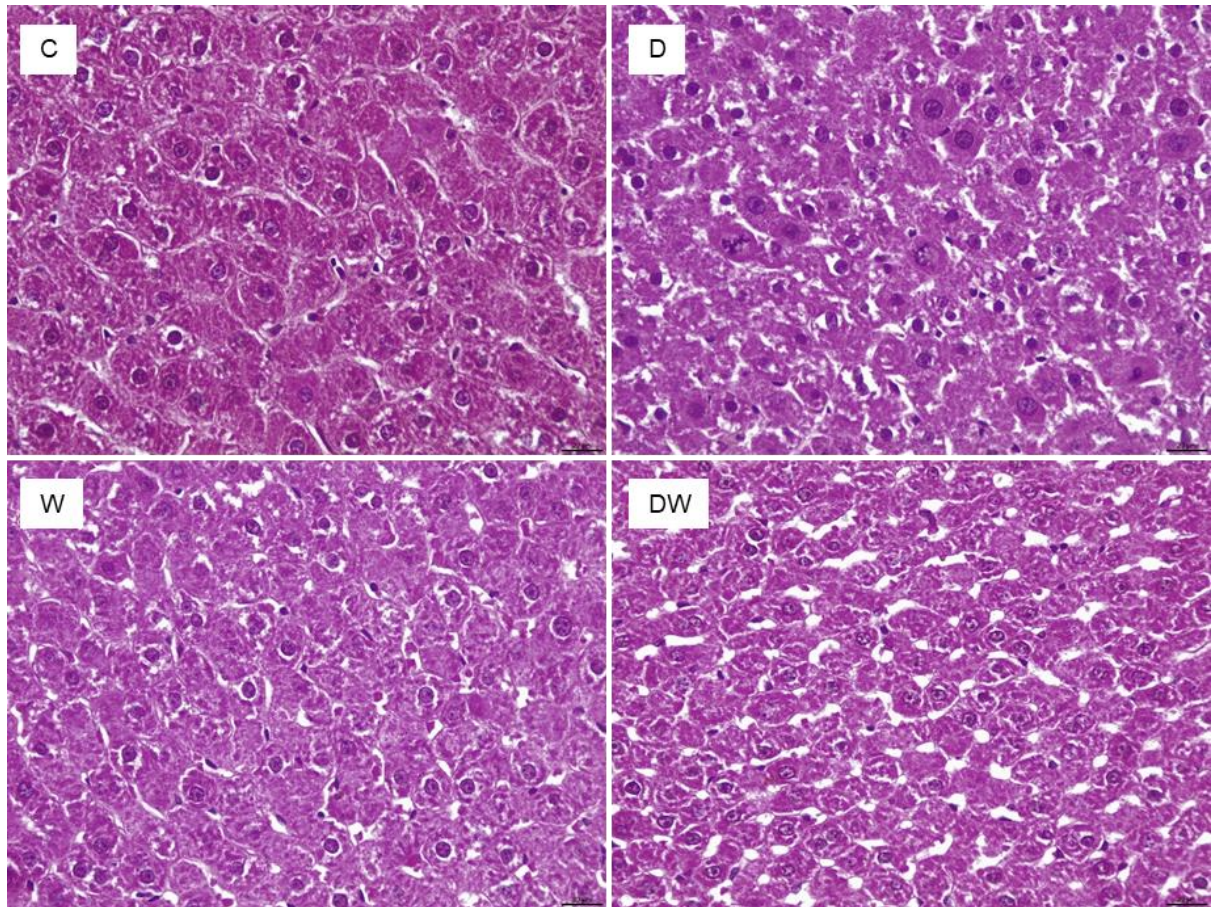


Figura 4. Tecido hepático corado com Hematoxilina-eosina. Imagens obtidas por microscópio com aumento de 40x. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega-3; DW: grupo doxorrubicina + ácidos graxos ômega-3.

Determinação da expressão proteica por Western Blot

Foram determinadas as expressões das proteínas CPT-1 e OX-PHOS no tecido hepático dos animais. A OX-PHOS é um coquetel de anticorpos com afinidade para os complexos I, II, III, IV e V da cadeia respiratória mitocondrial. Vimos que a expressão dos complexos I, II, III e V foi menor nos animais tratados com doxorrubicina em comparação aos animais não tratados com o quimioterápico (figura 5A-D). Não observamos diferença estatisticamente significativa na quantificação da proteína CPT-1 (figura 5E).

Figura 5. Expressão dos complexos I, II, III e V do coquetel OXPHOS e da proteína CPT-1.

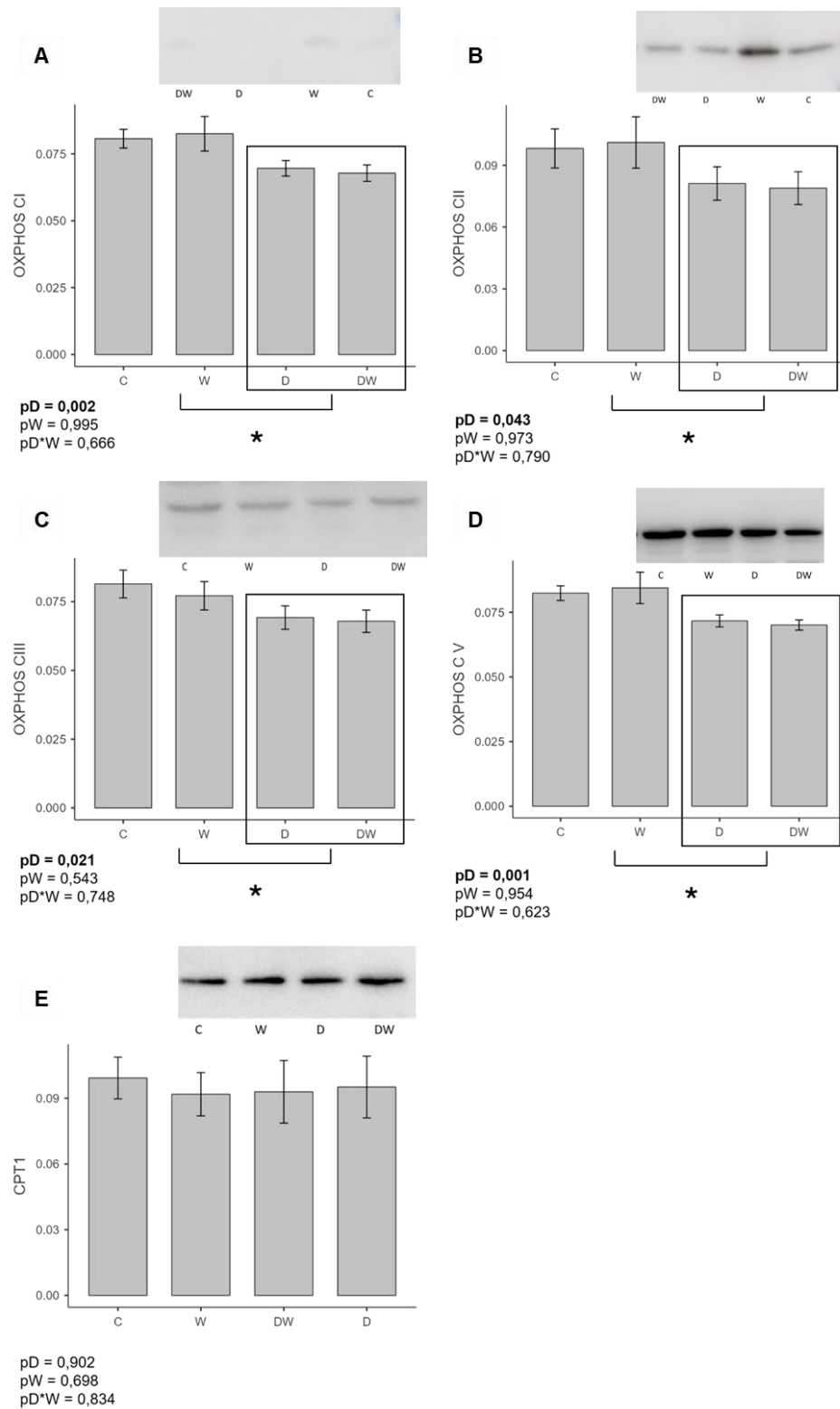


Figura 5. A-D: Expressão dos complexos I, II, III e V do coquetel OXPHOS. **E:** Expressão da proteína CPT-1. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega-3; DW: grupo doxorrubicina + ácidos graxos ômega-3; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega-3; pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina e pDxW: valor de p para a interação entre os dois fatores. * Animais que receberam doxorrubicina foram diferentes dos animais que não receberam.

Lipídeos séricos e glicemia

Conforme apresentado na Figura 6 (A-C), todos os animais tratados com doxorrubicina apresentaram concentrações séricas mais elevadas de colesterol total, triglicérides e glicemia quando comparados com todos os animais que não a receberam. A suplementação de ácidos graxos ômega-3 não foi capaz de atenuar as alterações causadas pela doxorrubicina.

Figura 6. Lipídeos séricos e glicemia

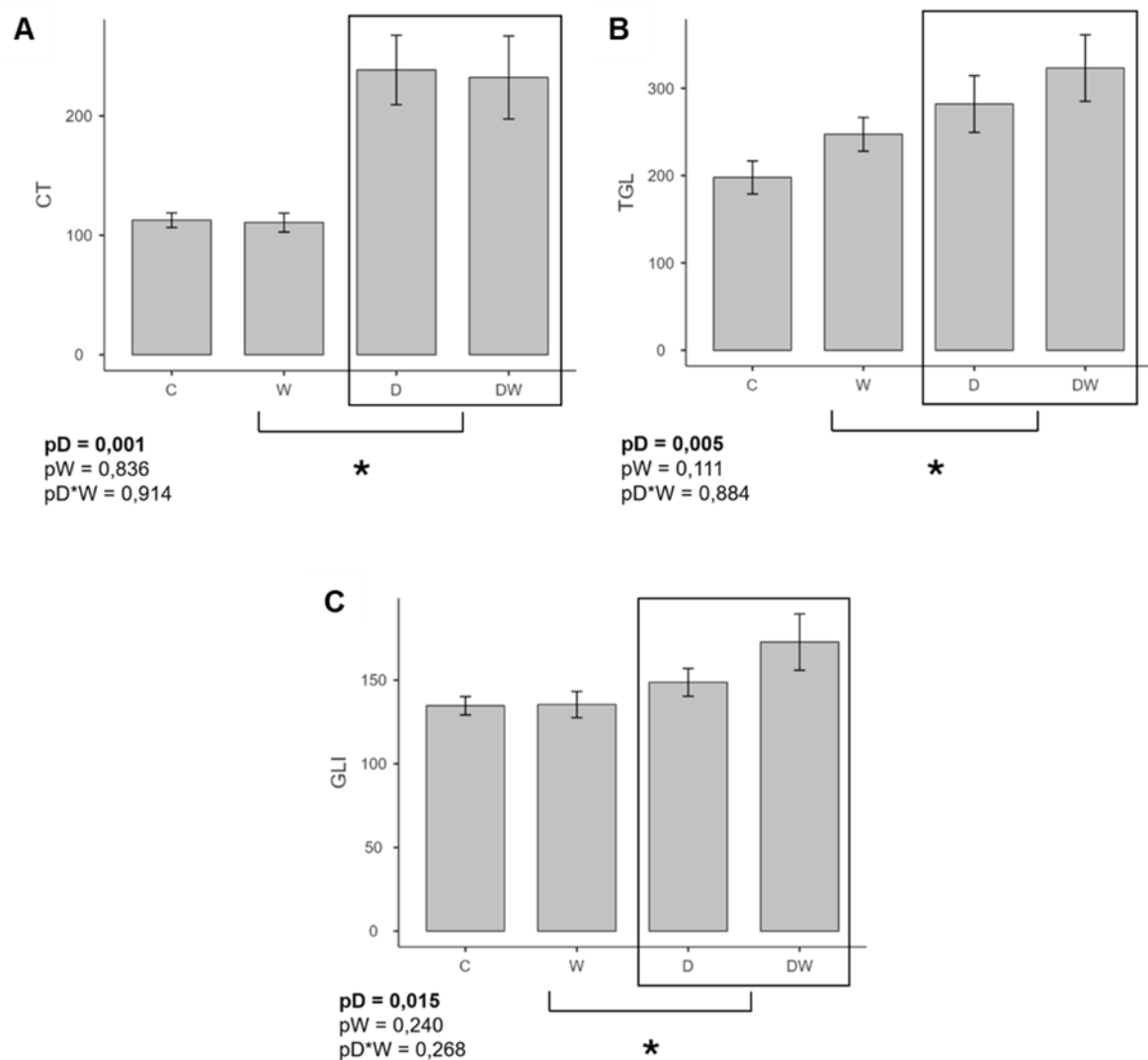


Figura 6. A. Concentrações séricas de colesterol total (CT); **B.** Triglicerídeos (TGL); **C.** Glicemia (GLI) nos grupos experimentais. C: grupo controle; W: grupo tratado com ácidos graxos ômega-3; D: grupo tratado com doxorrubicina; DW: grupo tratado com doxorrubicina associada aos ácidos graxos ômega-3. pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega-3; pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pDxW: valor de p para a interação entre os dois fatores.

TGO e TGP séricos

Os níveis séricos das enzimas hepáticas TGO e TGP foram significativamente influenciados pelo tratamento com doxorrubicina. Observou-se efeito significativo do fator doxorrubicina para ambas as enzimas, caracterizado por redução de seus níveis séricos, enquanto o tratamento com ácidos graxos ômega-3 não promoveu alteração significativa nesses marcadores. Além disso, não foi evidenciada interação significativa entre doxorrubicina e ácidos graxos ômega-3. Esses resultados indicam que a administração de doxorrubicina promoveu modificação funcional no perfil enzimático hepático, independentemente da suplementação com ácidos graxos ômega-3. Os valores estatísticos detalhados encontram-se apresentados na Figura 7 (A e B).

Figura 7. TGO e TGP séricos.

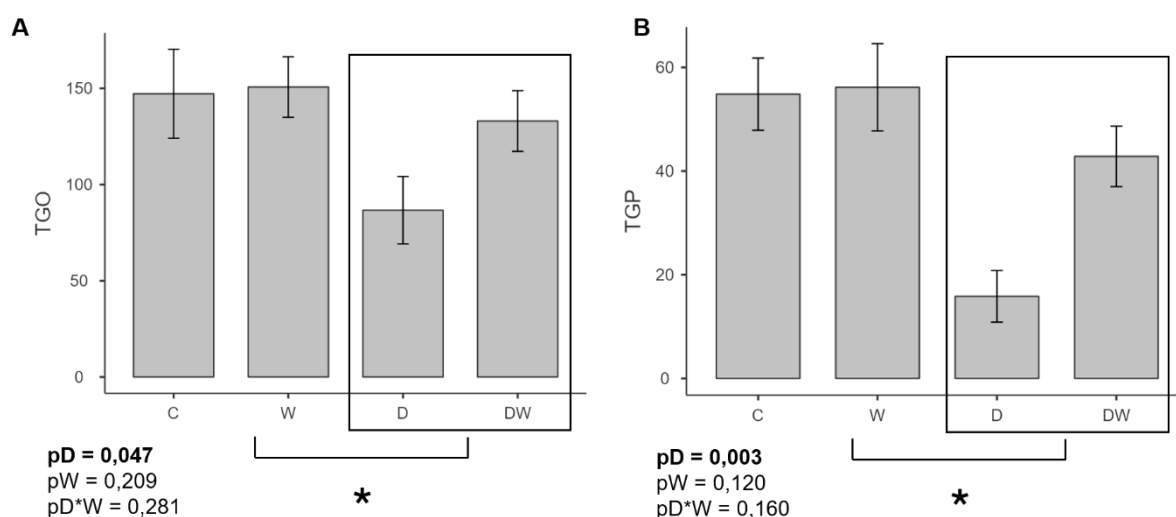


Figura 7. A. Concentrações séricas de TGO; **B.** Concentrações séricas de TGP nos grupos experimentais. C: grupo controle; W: grupo tratado com ácidos graxos ômega-3; D: grupo tratado com doxorrubicina; DW: grupo tratado com doxorrubicina associada aos ácidos graxos ômega-3. pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega-3; pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pDxW: valor de p para a interação entre os dois fatores.

Análise do estresse oxidativo

Ao analisarmos o estresse oxidativo no fígado, vimos que houve aumento das concentrações de MDA nos animais tratados com doxorrubicina em relação aos animais que não tratados com o quimioterápico, mas sem diferença estatisticamente significante (pD = 0,07). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na CBO. Por outro lado, a atividade da CAT apresentou aumento expressivo no grupo DW em comparação aos demais grupos experimentais, indicando que a

combinação das condições potencializou a atividade dessa enzima antioxidante. (tabela 1).

Tabela 1. Marcadores do dano oxidativo e atividade das enzimas antioxidantes

nmol/mg ptn	C (n = 10)	W (n = 10)	D (n = 10)	DW (n = 9)	pD	pW	pi
MDA	7,25 ± 2,41	8,49 ± 2,60	10,01 ± 4,27	10,02 ± 5,66	0,07	0,604	0,613
CBO	4,85 ± 1,15	4,99 ± 1,37	6,44 ± 3,51	4,90 ± 2,42	0,278	0,313	0,227
SOD	34,1 ± 10,12	33,1 ± 7,13	43,4 ± 19,56	39,5 ± 19,30	0,087	0,604	0,751
CAT	68,8 ± 23,2	70,1 ± 14,2	67,6 ± 28,4	109 ± 8,15*#&	0,028	0,012	0,020

Tabela 1. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega-3; DW: grupo doxorrubicina + ácidos graxos ômega-3; MDA: malondialdeído; CBO: carbonilação de proteínas; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase. pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega-3; pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina e pDxW: valor de p para a interação entre os dois fatores. Dados expressos em média ± desvio padrão. *: p < 0,05 quando comparado com grupo C #: p < 0,05 quando comparado com grupo D. &: p < 0,05 quando comparado com grupo W.

Análise do metabolismo energético

Os animais submetidos à suplementação de ácidos graxos ômega-3 apresentaram atividade reduzida das enzimas aldolase, citrato quinase e piruvato quinase, em comparação aos animais que não receberam o tratamento. Esses achados sugerem efeito modulador dos ácidos graxos ômega-3 sobre atividades enzimáticas relacionadas ao metabolismo energético celular. Por outro lado, as enzimas citrato sintase e fosfofrutoquinase não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados, indicando que a ação dos ácidos graxos ômega-3 pode ser seletiva sobre determinadas etapas metabólicas (tabela 2).

Tabela 2. Análise da atividade das enzimas do metabolismo energético celular

nmol/min /mg ptn	C (n = 11)	W (n = 13)	D (n = 10)	DW (n = 8)	pD	pW	pi
Aldolase	0,68 ± 0,24	0,46 ± 0,20	0,68 ± 0,11	0,63 ± 0,18	0,207	0,042	0,216
CK	1,24 ± 0,90	0,003 ± 0,005	1,20 ± 0,56	0,14 ± 0,38	0,807	<0,001	0,605
CPT1	0,42 ± 0,10	0,29 ± 0,09*	0,35 ± 0,05	0,38 ± 0,06	0,778	0,082	0,007

CS	4,09 ± 0,93	3,89 ± 1,11	3,74 ± 1,12	3,80 ± 0,90	0,515	0,895	0,698
HK	1,40 ± 0,42	1,09 ± 0,66	1,36 ± 0,28	2,17 ± 0,92 ^{&}	0,019	0,226	0,012
PFK	1,75 ± 0,65	2,02 ± 1,29	1,79 ± 0,52	1,46 ± 0,97	0,297	0,895	0,215
PK	0,65 ± 0,27	0,29 ± 0,12	0,55 ± 0,50	0,49 ± 0,13	0,561	0,021	0,098

Tabela 2. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega-3; DW: grupo doxorrubicina + ácidos graxos ômega-3. CK2: Citrato quinase; CPT1: Carnitina palmitoiltransferase 1; CS: Citrato sintase; HK: Hexoquinase; PFK: Fosfofrutoquinase; PK: Piruvato quinase. pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega-3; pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina e pDxW: valor de p para a interação entre os dois fatores. Dados expressos em média ± desvio padrão. *: p <0,05 quando comparado com o grupo C. &: p <0,05 quando comparado com o grupo DW.

DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a administração crônica de doxorubicina promoveu importantes alterações metabólicas hepáticas, piora do perfil bioquímico sérico e alterações no metabolismo energético celular, mesmo na ausência de alterações morfológicas detectáveis no fígado. A suplementação crônica de ácidos graxos ômega-3 por seis semanas foi capaz de modular parcialmente o metabolismo energético hepático, evidenciada pela redução da atividade das enzimas aldolase, citrato sintase e piruvato quinase, além de aumentar a atividade da catalase, embora não tenha revertido as alterações bioquímicas séricas induzidas pela doxorubicina. Em conjunto, esses achados sugerem potencial efeito hepatoprotetor parcial dos ácidos graxos ômega-3.

Evidências experimentais indicam que a hepatotoxicidade induzida por doxorubicina está fortemente relacionada à disfunção mitocondrial e à desorganização bioenergética precoce, as quais podem anteceder alterações estruturais e elevação de marcadores clássicos de lesão hepática (8). Além disso, estudos demonstram que modificações metabólicas hepáticas podem ocorrer mesmo na ausência de aumento de TGP, sugerindo que alterações mitocondriais representam estágio funcional inicial da toxicidade (47). A mitocôndria é reconhecida como um dos principais alvos subcelulares das antraciclinas, e intervenções capazes de modular sua função podem atenuar parcialmente os efeitos deletérios do fármaco (48). Assim, no presente modelo experimental, a redução das transaminases, associada ao comprometimento dos complexos da cadeia respiratória e à ausência de dano oxidativo estrutural, reforça a hipótese de um estado de hipometabolismo e disfunção bioenergética precoce, e não de necrose hepatocelular estabelecida.

As alterações metabólicas hepáticas encontradas em nosso estudo reforçam a hipótese de que a disfunção mitocondrial representa evento precoce na hepatotoxicidade induzida por esse quimioterápico, precedendo o aparecimento de lesões estruturais detectáveis. A doxorubicina interfere diretamente na cadeia transportadora de elétrons, comprometendo a fosforilação oxidativa, o que resulta em prejuízo da produção de ATP e da homeostase energética celular (6,18). A redução observada na expressão dos complexos I, II, III e V da cadeia transportadora de elétrons nos animais tratados com doxorubicina encontra respaldo consistente na literatura (49). Estudos experimentais demonstram que a doxorubicina se acumula preferencialmente na membrana mitocondrial interna devido à sua alta afinidade pela cardiolipina, interferindo diretamente na organização e na funcionalidade da cadeia

respiratória. Trabalhos clássicos mostram que o complexo I (NADH desidrogenase) é particularmente sensível à ação da doxorrubicina, apresentando redução de atividade mesmo em concentrações relativamente baixas do fármaco, o que compromete a transferência inicial de elétrons do NADH para a ubiquinona e favorece o escape eletrônico e a formação de espécies reativas de oxigênio (50).

Além disso, há evidências de que a doxorrubicina também prejudica a respiração mitocondrial dependente do complexo II (succinato desidrogenase), indicando que o comprometimento não se restringe apenas à via dependente de NADH, mas também afeta a integração entre o ciclo de Krebs e a cadeia respiratória. Embora o complexo II não bombeie prótons, sua redução limita o fluxo global de elétrons para a ubiquinona, impactando indiretamente a eficiência da fosforilação oxidativa. Esse mecanismo pode explicar por que, no presente estudo, observou-se comprometimento simultâneo de mais de um ponto de entrada de elétrons (51).

O complexo III (citocromo bc1), responsável pela transferência de elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo c e pelo bombeamento adicional de prótons, também é descrito como sítio relevante de produção de espécies reativas de oxigênio quando há acúmulo de elétrons na cadeia. A redução na sua expressão pode refletir tanto dano estrutural direto quanto desorganização dos supercomplexos mitocondriais, uma vez que a estabilidade funcional da cadeia respiratória depende da interação física entre os complexos I, III e IV (52). Assim, alterações primárias no complexo I podem repercutir estruturalmente sobre o complexo III, justificando padrões semelhantes de redução entre esses fatores (53).

No que se refere ao complexo V (ATP sintase), sua diminuição sugere repercussão funcional final da desorganização da cadeia respiratória, uma vez que a síntese de ATP depende diretamente do gradiente eletroquímico gerado pelos complexos I e III (54). Estudos indicam que a doxorrubicina reduz a eficiência da fosforilação oxidativa e a produção de ATP, mesmo antes da instalação de dano histológico evidente, corroborando os achados do presente trabalho (49). A redução do complexo V pode, portanto, representar consequência secundária da diminuição do fluxo eletrônico e do gradiente de prótons, refletindo comprometimento bioenergético global (55).

A literatura também descreve que a suscetibilidade dos complexos mitocondriais à doxorrubicina não é homogênea. O complexo I é frequentemente apontado como o mais sensível ao dano oxidativo e à interferência direta da droga,

enquanto alterações em outros complexos podem depender da dose, do tempo de exposição e da capacidade adaptativa celular (56). Essa heterogeneidade pode explicar por que alguns complexos apresentaram alterações mais pronunciadas entre os fatores avaliados, enquanto outros permaneceram relativamente preservados. Diferenças na composição estrutural — com subunidades codificadas tanto pelo DNA nuclear quanto pelo DNA mitocondrial — também podem contribuir para respostas distintas ao estresse oxidativo e à interferência farmacológica (57).

Resultados semelhantes aos nossos são descritos na literatura, nos quais não foram observadas alterações histológicas hepáticas após a administração de doxorrubicina, apesar da presença de estresse oxidativo elevado e disfunção mitocondrial (19,20). Esses dados indicam que alterações bioquímicas e metabólicas representam marcadores mais sensíveis para a detecção precoce da toxicidade hepática induzida por esse fármaco.

No presente estudo, os animais tratados com doxorrubicina apresentaram aumento das concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos e glicemia, independentemente da suplementação de ácidos graxos ômega-3. Esse achado está de acordo com estudos que mostram que a doxorrubicina promove dislipidemia e alterações no metabolismo glicídico, possivelmente em decorrência do aumento da lipólise periférica, maior fluxo de ácidos graxos para o fígado e resistência à ação da insulina (21,22). Embora os ácidos graxos ômega-3 seja amplamente descrito como agente hipolipemiante e modulador do metabolismo glicídico (23,24), no presente estudo sua suplementação não foi capaz de atenuar essas alterações, o que pode estar relacionado à intensidade da toxicidade induzida pela doxorrubicina, ao modelo experimental utilizado ou ao fato de que as alterações sistêmicas promovidas pelo quimioterápico ultrapassam a capacidade moduladora do suplemento nesse contexto.

A CPT-1 (carnitina palmitoiltransferase 1) é a enzima limitante da β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, localizada na membrana mitocondrial externa. Sua função é converter acil-CoA em acil-carnitina, permitindo o transporte do ácido graxo para o interior da mitocôndria, onde será oxidado para geração de acetil-CoA, NADH e FADH_2 (58). Dessa forma, a CPT-1 regula a entrada de substrato lipídico na mitocôndria e influencia diretamente a oferta de equivalentes redutores para a cadeia transportadora de elétrons.

No presente estudo, não houve diferença significativa na expressão da CPT-1 entre os grupos, mesmo diante das alterações nos complexos da cadeia respiratória.

Esse achado sugere que o comprometimento energético induzido pela doxorrubicina não ocorreu na etapa de transporte de ácidos graxos para a mitocôndria, mas sim em etapas posteriores da bioenergética, especialmente na fosforilação oxidativa. Ou seja, a entrada de substrato pode ter permanecido preservada, enquanto a utilização eficiente dos equivalentes redutores foi prejudicada pela disfunção da cadeia respiratória.

Além disso, a expressão proteica nem sempre reflete a atividade funcional da enzima, que pode ser modulada por mecanismos regulatórios, como a inibição por malonil-CoA. Assim, a ausência de alteração na CPT-1 reforça a hipótese de que o principal sítio de comprometimento metabólico, neste modelo, foi a cadeia transportadora de elétrons e não a β -oxidação propriamente dita.

A suplementação com ácidos graxos ômega-3 promoveu aumento da atividade da catalase, indicando ativação do sistema antioxidante enzimático. A catalase exerce papel fundamental na remoção do peróxido de hidrogênio e na prevenção da formação do radical hidroxila (26). Estudos experimentais mostraram que o ômega-3 pode aumentar a atividade de enzimas antioxidantes em diferentes modelos de estresse oxidativo (27,28).

Embora a doxorrubicina seja amplamente descrita como indutora de estresse oxidativo por meio da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria (6,18), no presente estudo não foram observadas diferenças significativas nos níveis de malondialdeído (MDA) ou carbonilação proteica entre os grupos experimentais. O MDA é um dos principais produtos finais da peroxidação lipídica, refletindo dano oxidativo a membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, enquanto a carbonilação proteica representa modificação oxidativa irreversível de proteínas estruturais e enzimáticas. Ambos são considerados marcadores clássicos de dano oxidativo estabelecido (59).

Estudos prévios demonstram que a elevação desses marcadores em modelos de toxicidade por doxorrubicina é dependente da dose cumulativa, da duração da exposição e do grau de comprometimento dos sistemas antioxidantes endógenos (19–21,25). Em modelos com maior carga oxidativa ou exposição prolongada, observa-se aumento significativo de MDA e carbonilação, frequentemente associado a redução da atividade de enzimas antioxidantes e presença de alterações histológicas evidentes (60). Por outro lado, há relatos de disfunção mitocondrial precoce sem

aumento concomitante desses marcadores, sugerindo que o comprometimento bioenergético pode anteceder o dano oxidativo estrutural mensurável (49).

Em nossos estudos anteriores (43,44), verificou-se que o aumento de MDA e carbonilação esteve mais consistentemente associado a condições de maior desregulação redox ou redução da capacidade antioxidante hepática. Quando houve preservação ou ativação compensatória de enzimas como catalase, os marcadores de peroxidação lipídica não se elevaram de forma significativa, mesmo na presença de insulto farmacológico (61). Esse padrão é semelhante ao observado no presente trabalho, no qual se identificou aumento da atividade da catalase, especialmente nos grupos suplementados com ômega-3.

Assim, a ausência de elevação de MDA e carbonilação neste modelo pode indicar que a geração de espécies reativas, embora possivelmente aumentada em nível mitocondrial devido à redução dos complexos da cadeia respiratória, foi eficientemente tamponada pelos mecanismos antioxidantes celulares. Esse cenário sugere que a lesão hepática induzida pela doxorrubicina, nas condições experimentais empregadas, encontra-se em estágio funcional e bioenergético inicial, no qual há desorganização da cadeia transportadora de elétrons sem progressão para dano oxidativo estrutural detectável. Portanto, nossos achados reforçam a noção de que alterações mitocondriais podem preceder o aumento de marcadores clássicos de estresse oxidativo, sendo estes últimos mais indicativos de falência compensatória do sistema antioxidante do que de disfunção mitocondrial isolada.

Este estudo apresenta algumas limitações, como a utilização de apenas uma dose de ômega-3, sem a avaliação de um possível efeito dose-resposta, e a ausência de análises de expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo energético e no sistema antioxidante. Além disso, embora o período de suplementação tenha sido de seis semanas, tempo suficiente para promover adaptações metabólicas, esse intervalo pode não ter sido suficiente para o desenvolvimento de alterações morfológicas hepáticas detectáveis. Por outro lado, destaca-se como ponto forte a utilização de um modelo de suplementação crônica associado à análise integrada do metabolismo energético, da função mitocondrial e do estresse oxidativo, permitindo uma avaliação funcional precoce da hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina, abordagem ainda pouco explorada na literatura.

Em conjunto, os resultados demonstram que a doxorrubicina promove disfunção mitocondrial hepática precoce, caracterizada por comprometimento da

cadeia transportadora de elétrons e desorganização bioenergética, mesmo na ausência de alterações morfológicas detectáveis ou aumento de marcadores clássicos de dano oxidativo. A suplementação crônica com ácidos graxos ômega-3, embora não tenha revertido as alterações bioquímicas sistêmicas, exerceu efeito modulador sobre o metabolismo energético hepático e fortaleceu o sistema antioxidante enzimático, evidenciado pelo aumento da atividade da catalase. O estudo amplia a compreensão dos mecanismos envolvidos na hepatotoxicidade induzida pela doxorrubicina e reforça a importância da identificação de estratégias capazes de modular precocemente alterações metabólicas antes do estabelecimento de dano irreversível.

CONCLUSÃO

A suplementação de ácidos graxos ômega-3 atenuou parcialmente os efeitos deletérios induzidos pela doxorubicina no fígado dos animais estudados. Observou-se modulação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético hepático, sugerindo ação reguladora do metabolismo celular.

Entretanto, a suplementação não foi capaz de reverter as alterações bioquímicas séricas nem restaurar completamente a função mitocondrial comprometida pela doxorubicina. Esses achados indicam que os ácidos graxos ômega-3 exercem efeito protetor parcial frente à hepatotoxicidade induzida pelo quimioterápico.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer - Estimativa – 2023 Incidência de Câncer no Brasil, 2023. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa_2023.pdf
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/caac.21660.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2022.
4. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2):185–229. doi:10.1124/pr.56.2.6.
5. Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Can Res Ther.* 2014;10(4):853.
6. Al-malky HS, Al Harthi SE, Osman AMM. Major obstacles to doxorubicin therapy: Cardiotoxicity and drug resistance. *J Oncol Pharm Pract.* 2020;26(2):434–44.
7. Demir M, Altinoz E, Koca O, Elbe H, Onal MO, Bicer Y, et al. Antioxidant and antiinflammatory potential of crocin on the doxorubicin mediated hepatotoxicity in Wistar rats. *Tissue and Cell.* 2023; 84:102182.
8. Prasanna PL, Renu K, Valsala Gopalakrishnan A. New molecular and biochemical insights of doxorubicin-induced hepatotoxicity. *Life Sciences.* 2020; 250:117599.
9. Halling JF, Pilegaard H. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2020;45(9):927–36.
10. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocrine Connections.* março de 2015;4(1):R1–15.
11. Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor VM. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biology.* 2017; 11:637–45.
12. Fujimaki S, Kuwabara T. Diabetes-Induced Dysfunction of Mitochondria and Stem Cells in Skeletal Muscle and the Nervous System. *IJMS.* 2017;18(10):2147.
13. Hesselink MKC, Schrauwen-Hinderling V, Schrauwen P. Skeletal muscle mitochondria as a target to prevent or treat type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2016;12(11):633–45.

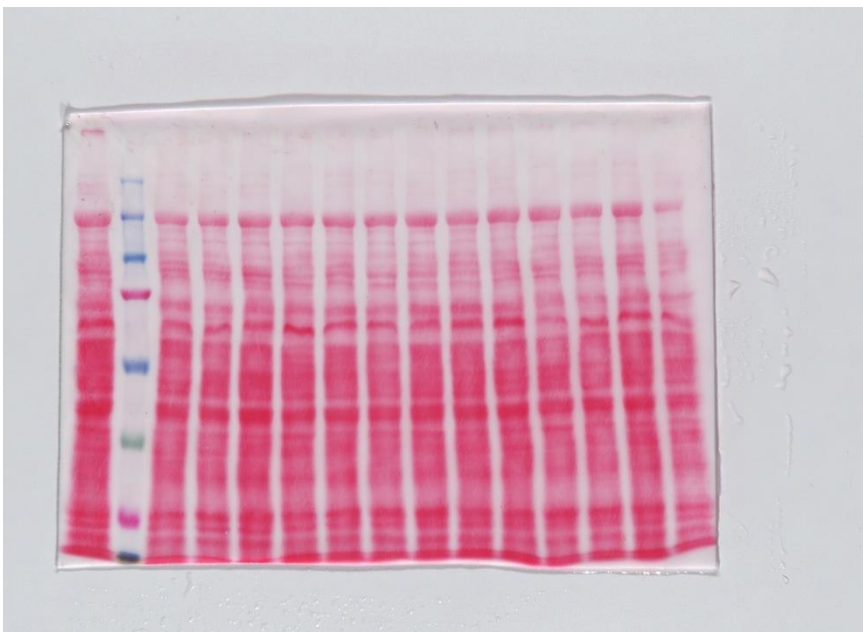
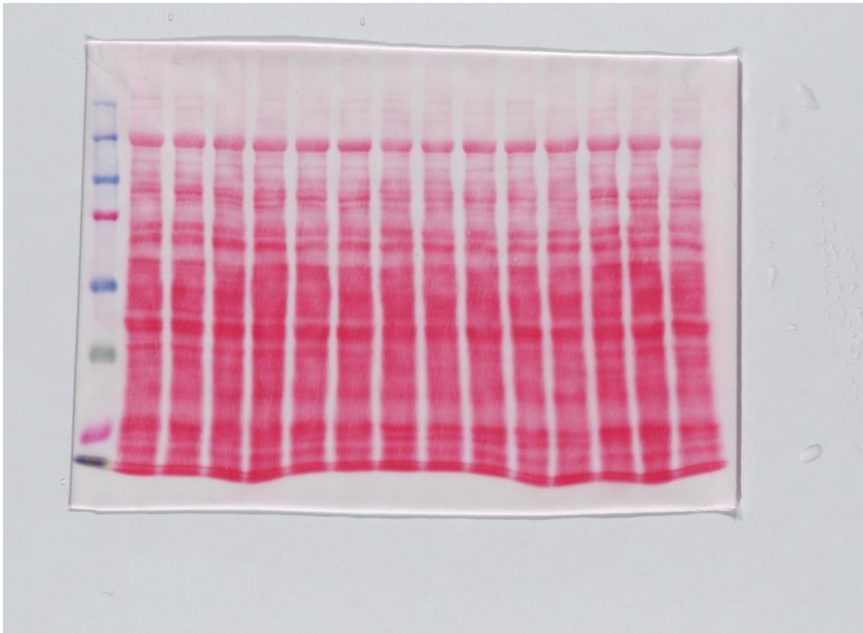
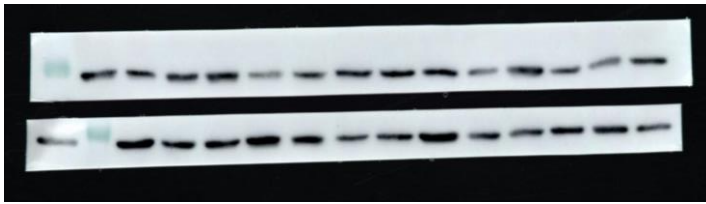
14. Tokarska-Schlattner M, Dolder M, Gerber I, Speer O, Wallimann T, Schlattner U. Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: Particular sensitivity of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2007;1767(11):1276–84.
15. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. [Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker]. *Wiad Lek*. 2004;57(9–10):453–5.
16. Park M, Hong J. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells*. 2016;5(2):15.
17. Lingappan K. NF- κ B in oxidative stress. *Current Opinion in Toxicology*. fevereiro de 2018; 7:81–6.
18. Daosukho C, Chen Y, Noel T, Sompol P, Nithipongvanitch R, Velez JM, et al. Phenylbutyrate, a histone deacetylase inhibitor, protects against Adriamycin-induced cardiac injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007;42(12):1818–25.
19. Pawłowska J, Tarasiuk J, Wolf CR, Paine MJ, Borowski E. Differential Ability of Cytostatics From Anthraquinone Group to Generate Free Radicals in Three Enzymatic Systems: NADH Dehydrogenase, NADPH Cytochrome P450 Reductase, and Xanthine Oxidase. *oncol res*. 2003;13(5):245–52.
20. Kassner N, Huse K, Martin HJ, Gödtel-Armbrust U, Metzger A, Meineke I, et al. Carbonyl Reductase 1 Is a Predominant Doxorubicin Reductase in the Human Liver. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(10):2113–20.
21. Štěrbá M, Popelová O, Vávrová A, Jirkovský E, Kovaříková P, Geršl V, et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Metal Chelation in Anthracycline Cardiotoxicity and Pharmacological Cardioprotection. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2013;18(8):899– 929.
22. Ifeanchi MO, Ikewuchi JC, Ikewuchi CC, Nweke PC, Okere R, Nwate TLB. Prevention of doxorubicin-induced dyslipidaemia, plasma oxidative stress and electrolytes imbalance in Wistar rats by aqueous leaf-extracts of *Chromolaena odorata* and *Tridax procumbens*. *Scientific African*. 2021;11: e00636.
23. Renu K, Vinayagam S, Madhyastha H, Madhyastha R, Maruyama M, Suman S, et al. Exploring the Pattern of Metabolic Alterations Causing Energy Imbalance via PPAR α Dysregulation in Cardiac Muscle During Doxorubicin Treatment. *Cardiovasc Toxicol*. 2022;22(5):436–61.
24. Zámbo V, Simon-Szabó L, Szelényi P, Kereszturi É, Bánhegyi G, Csala M. Lipotoxicity in the liver. *WJH*. 2013;5(10):550.
25. Arunachalam S, Tirupathi Pichiah PB, Achiraman S. Doxorubicin treatment inhibits PPAR γ and may induce lipotoxicity by mimicking a type 2 diabetes-like condition in rodent models. *FEBS Letters*. 2013;587(2):105–10.

26. Renu K, K.B. S, Parthiban S, S. S, George A, P.B. TP, et al. Elevated lipolysis in adipose tissue by doxorubicin via PPAR α activation associated with hepatic steatosis and insulin resistance. *European Journal of Pharmacology*. 2019; 843:162–76.
27. Sharma M, Tuaine J, McLaren B, Waters DL, Black K, Jones LM, et al. Chemotherapy Agents Alter Plasma Lipids in Breast Cancer Patients and Show Differential Effects on Lipid Metabolism Genes in Liver Cells. Calabresi L, organizador. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0148049.
28. De Lima Junior EA, Yamashita AS, Pimentel GD, De Sousa LGO, Santos RVT, Gonçalves CL, et al. Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signalling in skeletal muscle: Doxorubicin caused severe hyperglycaemia and insulin resistance. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. 2016;7(5):615–25.
29. Biondo LA, Lima Junior EA, Souza CO, Cruz MM, Cunha RDC, Alonso-Vale MI, et al. Impact of Doxorubicin Treatment on the Physiological Functions of White Adipose Tissue. Peterson J, organizador. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0151548.
30. Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L. *Biochemistry*. 8th ed. New York: W.H. Freeman; 2015.
31. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 7th ed. New York: W.H. Freeman; 2017.
32. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. *Eur J Biochem*. 1997;244(1):1–14.
33. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes. *Biochem J*. 1992;281(Pt 1):21–40.
34. Saad SY, Najjar TA, Alashari M. Doxorubicin-induced hepatotoxicity and oxidative stress: protective effect of antioxidants. *Pharmacol Res*. 2001;43(4):321–328.
35. Kumar D, Kirshenbaum LA, Li T, Danelisen I, Singal PK. Doxorubicin-induced oxidative stress and toxicity in rat liver. *Toxicology*. 2012;299(2–3):94–102.
36. El-Sayed EM, Mansour AM, El-Sawy WS. Protective effect of natural antioxidants against doxorubicin-induced hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol*. 2016;30(2):61–70.
37. Shahidi F, Ambigaipalan P. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2018;9(1):345–81.

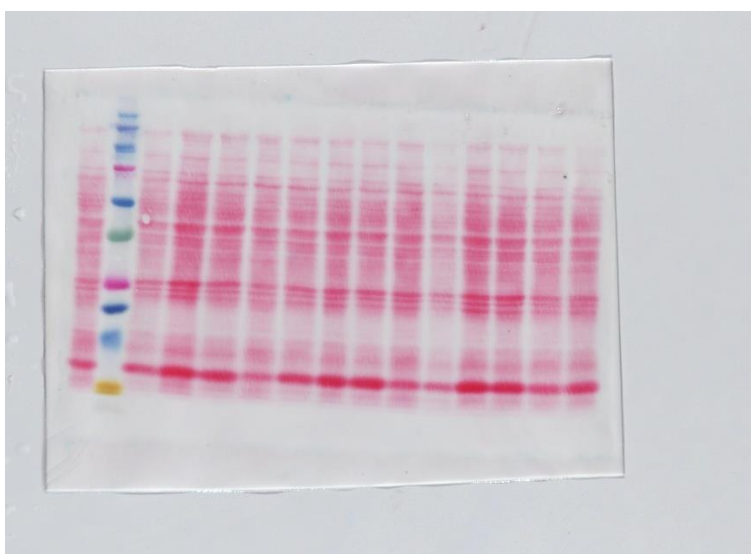
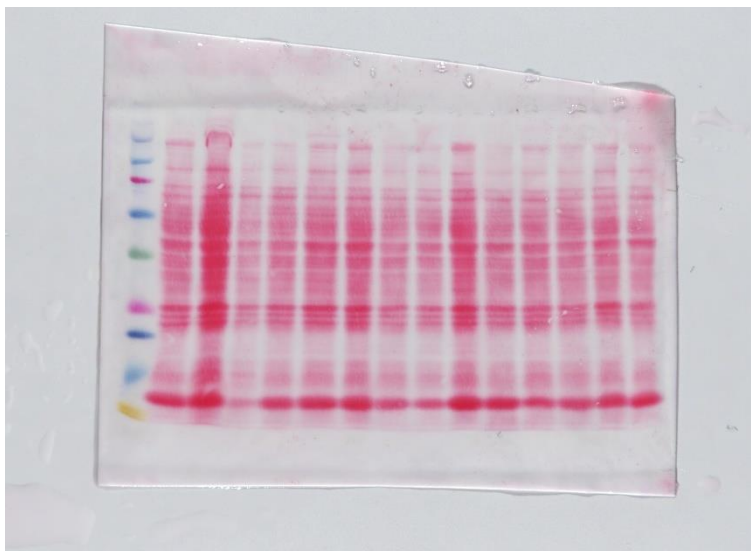
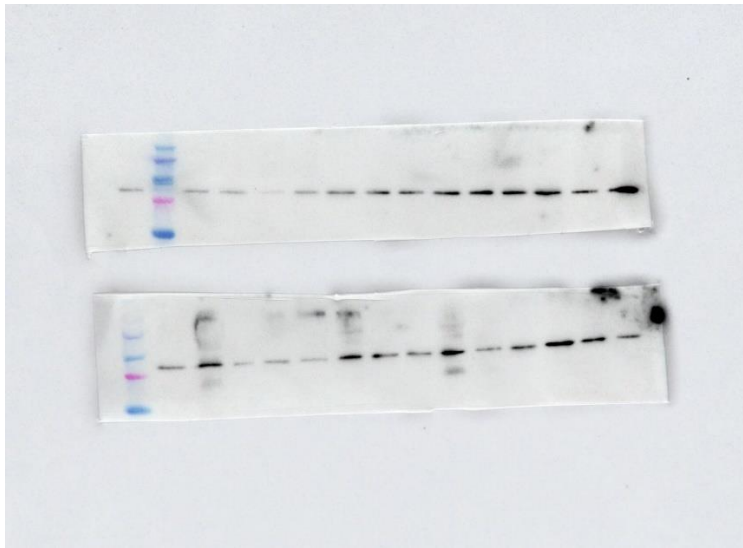
38. Lopez LB, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. High dietary and plasma levels of the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid are associated with decreased dementia risk: the rancho bernardo study. *J Nutr Health Aging*. 2011;15(1):25–31.
39. Chang CL, Deckelbaum RJ. Omega-3 fatty acids: mechanisms underlying 'protective effects' in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 2013;24(4):345–50.
40. Vell MS, Creasy KT, Scorletti E, Seeling KS, Hehl L, Rendel MD, et al. Omega-3 intake is associated with liver disease protection. *Front Public Health*. 2023; 11:1192099.
41. Jump DB, Depner CM, Tripathy S. Omega-3 fatty acid supplementation and nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2015;26(12):1261-1270.
42. Parker HM, Johnson NA, Burdon CA, Cohn JS, O'Connor HT, George J. Omega 3 supplementation and non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Hepatology*. 2012;56(4):944–51.
43. Moussa F, Abd El-gawad H, Mahmoud S, Mahboub F, Abdelseyd S. Protective effect of omega-3 on Doxorubicin-induced hepatotoxicity in male albino rats. *Journal of Bioscience and Applied Research*. 2020;0(0):0–0.
44. Espírito Santo, S. G. et al. Protective Effects of Omega-3 Supplementation against Doxorubicin-Induced Deleterious Effects on the Liver and Kidneys of Rats. *Molecules*, Basel, v. 29, n. 7, p. 3004, 2024.
45. Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans*. 2017;45(5):1105–1115.
46. Öztürk HN, Türker PF. Effect of omega 3 supplementation during pregnancy and lactation on cognitive functions in rat offspring. *PLoS One*. 2025;20(9):e0319457. doi:10.1371/journal.pone.0319457.
47. Pessayre D, Fromenty B. Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction and metabolic alterations in liver. *Mitochondrion*. 2019;46:1–10.
48. Santos-Alves E, Marques-Aleixo I, Rizo-Roca D, Torrella JR, Oliveira PJ, Magalhães J, et al. Exercise modulates doxorubicin-induced hepatic mitochondrial dysfunction. *Mitochondrion*. 2019;47:1–9.
49. Wallace KB. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol*. 2003;93(3):105–115.
50. Davies KJ, Doroshov JH. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. *J Biol Chem*. 1986;261(7):3060–3067.

51. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced hepatotoxicity: role of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;239(2):146–158.
52. Lenaz G, Genova ML. Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41(10):1750-72.
53. Schägger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*. 2000;19(8):1777–1783.
54. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1966;41(3):445-502.
55. Walker JE. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):1-16.
56. Doroshow JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res*. 1983;43(2):460-472.
57. Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutations in aging and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):519–529.
58. McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 1997;244(1):1-14.
59. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2006;329(1-2):23–38.
60. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 2006;52(4):601-623.
61. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.

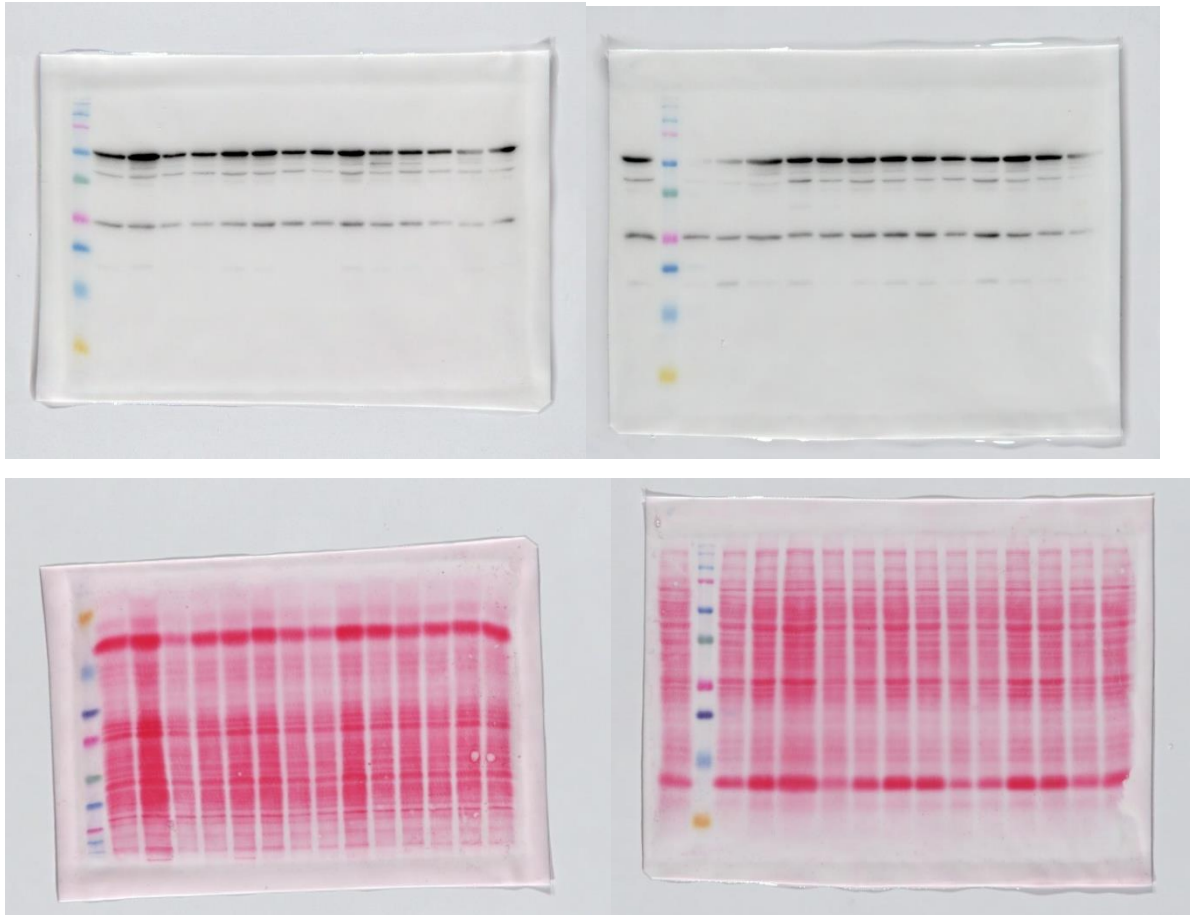
Anexo 1. Imagens dos géis de Western Blot proteína GAPDH e Ponceau.



Anexo 2. Imagens dos géis de Western Blot proteína CPT-1 e Ponceau.



Anexo 3. Imagens dos géis de Western Blot completo OXPHOS e Ponceu.



Anexo 4. Certificado de aprovação no CEUA.



Ofício nº 004/2024 – CEUA – FMB/UNESP

Botucatu, 27 de Fevereiro de 2024.

Ilma.Sra

Profa. Dra. Associada Bertha Furlan Polegato
Departamento de Clínica Médica – Unesp

Prezada Professora,

Em atendimento ao documento enviado em 30 de janeiro de 2024, solicitando a inclusão do Subprojeto e de colaborador referente ao Projeto de Pesquisa **"Influência da suplementação de ácidos graxos ômega 3 no metabolismo celular hepático em ratos tratados cronicamente com doxorrubicina"** (Protocolo CEUA 1428/2023). Reiteramos que a aprovação da solidificação pela CEUA não prevê a inclusão de nenhum animal adicional aos já solicitados no projeto de pesquisa **1428/2023**.

Subprojeto I: "Influência da suplementação de ácidos graxos ômega 3 na estrutura, regulação e funcionamento vascular de ratos tratados cronicamente com doxorrubicina."

Pesquisadora: Helena Beatriz Moura

Atenciosamente,

Profa. Dra. Débora C. Damasceno

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Faculdade de Medicina de Botucatu – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Av. Prof. Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/nº
Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) – Bloco V – Botucatu – S/P – CEP:18618-970
Telefone: (14) 3880-1880 – Voip e Whatsaap
E-mail: ceua.fmb@unesp.br ou sara.sampaio@unesp.br / **Site:** www.fmb.unesp.br

