UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE MEDICINA

ANDERSON SEIJI SOARES FUJIMORI

INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO DA TAK1 NA FISIOPATOLOGIA DA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS H9C2

Tese de doutorado apresentado à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, programa de pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu
2024

ANDERSON SEIJI SOARES FUJIMORI

INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO DA TAK1 NA FISIOPATOLOGIA DA CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA EM CÉLULAS H9C2

Tese apresentado à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de Botucatu, programa de pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu

2024

F961i

Fujimori, Anderson Seiji Soares
Influência da inibição da tak1 na fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em células h9c2 / Anderson Seiji Soares Fujimori. -- Botucatu, 2024
65 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Bertha Furlan Polegato

1. H9c2. 2. Inflamação. 3. TAK1. 4. NF-kB. 5. Cardiotoxicidade. I. Título.

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

IMPACTO ESPERADO DA TESE NA SOCIEDADE

A doxorrubicina é um medicamento importante no tratamento do câncer, mas pode causar danos ao coração como efeito colateral. Por isso, é fundamental encontrar formas de reduzir esses danos. A TAK1 é uma proteína que está ligada à inflamação e ao prejuízo cardíaco, e sua inibição pode ajudar a proteger o coração. Se conseguirmos controlar essa proteína, poderemos desenvolver tratamentos mais seguros para quem usa doxorrubicina. Isso abre portas para novas pesquisas que podem trazer soluções ainda melhores no futuro.

EXPECTED IMPACT OF THE THESIS ON SOCIETY

Doxorubicin is an important medication used in cancer treatment, but it can cause heart damage as a side effect. That's why it's crucial to find ways to reduce this harm. TAK1 is a protein linked to inflammation and heart damage, and inhibiting it could help protect the heart. By controlling this protein, we may develop safer treatments for those using doxorubicin. This opens the door for new research that could lead to even better solutions in the future.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ANDERSON SEIJI SOARES FUJIMORI, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA.

Aos 19 dias do mês de dezembro do ano de 2024, às 14h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ANDERSON SEIJI SOARES FUJIMORI, intitulada **Influência da inibição da Tak1 na fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pela Doxorrubicina em Células H9C2**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. BERTHA FURLAN POLEGATO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. AMANDA GOMES PEREIRA (Participação Virtual) do(a) Instituto de Pesquisa Clínica de Campinas - IPECC, Profa. Dra. MARIANA JANINI GOMES (Participação Virtual) do(a) Department of Kinesiology & Sport Management / Texas A&M University. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. 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

DEDICATÓRIA

À memória de minha amada amiga Carina Galvão de Souza.

Esta tese é dedicada a você, que partiu cedo demais, mas deixou uma marca profunda em minha vida e no coração de todos que tiveram o privilégio de conhecê-la. Que seu legado de bondade e resiliência continue a inspirar.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato, minha mais sincera gratidão por ter me concedido a oportunidade de realizar este trabalho. Seus ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento acadêmico e pessoal, e sua paciência nos momentos de dificuldade foi indispensável para que eu pudesse superar os desafios dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

A todos os docentes do Departamento de Clínica Médica, pelo apoio e pelas contribuições durante todo o projeto, meus sinceros agradecimentos.

À minha família, minha eterna gratidão pelo amor incondicional, apoio e compreensão ao longo de toda a minha trajetória. Vocês foram minha base e minha fortaleza nos momentos mais desafiadores, sempre me incentivando a continuar e a acreditar nos meus sonhos.

Ao meu namorado, Ryu, meu profundo agradecimento por estar ao meu lado durante os momentos mais difíceis desta jornada. Sua paciência, apoio e amor foram fundamentais para que eu pudesse seguir em frente, mesmo quando os desafios pareciam insuperáveis.

Aos meus colegas do grupo RECAN, pela parceria, amizade e contribuições.

Às minhas amigas Marina Gaiato, Luana, Lidiane, Mariana Gatto, Regina Moretto, Ana Paula, Sara e Vickeline, minha gratidão por sua amizade e apoio.

À Profa. Dra. Marina Politi Okoshi e seus orientados, pela parceria ao longo de todo o doutorado.

Aos servidores da UNIPEX, por todo o apoio e ajuda na realização das técnicas aplicadas neste trabalho.

Às Profas. Dras. Camila Corrêa, Patrícia Pintor e Luciane Alarcão, pelo apoio, pela ajuda nas técnicas realizadas e por me ajudarem em momentos decisivos.

RESUMO

A doxorrubicina é um quimioterápico utilizado com sucesso no tratamento de neoplasias sendo altamente eficaz. No entanto, sua administração pode provocar vários efeitos colaterais, sendo a cardiotoxicidade o mais grave deles. Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina ainda não estão completamente elucidados, mas o aumento do estresse oxidativo desempenha papel central. O aumento do estresse oxidativo ativa receptores *toll-like* (TLR), que desencadeia a a ativação da proteína TAK1, que por sua vez irá ativar o fator de transcrição kB (NF-kB), que migra para o núcleo celular. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da inibição da TAK1 na fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em células H9c2. Foi utilizado células da linhagem H9c2 para a formação de 4 grupos de tratamento: controle, doxorrubicina, inibidor da TAK1 e doxorrubicina + inibidor da TAK1. A inibição da TAK1 foi realizada por meio do tratamento com 5Z-7-oxozeaenol de forma isolada e na presença de doxorrubicina na dose de 25 mM, no período de 26 horas. As células tratadas com doxorrubicina apresentaram menor viabilidade quando comparado às células não tratadas. Não houve efeito do inibidor de TAK1 na viabilidade celular. Observamos, pela técnica de Western blot, que houve diminuição da expressão de TAK1 nas células tratadas com 5Z-7-oxozeaenol, acompanhada de diminuição de IkB-α. A expressão de IkB-α também foi diferente no tratamento com doxorrubicina, sendo que o grupo tratado com doxorrubicina e inibidor de TAK1 apresentou maior expressão dessa proteína quando comparado ao grupo que só recebeu doxorrubicina. Não houve diferença na imunofluorescência em relação à marcação de TAK1 e NF-kB. Concluímos, com isso, que a TAK1 não participou, em nosso estudo, da lesão celular induzida pela doxorrubicina.

Palavras-chave: H9c2; inflamação; TAK1; NF-kB; doxorrubicina; cardiotoxicidade.

ABSTRACT

Doxorubicin is a chemotherapeutic successfully used in the treatment of neoplasms and is highly effective. However, its administration can cause several side effects, with cardiotoxicity being the most severe. The pathophysiological mechanisms involved in doxorubicin-induced cardiotoxicity are not yet fully elucidated, but increased oxidative stress plays a central role. Elevated oxidative stress activates toll-like receptors (TLR), triggering the activation of TAK1 protein, which in turn activates the transcription factor NF-kB, leading to its migration into the cell nucleus.

The study aimed to evaluate the effect of TAK1 inhibition on the pathophysiology of doxorubicin-induced cardiotoxicity in H9c2 cells. H9c2 cell lines were used to create four treatment groups: control, doxorubicin, TAK1 inhibitor, and doxorubicin + TAK1 inhibitor. TAK1 inhibition was performed using 5Z-7-oxozeaenol, either alone or in the presence of 25 µM doxorubicin, for a period of 26 hours. Cells treated with doxorubicin showed lower viability compared to untreated cells. There was no effect of the TAK1 inhibitor on cell viability. Through the Western blot technique, we observed a decrease in TAK1 expression in cells treated with 5Z-7-oxozeaenol, accompanied by a decrease in IkB-α. IkB-α expression also differed with doxorubicin treatment, with the group treated with doxorubicin and the TAK1 inhibitor showing higher expression of this protein compared to the group treated with doxorubicin alone. No differences were observed in TAK1 and NF-kB immunofluorescence labeling. We concluded that TAK1 did not play a role in doxorubicin-induced cellular damage in our study.

Keywords: H9c2; inflammation; TAK1; NF-kB; doxorubicin; cardiotoxicity.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Absorbância relativa por cristal violeta. 37
Tabela 3 - Precipitação de proteína com TCA..... 39
Tabela 4- Intensidade de fluorescência TAK1 e NF-kB 40
Tabela 5- Expressão proteica por western blot 42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Via da ativação do NF-kB mediada pela TAK1 24
Figura 2- Morfologia celular após tratamento com a DOX..... 37
Figura 3 - Morte celular por absorbância relativa 38
Figura 4- Marcação por imunofluorescência..... 40
Figura 5 – Expressão de TAK1 para validação do 5Z-7-oxozeaenol..... 36
Figura 6 - Membranas de Western blot..... 41

LISTA DE ABREVIAÇÕES

BDIX – Linhagem celular de mioblastos cardíacos de rato.
COX – Cicloxigenase-2, uma enzima associada à inflamação.
DNA – Ácido Desoxirribonucleico.
DAPI – Corante usado para marcar núcleos celulares.
DMEM – Meio de cultura celular Dulbecco's Modified Eagle Medium.
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético, usado como agente quelante.
ERK – Quinase Regulada por Sinais Extracelulares, envolvida em sobrevivência celular.
IL-10 – Interleucina-10, com ação anti-inflamatória.
NF-kB – Fator Nuclear Kappa B, envolvido em respostas inflamatórias.
SFB – Soro Fetal Bovino (Thermo Fisher Scientific, EUA).
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio, usado em eletroforese.
TAC – Proteínas ligadoras de TAK1.
TGF-beta – Fator de Transformação do Crescimento Beta.
TLR – Receptores Toll-like, importantes em respostas imunes.

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral Alfa, uma citocina inflamatória.

TCA – Ácido Tricloroacético, usado na precipitação de proteínas.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 18
OBJETIVO 25
MATERIAL E MÉTODOS 27
Delineamento 28
Cultura celular 29
Ensaio de citotoxicidade por cristal violeta 30
Determinação da expressão proteica por Western blot 30
Extração proteica 31
Precipitação de proteína por ácido tricloroacético (TCA) 31
SDS-PAGE - Eletroforese 31
Imunfluorescência 33
Análise estatística 34
RESULTADOS 35
Cultura celular 36
Análise da expressão proteica de TAK1 para o ensaio de eficácia do 5Z-7-oxozeaenol 36
Ensaio de citotoxicidade com cristal violeta 37
Precipitação de proteína para SDS-PAGE 38
Imunofluorescência 39
Análise da expressão proteica por Western blot 41
DISCUSSÃO 43
CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS 54
ANEXO 56
REFERÊNCIAS 58

INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas constituem uma das mais importantes causas de mortalidade em todo o mundo e sua incidência cresce de maneira expressiva devido ao envelhecimento da população e adoção de hábitos não saudáveis de vida. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), a estimativas de incididência de câncer no mundo em 2022 foi de 20 milhões de novos casos. (1) No Brasil, entre 2023 e 2025 são esperados 704 mil novos casos de câncer.(2). Apesar de observamos grandes avanços no tratamento para cura dessas doenças, não é raro o aparecimento de complicações da terapêutica, que contribuem para o aumento da morbidade desses pacientes. (3)

A doxorrubicina é um quimioterápico da classe das antraciclinas utilizada com sucesso em inúmeros esquemas de tratamento de neoplasias em adultos e crianças desde a década de 60, principalmente para tratamento de câncer de mama e neoplasias hematológicas, como linfomas e leucemias. (4) Sua ação contra células neoplásicas acontece, principalmente, devido a sua interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA) celular, ligando-se à topoisomerase 2α impedindo sua ação de ajuste da dupla hélice de DNA durante a replicação e transcrição que, em última instância, provoca a morte da célula (5–7).

Apesar de altamente efetiva contra o câncer, a administração da doxorrubicina pode provocar vários efeitos colaterais, sendo a cardiotoxicidade o mais grave deles. Pode ocorrer em até 5% dos pacientes submetidos à quimioterapia. (8) O aparecimento da cardiotoxicidade muitas vezes limita o tratamento e, consequentemente, o sucesso da terapêutica. A cardiotoxicidade pode ser dividida em quatro apresentações clínicas: aguda, subaguda, crônica e tardia. A forma crônica apresenta repercussões clínicas mais intensas, manifestando-se em semanas a meses após a infusão da droga. Podemos observar nesses pacientes o aparecimento de miocardiopatia dilatada e quadro clínico característico de insuficiência cardíaca, sendo essas alterações irreversíveis e potencialmente letais (6,9,10).

O surgimento da cardiotoxicidade é dose-dependente, mas pode se manifestar mesmo com doses baixas (113 mg/m $^{2)}$ em indivíduos susceptíveis.(11). Os fatores de risco para surgimento da cardiotoxicidade são: extremos de idade, uso de outros quimioterápicos ou radioterapia do mediastino concomitantes, sexo feminino e presença de doenças cardiovasculares prévias (12). Apesar da forma

clínica mais frequente ser a cardiotoxicidade crônica, sabe-se que o dano miocárdico, inclusive com presença de disfunção ventricular esquerda, acontece muito precocemente (13,14).

Embora as recomendações atuais indiquem rastreio da cardiotoxicidade por meio de dosagem de biomarcadores, como troponinas, e realização de ecocardiograma antes e após cada novo ciclo de tratamento, ainda não existe um método padrão-ouro e que faça o diagnóstico nas fases mais iniciais da lesão cardíaca. Além disso, as opções terapêuticas para prevenção da cardiotoxicidade são escassas e não são altamente efetivas (5,15).

Devido ao grande impacto da cardiotoxicidade, principalmente na população pediátrica em que as antraciclinas estão presentes em 60% dos esquemas de tratamento (12), é importante o entendimento completo da fisiopatologia dessa complicação. No entanto, os mecanismos responsáveis pelo aparecimento da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina ainda não estão completamente elucidados. Há evidências de que, na fase inicial, ocorra ativação de metaloproteinases de matriz, alterações do metabolismo energético miocárdico, aumento da inflamação, da apoptose e do estresse oxidativo (13,14,16,17).

Tradicionalmente, é atribuído ao aumento do estresse oxidativo um papel central na fisiopatologia da cardiotoxicidade. A doxorrubicina pode gerar espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio por diversas vias. Este quimioterápico apresenta alta afinidade com a cardiolipina da membrana mitocondrial, formando uma ligação permanente, o que impossibilita o adequado funcionamento dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Como consequência, ocorre acúmulo de elétrons desemparelhados, maior formação de espécies reativas de oxigênio e diminuição da produção de adenosina trifosfato (ATP) (18,19).

Outra fonte de geração de espécies reativas de oxigênio é mediada pela interação da doxorrubicina com o ferro. Também há evidências de que a doxorrubicina é capaz de reduzir no meio intracelular as proteínas reguladoras do ferro e, assim, perpetuar a fonte de geração de espécies reativas (18). Além dessa via de geração de espécies reativas de oxigênio, podemos destacar a formação de espécies reativas de nitrogênio a partir da ligação da doxorrubicina com o domínio redutase do óxido nítrico sintase (19).

O aumento do estresse oxidativo está intrinsecamente ligado ao aumento da inflamação. As superfícies celulares exibem uma série de receptores denominados receptores Toll-like (TLR), que estão relacionados com a sinalização intracelular que desencadeia resposta inflamatória. Estão presentes, principalmente, na superfície de leucócitos, mas os TLR2 e TLR4 também são expressos nas membranas dos cardiomiócitos (20,21). Normalmente, esses receptores são estimulados por constituintes de patógenos, como bactérias e vírus, entretanto o aumento do estresse oxidativo é um potente estimulador dos TLR (22,23).

No citoplasma celular, a ativação dos TLR irá provocar ativação do fator associado ao receptor de TNF 6 (TRAF6), que por sua vez será ubiquitinado e passará a interagir com as proteínas ligadoras de TAK1 (TAB). A formação do complexo TAB-TAK1 permite a ativação da proteína TAK1 (23).

A TAK1 é membro da família das proteínas ativadas por mitógenos 3 quinase e foi identificada em 1995 como uma proteína quinase ativada pelo fator de crescimento beta (TGF-β) e pela proteína morfonegética óssea (24). No entanto, estudos subsequentes evidenciaram que diversos estímulos poderiam ativá-la, como TNF-α (fator de necrose tumoral alfa), IL-1β (interleucina-1β), e os já citados TLR (23,25). Essa proteína vem ganhando muito destaque recentemente devido ao seu papel fundamental na modulação da resposta inflamatória em diversos modelos de remodelação cardíaca.

A TAK1 promove a ativação de fatores transcricionais, como o fator transcricional kB (NF-kB). Este encontra-se inativado quando associado à proteína regulatória IkB. Para ativar o NF-KB é necessária a fosforilação da IkB. Essa fosforilação é mediada pela proteína IKK (25,26). Após a ativação do NF-kB, este migra para o núcleo celular, onde irá interagir com o DNA e regular a expressão de genes que codificam citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, fatores de crescimento, enzima cicloxigenase-2 (COX-2) e enzima óxido nítrico sintase (27,28). Dentre as citocinas inflamatórias podemos destacar o TNF-α, que está associado à disfunção ventricular, apoptose, hipertrofia e fibrose (29).

Existem diversas alterações pós-translacionais do complexo TAK1-TAB que podem modular a ativação da TAK1. Entre essas alterações pós-translacionais podemos destacar a fosforilação, ubiquitinação, metilação e acetilação (23,26). A ubiquitinação é um processo dinâmico e a principal ação da ubiquitina é sinalizar

proteínas a serem degradadas por um complexo multiproteico denominado proteassoma. No entanto, a ubiquitinação também pode modificar essas proteínas para regularem diferentes funções biológicas intracelulares (23,30). Trata-se de um processo reversível e enzimas denominadas desubiquitinases competem com o proteassoma removendo ubiquitinas terminais da cadeia.

Dentre essas enzimas desubiquitinases, podemos destacar a CYLD e o complexo ITCH (CYLD-ITCHY E3 ligase), que previnem a ativação da TAK1 por promover sua desubiquitinação (31). Inicialmente, a CYLD cliva as cadeias poliubiquitinadas na lisina 43 e, posteriormente, o complexo ITCH catalisa a poliubiquitinação na lisina 48, levando a redução da ativação e a degradação da TAK1 (23). Ahmed et al. mostraram que a deficiência do complexo ITCH ou da CYLD causa ativação sustentada da TAK1, aumento da produção de citocinas pelos macrófagos e progressão do carcinoma pulmonar (31).

A ativação do TLR2 também parece estar envolvida na fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina. Estudo realizado por Nozaki e colaboradores com animais *knockout* para TRL2 tratados com doxorrubicina evidenciou que estes animais apresentaram diminuição de TNF-α, IL-6 e IL-1β e também melhor função cardíaca quando comparados com os ratos wistar não *Knockout* (17). Adicionalmente, foi observado aumento de TGF-β (32,33), bem como ativação precoce de NF-kB (34) e aumento da expressão da proteína IKK (35) nos modelos de cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, o que nos faz acreditar que a proteína TAK1 possa também estar relacionada ao surgimento dessa complicação.

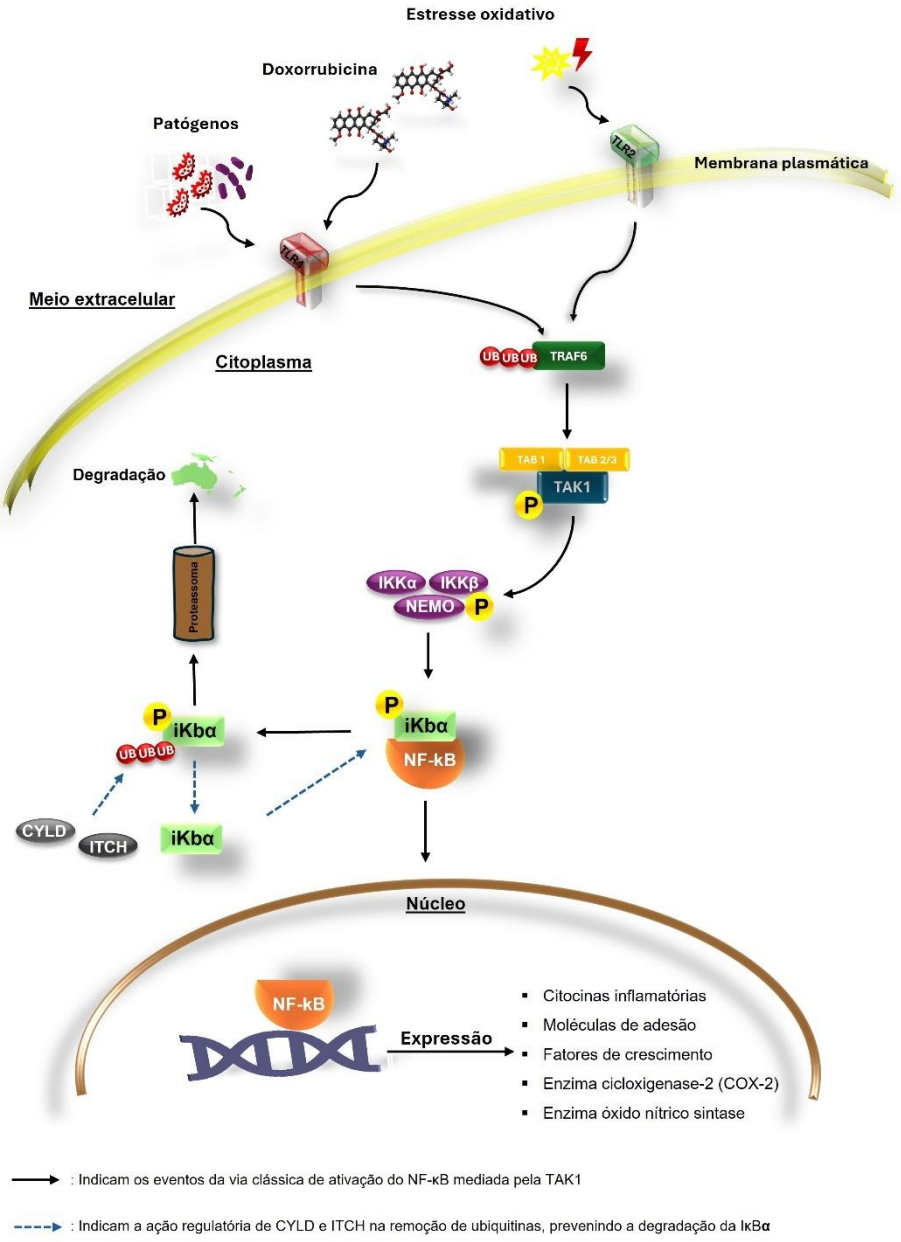
De fato, mudanças na TAK1 mostraram-se essenciais para a ativação do NF-kB durante tratamento com doxorrubicina. Nas fases agudas do tratamento, ocorre poliubiquitinação da TAK1 seguida de novo processo de ubiquitinação que permite a degradação da TAK1 para finalizar a ativação do NF-kB induzida pelo quimioterápico, sendo que a degradação da TAK1 é mediada pela desubiquitinase ICTH (36). A via pela qual a doxorrubicina leva à ativação da TAK1 parece ser mediada também pela proteína nuclear NEMO, que após sofrer modificações induzidas pelo quimioterápico, migra para o citoplasma onde irá estimular a poliubiquitinação da TRAF6, que consequentemente irá ativar TAK1, cursando com ativação da IKK e aumento da atividade de NF-kB (36,37).

O 5-Z7-Oxozeaenol é um composto derivado de fungos das famílias *Penicillium* e *Myrothecium*, que tem sido amplamente estudado devido à sua capacidade de inibição seletiva da proteína TAK1. No contexto da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, a inibição da TAK1 mediada pelo 5-Z7-Oxozeaenol torna-se um possível recurso para diminuir os danos inflamatórios e oxidativos no miocárdio.(38)

A figura 1 ilustra, de maneira resumida, as vias inflamatórias intracelulares reguladas pela proteína TAK1.

Diante do exposto, elaboramos a hipótese que a ativação da TAK1 está envolvida na gênese da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina e que a inibição da TAK1 é capaz de prevenir a cardiotoxicidade induzida por essa droga.

Figura 1 - Via da ativação do NF-kB mediada pela TAK1



OBJETIVO

Avaliar o efeito da inibição da TAK1 na fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em células H9c2.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento

Para formar os grupos de estudo, foram utilizados frascos de 175 cm^2, nos quais foram acondicionadas as células H9c2, na densidade de 30 x $10^4/cm^2$. Inicialmente, foi realizado um ensaio formado por 3 grupos experimentais para testar a eficácia do 5Z-7-oxozeaenol e um ensaio também formado por 5 grupos para definir a dose de doxorrubicina a ser utilizada no estudo. Após a validação da eficácia do inibidor e da definição da dose de doxorrubicina, um novo ensaio formado por 4 grupos experimentais foi realizado para analisar os efeitos da inibição da TAK1 na toxicicidade induzida pela doxorrubicina e no tratamento com o inibidor. Ambos os ensaios foram realizados com 3 réplicas biológicas independentes por grupo experimental:

Ensaio para validação de eficácia do 5Z-7-oxozeaenol

1) Controle (C): células H9c2 não tratadas com nenhuma substância
2) Inibidor da TAK1 (I): células H9c2 tratadas com 5z7-oxozeaenol (inibidor da TAK1)
na dose de 10 uM.
3) Estimulador da TAK1 (E): células H9c2 tratadas com LPS (estimulador da TAK1) na dose de 5 mg/ml.

Ensaio para determinar a dose de doxorrubicina

1) Controle (C): células H9c2 não tratadas com nenhuma substância
2) Células H9c2 tratadas com doxorrubicina na dose de 6,25 uM.
3) Células H9c2 tratadas com doxorrubicina na dose de 12,5
4) Células H9c2 tratadas com doxorrubicina na dose de 25 uM
5) Células H9c2 tratadas com doxorrubicina na dose de 50 uM

Ensaio para avaliação dos efeitos da inibição da TAK1

1) Controle (C): células H9c2 não tratadas com nenhuma substância.

2) Inibidor da TAK1 (I): células H9c2 tratadas com 5z7-oxozeaenol (inibidor da TAK1) na dose de 10 uM.
3) Doxorrubicina (D): células H9c2 tratadas com doxorrubicina na dose determinada pelo estudo de citotoxicidade.
4) Doxorrubicina + inibidor (DI): células H9c2 com doxorrubicina na dose determinada pelo estudo de citotoxicidade e tratadas com 5z7-oxozeaenol na dose de 10 uM.

Inicialmente, os grupos I e DI receberam a dose de 10 µM de inibidor. Após duas horas de exposição, as células foram tratadas com 25 µM de doxorrubicina, e os demais grupos receberam seus respectivos tratamentos. Ao receberem a doxorrubicina, o tratamento de todos os grupos ocorreu no período de 24h. Após esse período, o meio de cultura foi coletado e armazenado a - 80^{o}C para posteriores análises, e as células foram removidas com tripsina EDTA, centrifugadas para a coleta do palete, lavadas com PBS e ressuspendidas em tampão de lise para realização das análises a seguir.

Cultura celular

As células da linhagem H9c2 (*Rat* BDIX *heart myoblast*) foram adquiridas da Sigma Aldrich (88092904). Esta linhagem celular foi escolhida, pois apresenta características fisioquímicas semelhantes a células cardíacas em cultura primária, além de ser a linhagem de mioblatos mais utilizada para experimentos *in vitro* livre de animais (39,40). As células foram cultivadas na densidade de 30x10^{4}/cm^{2} em meio DMEM (*Dulbecco'sModifiedEagle'sMedium – Thermo Fisher Scientific*, EUA) + 10% de soro fetal bovino (*SFB – Thermo Fisher Scientific,* EUA) + 1% de antibiótico (*Penicillin-streptomycin solution stabilized –Thermo Fisher Scientific,* EUA), trocado a cada dois dias, e mantidas na incubadora com temperatura a 37 °C e CO2 a 5% por aproximadamente 5 dias até atingirem 70% a 80% de confluência. Foi adicionada tripsina EDTA na concentração de 0,05% ao meio de cultura e as células foram coradas com azul de trypan e contadas utilizando câmara de Neubauer em microscópio invertido.

O restante das células viáveis, que não utilizadas nos ensaios, foi transferido para uma garrafa e expandido para eventuais repetições de experimentos ou congelamento e armazenamento em nitrogênio líquido.

Ensaio de citotoxicidade por cristal violeta

O ensaio de citoxicidade foi realizado com o objetivo de definir a dose de doxorrubicina ideal para atingir 50% de morte celular e para avaliar a morte celular nos diferentes tratamentos (41). Para o ensaio de citotoxicidade, inicialmente, as células H9c2 foram cultivadas em placa de 96 poços na densidade celular de $3x10^4/cm^2$. Ao atingirem a confluência de 80%, as células foram tratadas com cloridato de doxorrubina nas seguintes doses: 0 uM, 6,25 uM, 12,5 uM, 25 uM e 50 uM. Todas as doses foram testadas em 6 réplicas pelo período de 24h (42)

Após 24h de incubação com a DOX, as células foram fotografadas e o sobrenadante foi coletado e armazenado e as células foram incubadas com 100 uL de solução de cristal violeta 2% por poço em temperatura ambiente por 10 minutos. Após o período de incubação, o corante foi desprezado e a placa lavada delicadamente com H_2O Mili-Q 5 vezes e colocada em estufa a 37°C para secar. Após a secagem, foi adicionado 100 uL de Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 1% e placa foi agitada para homogeneizar a coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com filtro 492 nM. O percentual de viabilidade celular no grupo controle foi adotado como 100%. A viabilidade relativa foi calculada pela fórmula a seguir: (absorbância experimental - absorbância de fundo) / (absorbância do grupo controle - absorbância de fundo) × 100.

Para avaliar a morte celular nos diferentes tratamentos, as células também foram cultivadas nas mesmas condições descritas acima. No entanto, cada grupo recebeu seu respectivo tratamento antes da realização do ensaio de cristal violeta.

Determinação da expressão proteica por Western blot

Extração proteica

Foi realizada a determinação da expressão das proteínas TAK1, NFkB, IkB- α, TNF-α, IL10 e ERK pela técnica Western Blot. Inicialmente, o meio de cultura foi coletado e armazenado. Cada frasco foi lavado duas vezes com PBS gelado, foi adicionado 4 mL de trispsina EDTA 0,05% e incubando durante 3 minutos em estufa a 37^{o}C. Após o tempo de incubação, foi adicionado 12 mL de meio de cultura e a suspenção celular foi centrifugada a 1000 RPM durante 1 minuto para a coleta do pallet. O meio de cultura foi desprezado e o pelet foi lavado com 10 mL de PBS gelado, centrifugado e suspendido em tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (m/v), SDS 0,1 % (m/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). Em seguida, o lisado total foi transferido para microtubos de 2 ml e sonicado três vezes por dez segundos, centrifugado a 4C^{o} a 3650 RPM por 25 minutos. Por fim, o sobrenadante foi transferido para novos tubos e armazenado a -80C^{o}. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

Precipitação de proteína por ácido tricloroacético (TCA)

As amostras de sobrenadante da cultura celular foram submetidas à precipitação de proteínas com TCA. Inicialmente, em 1 ml de lisado foi adicionado 50 uL de deoxicolato (DOC) e os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado 50 uL de TCA 100% (Merck KGaA, Darmstadt, Germany and/or its affiliates) e incubado em gelo por 30 minutos. Após a incubação com TCA, as amostras foram centrifugas a 4°C e 9980 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet de proteína foi lavado 3 vezes com acetona gelada. Por último, o pellet foi deixado secar em temperatura ambiente e ressuspendido em 50 uL de tampão de lise. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

SDS-PAGE - Eletroforese

As amostras contendo 30 µg 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 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCl 240 mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed). A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 10% e a concentração do gel de resolução varia de acordo com o peso molecular da proteína determinada.

A corrida eletroforética será efetuada a 50 V por 30 minutos e a 120 V por 2 horas (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25 M, glicina 192 mM e SDS 1%). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a 2.5 amperes e 25 volts por 30 minutos, utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%).

Bloqueio e marcação da membrana com anticorpos

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 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada (Cell Signalling 515899; Santa Cruz 365858, Santa Cruz 8008; Santa Cruz 1643; Santa cruz 133192, Santa Cruz-93), diluídos em solução de 3% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20). 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, diluídos em solução de 1% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0. As membranas permaneceram incubadas por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente e 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 Kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA. As imagens foram fotografadas no analisador de imagens ImageQuant LAS (General Eletrikcs).

Análise dos resultados

A expressão de todas as proteínas analisadas foi normalizada por coloração de Ponceau. A análise das imagens foi realizada no programa de análise de imagens Gel Pro versão 3.1.00 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA). O protocolo de western blot foi adapatado de TONON C., et al., 2024. (43)

Imunfluorescência

Para a análise de Imunofluorescência das proteínas TAK1 e NF-kB, o ensaio de cultura celular ocorreu de acordo com o descrito anteriormente em placas de 24 poços contendo lamínulas para cultivo celular na densidade celular de 30 x 10^4/cm^2. Após a realização do ensaio, o sobrenadante foi aspirado e as células foram permeabilizadas em metanol por 5 minutos em gelo. Posteriormente, foram lavadas com PBS e Tween 20 a 0,05%. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana serão bloqueados mediante incubação com solução contendo BSA a 3%, glicina a 1%, soro fetal bovino a 8% em PBS e 0,1% Triton X-100. Após o bloqueio, os anticorpos primários específicos para cada proteína (Cell Signaling TAK1 4505S; NF-kB Santa Cruz 8008) foram aplicados às lâminas, que permaneceram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C. As lâminas foram lavadas com PBS e Tween 20 a 0,05% e incubadas novamente por 60 minutos em temperatura ambiente com os anticorpos secundários (Invitrogen A10037 Alexa 568; Invitrogen A11070 Alexa 488), foram lavadas novamente e a coloração foi realizada com contra-coloração com DAPI (4 ', 6-diamidino-2-fenilindol).(43) Por fim, as lamínulas foram removidas da placa de cultura a anexadas a lamina histológica com glicerol para a realização das análises. As imagens foram adquiridas em objetiva 20X em microscópio de fluorescência confocal LEICA TCS SP8. A análise de imagens foi realizada utilizando-se o software de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA), utilizando o software LASX Office, © 2025 Leica Microsystems. A quantificação foi feita por meio da intensidade de fluorescência.

Análise estatística

A normalidade foi avaliada por teste de Teste de Kruskal-Wallis. As variáveis com distribuição normal foram apresentadas em média ± desvio-padrão. Quando as variáveis não apresentaram distribuição normal, foi realizada transformação matemática para atingir distribuição normal e apresentadas em média ± desvio-padrão. A comparação entre os grupos foi feita utilizando ANOVA de uma via (quando houver 3 grupos a serem avaliados) e ANOVA de duas vias (quando houver 4 grupos a serem avaliados). Quando utilizada a ANOVA de duas vias, na presença de interação entre os fatores (doxorrubicina, inibidor de TAK1) foi feita comparação entre os grupos de interesse com pós teste de Dunn. As análises dos dados foram realizadas usando o software SigmaPlot para Windows v12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Cultura celular

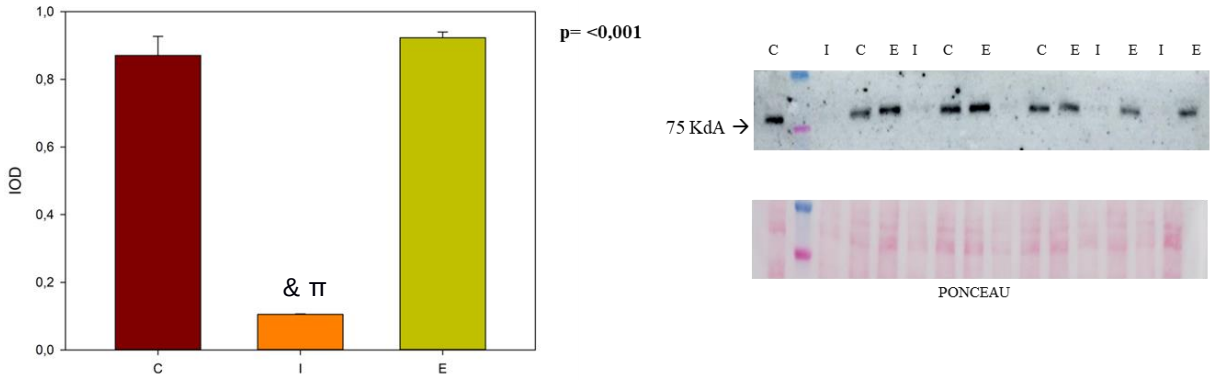
A linhagem celular H9c2 foi obtida na passagem 37 e passou por padronização de cultivo celular e formação de um banco de células mestre. O banco de células mestre continha frascos com as passagens iniciais e subsequentes até a passagem 50, os quais foram utilizados nos ensaios realizados. Após o descongelamento, as células foram submetidas a três passagens para atingir sua taxa de crescimento regular e aumentar a sensibilidade ao tratamento antes de iniciar os protocolos de indução de cardiotoxicidade e tratamentos com um inibidor e um estimulador, conforme recomendado na literatura.(44,45)

Análise da expressão proteica de TAK1 para o ensaio de eficácia do 5Z-7-oxozeaenol

Inicialmente, para validar o efeito inibitório do 57-7-oxozeaenol, foi realizada a análise da expressão da TAK1 por Western blot. Para isso, foram formados três grupos: Controle (C), Inibidor (I) e Estimulador (E).

Observamos que o grupo inibidor apresentou menor expressão de TAK1 em comparação aos grupos controle e estimulador (Figura 2).

Figura 2 – Expressão de TAK1 para validação do 5Z-7-oxozeaenol



C: controle; I: inibidor; E: estimulador; valor de p: Anova de uma via. &: diferente de controle; ττ: diferente de estimulador.

Ensaio de citotoxicidade com cristal violeta

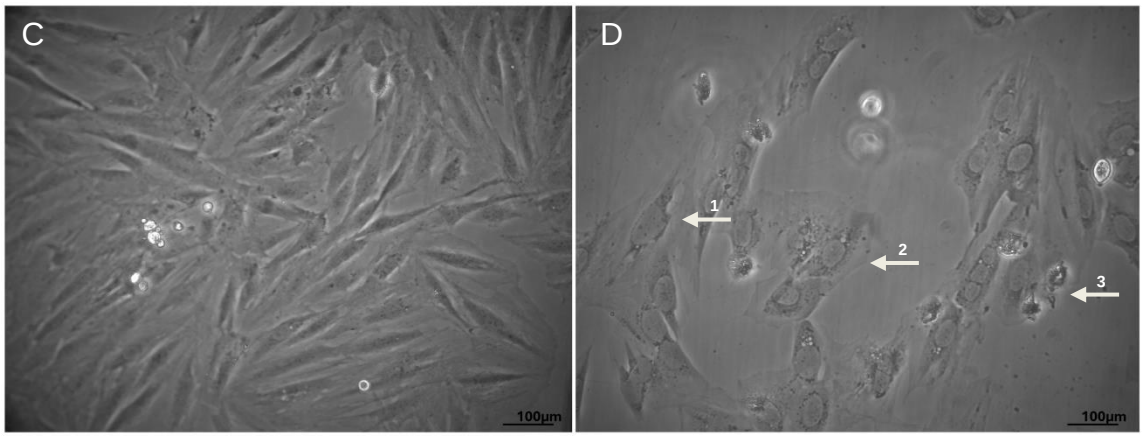
Os resultados do ensaio de Cristal Violeta para determinação da melhor dose de doxorrubicina para o tratamento das células H9c2 mostraram que a dose ideal para mimetizar a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina foi de 25 µM. (Tabela 1 e figura 3).

Tabela 1 – Absorbância relativa por cristal violeta.

Dose (uM)	% de citotoxicidade	% de viabilidade	Absorbância
0	0	100	0,03
6,25	36	64	0,016
12,5	40	60	0,015
25	**52**	**48**	**0,012**
50	60	40	0,01

uM= micromolar, % percentual.

Figura 3- Morfologia celular após tratamento com a DOX

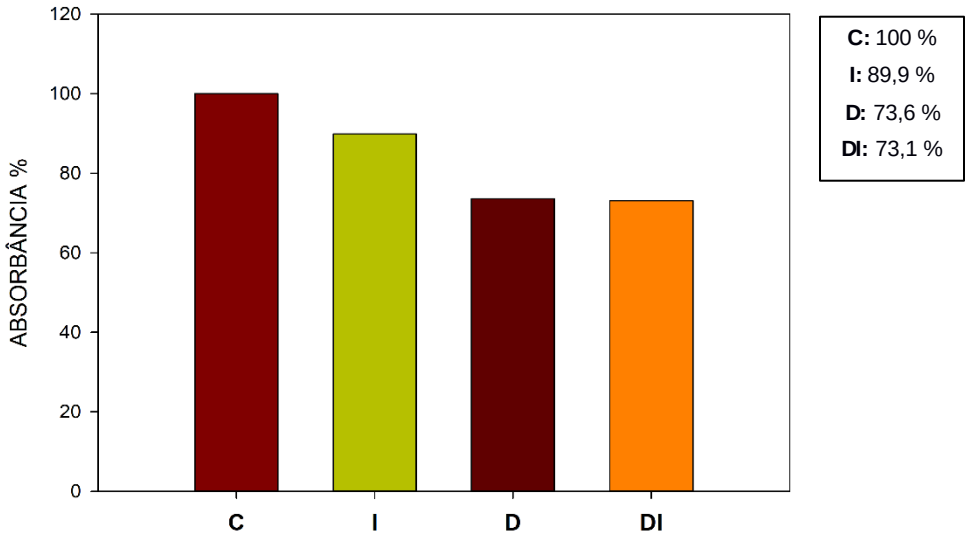


C: Grupo controle, células sem alterações morfológicas. D: Grupo doxorrubicina, 24h após tratamento com 25uM de doxorrubicina; 1: aumento no volume do citoplasma; 2: nota-se células descoladas e com alterações no contorno, 3: presença de corpos apoptóticos.

Os resultados de absorbância relativa e análise estatística do ensaio de cristal violeta, utilizado para avaliar a morte celular nos diferentes grupos de tratamento, indicaram que as células tratadas com doxorrubicina, grupo D (0,0692± 0,00868) e DI (0,0687± 0,00441), apresentaram menor viabilidade, ou seja, apresentaram maior taxa de morte, que as células não tratadas com doxorrubicina, C (0,0940± 0,0147) e I (0,0845± 0,0172). Porém, não houve diferença entre os grupos (p interação > 0,05).

Os valores de p para os fatores isolados foram: p inibidor <0,043 e p doxorrubicina <0,043. Na figura 4 pode ser observado o percentual de morte celular avaliado pela absorbância relativa.

Figura 4 - Morte celular por absorbância relativa



C: controle; I: inibidor; D: doxorrrubicina, DI: doxorrubicina e inibidor.

Precipitação de proteína para SDS-PAGE

Após a aplicação do método de Bradford para quantificar a quantidade total de proteína nas amostras, verificou-se que o conteúdo de proteína era inadequado para a realização da análise de expressão proteica por Western blot. Isso ocorreu devido à baixa concentração de proteínas nas amostras de sobrenadante da cultura celular, o que resultou em um volume insuficiente para ser utilizado no referido método.

Com o objetivo de viabilizar a utilização das amostras, empregou-se o protocolo de precipitação de proteínas utilizando TCA (ácido tricloroacético). Esse método possibilita a concentração das proteínas totais presentes na amostra na forma de um pellet, o qual pode ser diluído em volume reduzido de tampão de amostra, sem comprometer a estrutura proteica (46) É importante salientar que o protocolo de precipitação por TCA não compromete a estrutura das proteínas, não comprometendo avaliação de expressão proteica (46)

Na Tabela 2, é possível observar a concentração de proteína nas amostras de sobrenadante da cultura celular, antes e após o protocolo de precipitação com TCA. Constatou-se que, após a precipitação, a concentração de proteína aumentou cerca de 8 vezes.

Tabela 2 - Precipitação de proteína com TCA

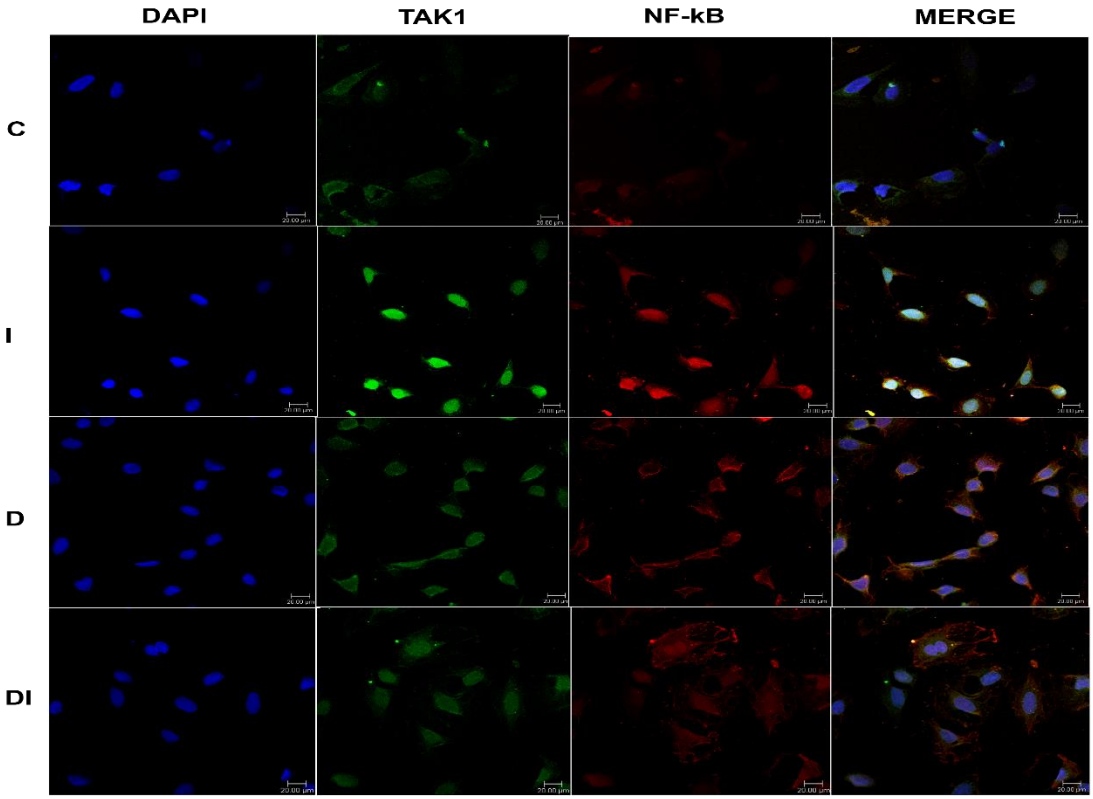
Grupo	Concentração inicial (µg/µL)	Concentração após precipitação (µg/µL)
C	0,879	7,64
D	0,842	7,02
E	1,046	8,05
I	0,882	6,78
DI	0,808	6,73

C: Grupo Controle; D: Grupo Doxorrubicina; E: Grupo Estimulador; I: Grupo Inibidor; DI: Grupo Doxorrubicina + Inibidor.

Imunofluorescência

Não houve diferenças estatisticamente significantes nos resultados da marcação por imunofluorescência das proteínas TAK1 e NF-kB. (Figura 5, tabela 3).

Figura 5- Marcação por imunofluorescência



C: controle; I: inibidor; D: doxorrubicina; DI: doxorrubicina + inibidor; Coloração por imunofluorescência de células H9C2 utilizando anticorpo específico para TAK1, seguido de anticorpo secundário conjugado a alexa 488 (verde) e para NF-kB, seguido de anticorpo secundário conjugado a alexa 568 (vermelho). As células foram contra coradas com DAPI para marcar os núcleos celulares (azul), Merge: sobreposição das imagens.

Tabela 3- Intensidade de fluorescência TAK1 e NF-kB

variável	C (n=3)	I (n=3)	D (n=3)	DI (n=3)	p doxorrubicina	p inibidor	pi
TAK1	2,254 ± 0,493	1,731 ± 0,105	2,190 ± 1,301	2,451 ± 0,825	0,503	0,786	0,427
NF-kB	0,667 ± 0,0559	0,619 ± 0,327	0,541 ± 0,278	0,678 ± 0,247	0,822	0,765	0,540

C:controle; I: inibidor; D: doxorrubicina; DI: doxorrubicina + inibidor; valor de p: Anova de duas vias; pi: valor de p da interação doxorrubicina vs inibidor.

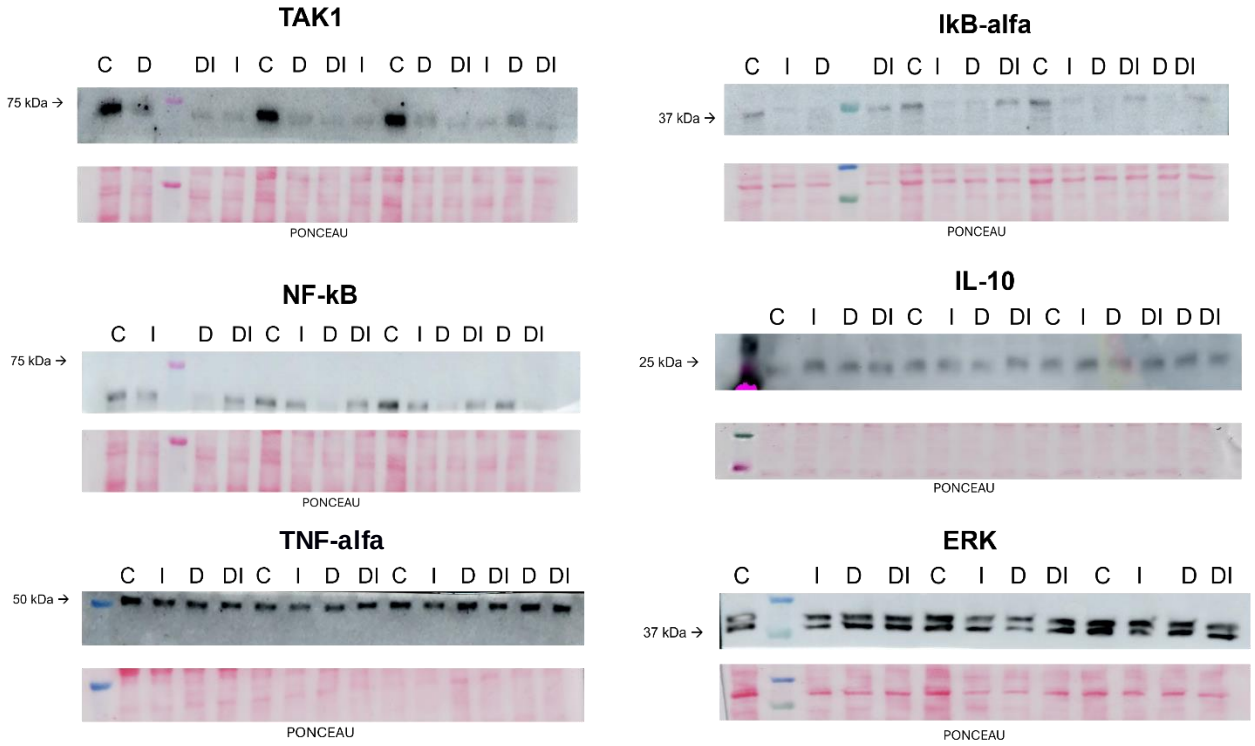
Análise da expressão proteica por Western blot

A expressão de TAK1 foi reduzida dentre as células tratadas com o inibidor de TAK1, no entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos (figura 6, tabela 4).

A expressão de IκB-α foi menor no grupo I em comparação com o grupo C e maior no grupo DI em comparação ao grupo D. Além disso, os grupos D e DI foram diferentes do grupo I (figura 3, tabela 5).

Não houve diferença estatisticamente significante na expressão de TNF-α, NF-kB, IL-10 e ERK entre os grupos (figura 3, tabela 5).

Figura 2 - Membranas de Western blot



C: controle; I: inibidor; D: doxorrubicina; DI: doxorrubicina + inibidor; TAK1: quinase 1 ativada por TGF-beta; IkB-alfa: inibidor do fator nuclear kappa B alfa, NF-kB: fator nuclear kappa B.

variável	C (n=3)	I (n=3)	D (n=3)	DI (n=3)	p doxorrubicina	p inibidor	pi
TAK1	0,0193± 0,0112	0,0720± 0,0416	0,195± 0,113	0,0627± 0,0362	0,906	<0,001	0,339
NF-kB	0,0535± 0,0476	0,103± 0,103	0,0595± 0,0108	0,0553± 0,0373	0,567	0,535	0,462
IkB-α	0,876± 0,205	0,0949± 0,0598[&]	0,139± 0,0330[&]	0,393± 0,0702[& # ^]	<0,001	0,010	**0,004**
TNF-α	0,104± 0,0359	0,0803± 0,00870	0,0697± 0,0220	0,0868± 0,0409	0,442	0,856	0,268
IL-10	0,0944 ± 0,0304	0,1014 ± 0,0257	0,1009 ± 0,0583	0,1424 ± 0,1039	0,523	0,531	0,647
ERK	0,162± 0,179	0,080± 0,031	0,071± 0,051	0,066± 0,016	0,366	0,450	0,510

Tabela 4- Expressão proteica por western blot

C: controle; I: inibidor; D: doxorrubicina; DI: doxorrubicina + inibidor; valor de p: Anova de duas vias; pi: valor de p da interação doxorrubicina vs inibidor; TAK1: quinase 1 ativada por fator de transformação do crescimento beta (TGF-beta); NF-kB: fator nuclear kappa B; IkB-alfa: inibidor do fator nuclear kappa B alfa, TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; IL-10: interleucina-10; ERK: quinase regulada por sinais extracelulares
&: diferente de controle, #: diferente de doxorrubicina, ^: diferente de Inibidor;

DISCUSSÃO

Muitos estudos têm avaliado a inibição da TAK1 na toxicididade induzida pela doxorrubicina em diferentes modelos experimentais. Entretanto, a influência da inibição dessa proteína nos efeitos colaterais causados pela doxorrubicina ainda não está totalmente esclarecida. Nesse contexto, torna-se relevante o objetivo do presente estudo, que foi avaliar a influência da inibição da TAK1 na fisiopatologia da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em células H9c2

Com base nos resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade por cristal violeta, foi determinado que a dose de 25 µM de doxorrubicina resultou em percentual de 52% de morte celular, e foi adotado como parâmetro para avaliar a efetividade da toxicidade da doxorrubicina nas células H9c2 no presente estudo, assim como em outros estudos de citotoxicidade de drogas (47,48).

Foi possível observar alteração no contorno celular, aumento de volume citoplasmático e presença de corpos apoptóticos após 24 horas de incubação de células H9c2 em uma concentração de 25 uM de doxorrubicina no grupo D em comparação ao grupo C. Assim como Pereira et al., observou-se células redondas e atrofiadas, descoladas, com expansão citoplasmática e presença de materiais característicos de células apoptóticas (49) Essas observações fornecem evidências visuais da resposta das células H9c2 à exposição à doxorrubicina.

Com o objetivo de avaliar a viabilidade/morte celular nos diferentes tratamentos também foi realizado o ensaio de cristal violeta. O resultado de viabilidade relativa mostra diferenças na absorbância nos grupos I e D em comparação ao grupo C. Dessa maneira, foi possível observar que em relação a morte celular, o grupo que recebeu o tratamento combinado de doxorrubicina com o inibidor (DI) não apresentou percentual de morte celular menor em relação ao grupo que recebeu apenas a doxorrubina (D). Esse resultado corrobora os achados de Wang C. e colaboradores (2021), que mostraram que a inibição da TAK1 em células H9c2, durante o tratamento com doxorrubicina, pode levar a aumento da morte celular (50).

A proteína TAK1 desempenha papel importante em várias vias de sinalização celular, como na regulação da resposta inflamatória em diversos modelos experimentais de remodelação cardíaca, incluindo a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, por meio da ativação de fatores transcricionais, como o fator NF-kB (25,36,51). O inibidor 5Z-7-oxozeaenol, uma lactona de ácido resorcílico derivada de

fungo, bloqueia a ativação do TAK1, o que poderia aumentar a eficácia da terapia com esse quimioterápico (52–54).

A interação entre TAK1 e o inibidor 5Z-7-oxozeaenol tem sido estudada para determinar como ela pode afetar a cardiotoxicidade causada pela doxorrubicina. Interessantemente, Wang e colaboradores (2021) conduziram um estudo com células H9c2 tratadas com doxorrubicina, no qual a inibição da TAK1 resultou em aumento da morte celular apoptótica e necroptótica, enquanto a ativação da TAK1 favoreceu a sobrevivência celular(50) Em contrapartida, no estudo conduzido por Guan et al., os resultados mostraram que a inibição da TAK1 mediada pelo 5Z-7-oxozeaenol sensibilizou as células de câncer cervical à apoptose induzida pela doxorrubicina(55) Adicionalmente, Liang et al. confirmaram que a TAK1 é, de fato, necessária para a ativação do NF-κB na toxicidade induzida pela doxorrubicina. No entanto, a TAK1 pode ser modificada por diferentes ubiquitinas e deubiquitinases, o que resulta tanto em sua ativação quanto em sua degradação, em diferentes momentos durante o tratamento (56)

Esses achados conflitantes indicam que a influência da atividade de TAK1 na toxicidade induzida pela doxorrubicina ainda não está completamente compreendida. No entanto, nos mostra que a modulação da atividade de TAK1 pode potencializar a eficácia do tratamento com doxorrubicina.

No presente estudo, inicialmente, a análise da expressão de TAK1 por Western blot foi realizada para validar o efeito do inibidor 5z-7-oxozeaenol antes dos ensaios com a doxorrubicina. Os resultados mostraram que o inibidor foi eficaz na redução da expressão da proteína TAK1, com diminuição significativa no grupo I em comparação aos grupos C e E. Esses achados são consistentes com estudos anteriores que avaliaram a inibição de TAK1 com 5z-7-oxozeaenol, e reforçam o uso desse inibidor em estudos que objetivam avaliar a regulação da atividade da TAK1 (55)

Após a validação da eficácia do inibidor, foi realizado o ensaio com os grupos tratados com doxorrubicina, com o inibidor e com o tratamento combinado. Os resultados de expressão de TAK1 mostraram que houve diminuição da expressão de TAK1 na presença de seu inibidor, porém não houve diferença entre os grupos analisados.

Na tentativa de validar nosso resultado observado no Western blot, realizamos a marcação da TAK1 por imunofluorescência, mas também não observamos diferenças entre os grupos.

No presente estudo, como esperado, observou-se que a inibição da TAK1 resultou em aumento significativo da expressão de IκB-α no tratamento com doxorrubicina. No entanto, não foram encontradas alterações na expressão de NF-κB, avaliadas por western blot e imunofluorescência. Isso pode ser explicado pelo fato de que o tempo de tratamento e o momento da coleta das amostras não tenham sido ideais para identificar possíveis alterações na atividade de NF-κB.

A IκB-α desempenha papel fundamental no controle da ativação da via NF-κB, sendo ponto chave para a ação da doxorrubicina. Quando IκB-α é fosforilada pelo complexo IKK, ela é rapidamente degradada, liberando as subunidades do NF-κB, que podem translocar-se para o núcleo e induzir a transcrição de genes-alvo envolvidos em processos inflamatórios e apoptóticos (57–59) Em um estudo com células leucêmicas tratadas com indol-3-carbinol,um composto encontrado em vegetais crucíferos, os resultados mostraram que houve inibição da fosforilação da IκB-α, impedindo sua degradação no proteossoma e, consequentemente, bloqueando a ativação do NF-κB. Isso resultou na supressão da expressão de genes antiapoptóticos e metastáticos, contribuindo para a indução do apoptose nas células (60)

Nesse contexto, a regulação da atividade da IκB-α se destaca como um importante alvo no controle da ativação do NF-κB em tratamentos quimioterápicos. No entanto, no presente estudo, não observamos alterações em sua expressão ao comparar os grupos D e DI. Isso pode ser explicado pelo fato de que a terapia com doxorrubicina modifica o ciclo de ativação e a atividade do NF-κB, o que pode, por sua vez, influenciar a função da proteína regulatória IκB-α (61,62)

Já é sabido que a DOX induz a ativação do NF-κB de maneira dose- e tempo-dependente em células endoteliais e cardiomiócitos, aumentando a citotoxicidade em células cardíacas H9c2 através da ativação da via p38 MAPK/NF-κB, o que eleva a produção de citocinas inflamatórias como IL-1β, IL-6 e TNF-α (63,64)

O NF-κB também regula a expressão de diversos produtos gênicos que desempenham papéis cruciais na sobrevivência celular, ciclo celular, respostas imunes, angiogênese e função do sistema nervoso. Além disso, estudos têm

revelado que a ativação da via de sinalização do NF-κB pela doxorrubicina resulta na produção de uma forma defeituosa do NF-κB, que é deficiente na fosforilação e serve para reduzir a transcrição, em vez de ativá-la (61,65,66)

Nesse contexto, a regulação da atividade do NF-κB por meio da inibição da proteína TAK1, associada à ativação defeituosa promovida pela doxorrubicina, se torna um importante alvo de estudo, pois pode resultar em uma *down*-regulação de genes de citocinas inflamatórias, além de potencializar a terapia quimioterápica, aumentando a apoptose de células cancerígenas.

A doxorrubicina pode levar a um desequilíbrio na resposta inflamatória no coração, levando a danos nas células cardíacas. A IL-10 desempenha papel importante na modulação dessa resposta inflamatória. Sua ação anti-inflamatória pode ajudar a reduzir o estresse oxidativo e a inflamação no coração, atenuando a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (67,68).

O estudo realizado por Singla et al. (2019) mostrou que o tratamento com a doxorrubicina está associado ao aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias e concominante redução da IL-10, como consequência da diminuição de macrófagos M2 (69). Adicionalmente, estudos experimentais com supressão da IL-10 revelam uma resposta cardiotóxica mais acentuada nos grupos tratados com DOX (67,70). Nesse contexto, é possível observar que os níveis e a expressão de IL-10 na cardiotoxicidade induzida pela DOX podem variar de acordo com o modelo de estudo utilizado.

O TNF-α é uma citocina inflamatória produzida principalmente por macrófagos e células T, desempenhando um papel fundamental na resposta imune e inflamação. Na cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina, o TNF-α é liberado em resposta ao estresse celular, contribuindo para danos nas células cardíacas. Esse processo aumenta a inflamação e promove a apoptose dos cardiomiócitos, resultando em disfunção cardíaca. (71,72)

Estudos experimentais demonstram que a administração de doxorrubicina provoca um aumento significativo nos níveis e na expressão de TNF-α em animais tratados, em comparação ao grupo controle. No entanto, pesquisas mais recentes mostram redução na expressão de TNF-α em ratos Wistar tratados com doxorrubicina (43) Nesse contexto, o impacto da doxorrubicina na regulação dessa citocina ainda permanece questionável. Apesar disso, a inibição de vias

inflamatórias que levam ao aumento da expressão de TNF-α contribui para melhora da disfunção cardíaca induzida pela doxorrubicina(72–74)

No presente estudo, não foram observadas alterações na expressão de IL-10 e TNF-α na comparação entre os grupos. Esse resultado vai de encontro com os dados obtidos na avaliação da via de sinalização do NF-kB, pois, na ausência de ativação do NF-kB, é esperado que não ocorram alterações na expressão de proteínas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (75)

A ERK é uma proteína quinase que faz parte da via de sinalização MAPK, a qual é fundamental na regulação de diversas funções celulares, como crescimento, sobrevivência e apoptose. A ativação de ERK é um processo que, normalmente, está envolvido em respostas celulares ao estresse, incluindo danos no DNA e inflamação, mas também pode ser ativado por quimioterápicos, incluindo a doxorrrubicina.

Estudos experimentais com células H9c2 e doxorrubicina, nos quais utilizaram inibidores específicos para impedir ou regular a atividade de ERK e p53, foi observado que essa intervenção impediu as mudanças nas proteínas e a morte celular provocada pela doxorrubicina. Esses resultados revelam que a via de sinalização ERK-p53 desempenha um papel fundamental na apoptose das células cardíacas induzida pela doxorrubicina(76,77). Esses achados sugerem fortemente que ERK e p53 podem representar alvos terapêuticos promissores para mitigar a cardiotoxicidade associada ao tratamento com a doxorrubicina. Apesar desse papel importante da ERK na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, no presente estudo não observamos alteração na expressão dessa proteína. É possível que a duração do tratamento tenha sido insuficiente para induzir mudanças significativas na expressão de ERK, assim como não foram observadas alterações na expressão do NF-kB.

Esse resultado pode ser, em parte, explicado pelo fato de que essas vias de sinalização podem ser ativadas ou reguladas de forma transitória. Dessa forma, é possível que o tempo de exposição à doxorrubicina e o momento da coleta das amostras não tenham sido adequados para a detecção de alterações na expressão dessas proteínas.

Cabe ressaltar que nosso estudo apresenta algumas limitações, como o fato de não termos avaliado o comportamento das células em diferentes tempos de

exposição e tratamento. Também não avaliamos algumas proteínas em suas formas fosforiladas e outras proteínas que também podem influenciar a modulação dessa via, como a CYLD e a ITCH. Portanto, os resultados obtidos ressaltam a necessidade de estudos futuros que possam melhorar o entendimento dos mecanismos envolvidos.

CONCLUSÃO

O tratamento com 5Z-7-oxozeaenol em células H9c2 tratadas com doxorrubicina resultou na inibição da expressão de TAK1 e IkB-α, entretanto, não foram observadas alterações na expressão de outras proteínas da via da TAK1 e citocinas inflamatórias. Dessa maneira, conclui-se que, apesar do papel interessante que essa via possa representar na fisiopatologia da cardiotoxicidade, em nosso estudo não observamos a participação da TAK1 na lesão celular induzida pela doxorrubicina.

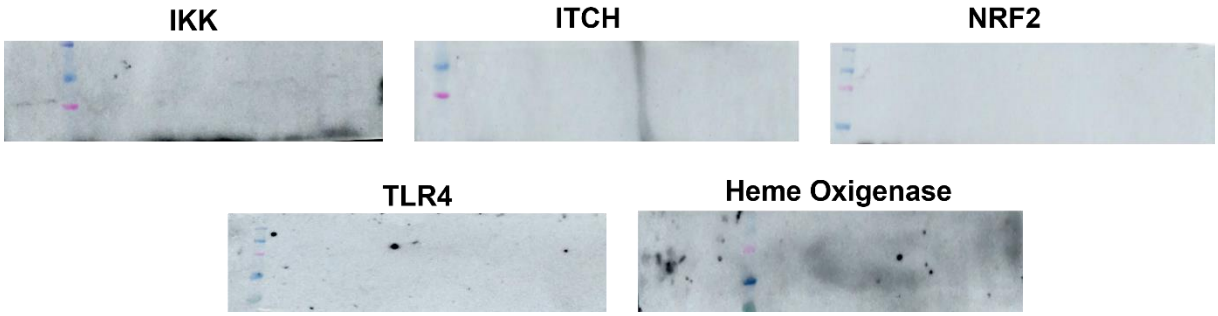
CONSIDERAÇÕES ADICIONAIS

Foi realizada a análise de Western blot para as proteínas, IKK, ITCH, NRF2, TLR4 e Heme Oxigenase. No entanto, não foi possível observar marcação de bandas (anexo 1). Dessa maneira, as mesmas permanecem sem discussão.

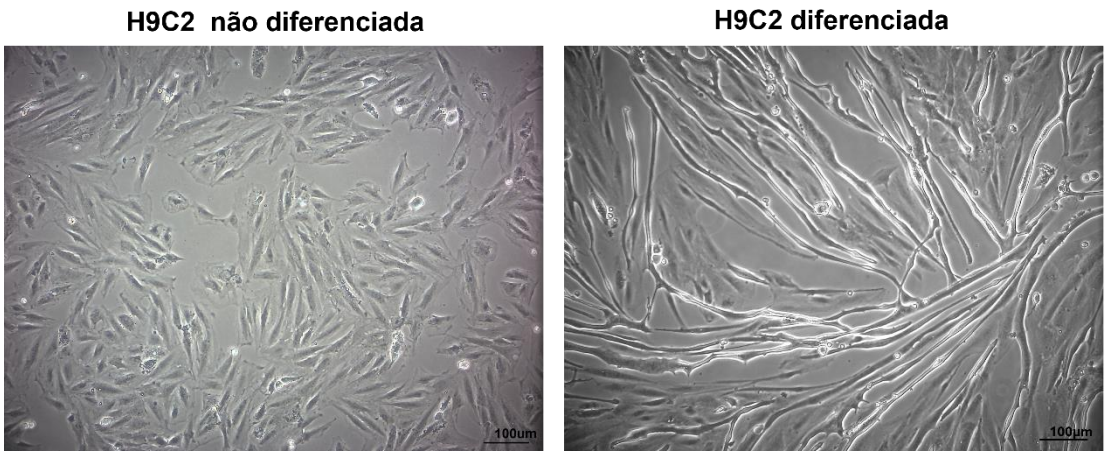
Inicialmente, o objetivo deste estudo era avaliar a influência da inibição da TAK1 na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em células H9c2 diferenciadas em cardiomiócitos maduros. No entanto, devido a dificuldades nas padronizações dos experimentos, atrasos causados pela pandemia de Covid-19 e restrições de prazo, optamos por trabalhar com as células em sua forma nativa. As imagens das células diferenciadas, obtidas no início do estudo, podem ser consultadas no Anexo 2.

ANEXO

ANEXO 1 - Membranas de Western Blot não marcadas.



ANEXO 2 – Células H9c2 diferenciadas



REFERÊNCIAS[i]

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2024;74(3):229–63.
2. Santos M de O, Lima FC da S de, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM de, Cancela M de C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. Revista Brasileira de Cancerologia. 2023 Feb 6;69(1).
3. Katta B, Vijayakumar C, Dutta S, Dubashi B, Nelamangala Ramakrishnaiah VP. The Incidence and Severity of Patient-Reported Side Effects of Chemotherapy in Routine Clinical Care: A Prospective Observational Study. Cureus. 2023 Apr 29;
4. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenet Genomics. 2011 Jul;21(7):440–6.
5. Adamcova M, Skarkova V, Seifertova J, Rudolf E. Cardiac Troponins are Among Targets of Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in hiPCS-CMs. Int J Mol Sci. 2019 May 29;20(11):2638.
6. Vejpongsa P, Yeh ETH. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. J Am Coll Cardiol. 2014 Sep 2;64(9):938–45.
7. Dantas D, Pereira AG, Fujimori ASS, Ribeiro APD, de Almeida Silva CCV, Monte MG, et al. Doxycycline Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Improving Myocardial Energy Metabolism in Rats. J Cardiovasc Dev Dis. 2022 Aug 8;9(8):254.
8. Linders AN, Dias IB, López Fernández T, Tocchetti CG, Bomer N, Van der Meer P. A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging. npj Aging. 2024 Jan 23;10(1):9.
9. Volkova M, Russell R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. Curr Cardiol Rev. 2011 Nov;7(4):214–20.
10. Ribeiro APD, Pereira AG, Todo MC, Fujimori ASS, dos Santos PP, Dantas D, et al. Pera orange (Citrus sinensis) and Moro orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck) juices attenuate left ventricular

dysfunction and oxidative stress and improve myocardial energy metabolism in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. Nutrition. 2021 Nov;91–92:111350.

11. Shrestha N, Rajbhandari P, Mandal SK, Janjua S. Beyond Expectations: A Case of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy at a Remarkably Low Cumulative Dose. Cureus. 2023 Jul 20;
12. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. J Mol Cell Cardiol. 2012 Jun;52(6):1213–25.
13. Carvalho PB de, Gonçalves A de F, Alegre PHC, Azevedo PS, Roscani MG, Bergamasco CM, et al. Pamidronate Attenuates Oxidative Stress and Energetic Metabolism Changes but Worsens Functional Outcomes in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. Cell Physiol Biochem. 2016;40(3–4):431–42.
14. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, et al. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. Cell Physiol Biochem. 2015;35(5):1924–33.
15. Cappetta D, Rossi F, Piegari E, Quaini F, Berrino L, Urbanek K, et al. Doxorubicin targets multiple players: A new view of an old problem. Pharmacol Res. 2018 Jan;127:4–14.
16. Shabalala S, Muller CJF, Louw J, Johnson R. Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity. Life Sci. 2017 Jul 1;180:160–70.
17. Nozaki N, Shishido T, Takeishi Y, Kubota I. Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. Circulation. 2004 Nov 2;110(18):2869–74.
18. Antonucci S, Di Sante M, Tonolo F, Pontarollo L, Scalcon V, Alanova P, et al. The Determining Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Generation and Monoamine Oxidase Activity in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. Antioxid Redox Signal. 2021 Mar 1;34(7):531–50.
19. Ghigo A, Li M, Hirsch E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2016 Jul;1863(7):1916–25.
20. Zhang Z, Peng J, Hu Y, Zeng G, Du W, Shen C. CTRP5 Attenuates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Via Inhibiting TLR4/NLRP3 Signaling. Cardiovasc Drugs Ther. 2023 May 31;
21. Tavakoli Dargani Z, Singla DK. Embryonic stem cell-derived exosomes inhibit doxorubicin-induced TLR4-NLRP3-mediated cell death-pyroptosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2019 Aug 1;317(2):H460–71.
22. Duan T, Du Y, Xing C, Wang HY, Wang RF. Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. Front Immunol. 2022 Mar 3;13.

23. Hirata Y, Takahashi M, Morishita T, Noguchi T, Matsuzawa A. Post-Translational Modifications of the TAK1-TAB Complex. Int J Mol Sci. 2017 Jan 19;18(1):205.
24. Sakurai H. Targeting of TAK1 in inflammatory disorders and cancer. Trends Pharmacol Sci. 2012 Oct;33(10):522–30.
25. Neumann D. Is TAK1 a Direct Upstream Kinase of AMPK? Int J Mol Sci. 2018 Aug 15;19(8):2412.
26. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther. 2017 Jul 14;2(1):17023.
27. Mussbacher M, Salzmann M, Brostjan C, Hoesel B, Schoergenhofer C, Datler H, et al. Cell Type-Specific Roles of NF-κB Linking Inflammation and Thrombosis. Front Immunol. 2019;10:85.
28. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev. 2006 Apr;86(2):515–81.
29. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit HM, Packer M. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. N Engl J Med. 1990 Jul 26;323(4):236–41.
30. Park HB, Baek KH. E3 ligases and deubiquitinating enzymes regulating the MAPK signaling pathway in cancers. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer. 2022 May;1877(3):188736.
31. Ahmed N, Zeng M, Sinha I, Polin L, Wei WZ, Rathinam C, et al. The E3 ligase Itch and deubiquitinase Cyld act together to regulate Tak1 and inflammation. Nat Immunol. 2011 Nov 6;12(12):1176–83.
32. Liu G, Liu Y, Wang R, Hou T, Chen C, Zheng S, et al. Spironolactone Attenuates Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats. Cardiovasc Ther. 2016 Aug;34(4):216–24.
33. Al-Shabanah OA, Aleisa AM, Hafez MM, Al-Rejaie SS, Al-Yahya AA, Bakheet SA, et al. Desferrioxamine attenuates doxorubicin-induced acute cardiotoxicity through TFG-β/Smad p53 pathway in rat model. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:619185.
34. Li S, E M, Yu B. Adriamycin induces myocardium apoptosis through activation of nuclear factor kappaB in rat. Mol Biol Rep. 2008 Dec;35(4):489–94.
35. Pecoraro M, Del Pizzo M, Marzocco S, Sorrentino R, Ciccarelli M, Iaccarino G, et al. Inflammatory mediators in a short-time mouse model of doxorubicin-induced cardiotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 2016 Feb 15;293:44–52.
36. Liang L, Fan Y, Cheng J, Cheng D, Zhao Y, Cao B, et al. TAK1 ubiquitination regulates doxorubicin-induced NF-κB activation. Cell Signal. 2013 Jan;25(1):247–54.

37. Fiordelisi A, Iaccarino G, Morisco C, Coscioni E, Sorriento D. NFkappaB is a Key Player in the Crosstalk between Inflammation and Cardiovascular Diseases. Int J Mol Sci. 2019 Mar 30;20(7).

38. Ninomiya-Tsuji J, Kajino T, Ono K, Ohtomo T, Matsumoto M, Shiina M, et al. A Resorcylic Acid Lactone, 5Z-7-Oxozeaenol, Prevents Inflammation by Inhibiting the Catalytic Activity of TAK1 MAPK Kinase Kinase. Journal of Biological Chemistry. 2003 May;278(20):18485–90.

39. Watkins SJ, Borthwick GM, Arthur HM. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2011 Feb;47(2):125–31.

40. Kuznetsov A V., Javadov S, Sickinger S, Frotschnig S, Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. 2015 Feb;1853(2):276–84.

41. Zhang M, Aguilera D, Das C, Vasquez H, Zage P, Gopalakrishnan V, et al. Measuring cytotoxicity: a new perspective on LC50. Anticancer Res. 2007;27(1A):35–8.

42. Zhu C, Bai Y, Qiu J, Chen G, Guo X, Xu R. CYP2J2-derived epoxyeicosatrienoic acids protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity by reducing oxidative stress and apoptosis via activation of the AMPK pathway. Heliyon. 2024 Jan 15;10(1):e23526.

43. Tonon CR, Monte MG, Balin PS, Fujimori ASS, Ribeiro APD, Ferreira NF, et al. Liraglutide Pretreatment Does Not Improve Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. Int J Mol Sci. 2024 May 27;25(11):5833.

44. Witek P, Korga A, Burdan F, Ostrowska M, Nosowska B, Iwan M, et al. The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. Cytotechnology. 2016 Dec 5;68(6):2407–15.

45. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. Curr Protoc Microbiol. 2008 Nov;11(1).

46. Koontz L. TCA Precipitation. In 2014. p. 3–10.

47. Espíndola MR, Varotti F de P, Aguiar ACC, Andrade SN, Rocha EMM da. In vitro assessment for cytotoxicity screening of new antimalarial candidates. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2022;58.

48. Branco AF, Sampaio SF, Moreira AC, Holy J, Wallace KB, Baldeiras I, et al. Differentiation-Dependent Doxorubicin Toxicity on H9c2 Cardiomyoblasts. Cardiovasc Toxicol [Internet]. 2012 Dec 29;12(4):326–40. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s12012-012-9177-8

49. Pereira-Oliveira M, Reis-Mendes A, Carvalho F, Remião F, Bastos M de L, Costa VM. Doxorubicin Is Key for the Cardiotoxicity of FAC (5-Fluorouracil + Adriamycin + Cyclophosphamide) Combination in Differentiated H9c2 Cells. Biomolecules. 2019 Jan 10;9(1):21.
50. Wang C, Hu L, Guo S, Yao Q, Liu X, Zhang B, et al. Phosphocreatine attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting oxidative stress and activating TAK1 to promote myocardial survival in vivo and in vitro. Toxicology. 2021 Aug;460:152881.
51. Fan Y, Cheng J, Vasudevan SA, Patel RH, Liang L, Xu X, et al. TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeaenol sensitizes neuroblastoma to chemotherapy. Apoptosis. 2013 Oct 23;18(10):1224–34.
52. Lu L, Zhang X, Tong H, Zhang W, Xu P, Qu S. Central Administration of 5Z-7-Oxozeaenol Protects Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice by Inhibiting Microglia Activation. Front Pharmacol. 2017 Nov 3;8.
53. Javadov S, Jang S, Agostini B. Crosstalk between mitogen-activated protein kinases and mitochondria in cardiac diseases: Therapeutic perspectives. Pharmacol Ther. 2014 Nov;144(2):202–25.
54. Mukhopadhyay H, Lee NY. Multifaceted roles of TAK1 signaling in cancer. Oncogene. 2020 Feb 13;39(7):1402–13.
55. Guan S, Lu J, Zhao Y, Woodfield SE, Zhang H, Xu X, et al. TAK1 inhibitor 5Z-7-oxozeaenol sensitizes cervical cancer to doxorubicin-induced apoptosis. Oncotarget. 2017 May 16;8(20):33666–75.
56. Liang L, Fan Y, Cheng J, Cheng D, Zhao Y, Cao B, et al. TAK1 ubiquitination regulates doxorubicin-induced NF-κB activation. Cell Signal. 2013 Jan;25(1):247–54.
57. Zhu X, Huang B, Zhao F, Lian J, He L, Zhang Y, et al. p38-mediated FOXN3 phosphorylation modulates lung inflammation and injury through the NF-κB signaling pathway. Nucleic Acids Res. 2023 Mar 21;51(5):2195–214.
58. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. Signal Transduct Target Ther [Internet]. 2017 Jul 14;2(1):17023. Available from: https://www.nature.com/articles/sigtrans201723
59. Neumann D. Is TAK1 a Direct Upstream Kinase of AMPK? Int J Mol Sci [Internet]. 2018 Aug 15;19(8). Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30111748
60. Takada Y, Andreeff M, Aggarwal BB. Indole-3-carbinol suppresses NF-κB and IκBα kinase activation, causing inhibition of expression of NF-κB-regulated antiapoptotic and metastatic gene products and enhancement of apoptosis in myeloid and leukemia cells. Blood. 2005 Jul 15;106(2):641–9.

61. Bednarski BK, Baldwin AS, Kim HJ. Addressing Reported Pro-Apoptotic Functions of NF-κB: Targeted Inhibition of Canonical NF-κB Enhances the Apoptotic Effects of Doxorubicin. PLoS One. 2009 Sep 10;4(9):e6992.

62. PUGA, Guilherme Morais; NOVAIS, Iane de Paiva; ZANESCO Angelina. Therapeutic effects of L-arginine supplementation on the cardiovascular and endocrine-metabolic diseases. Arquivos de Medicina. 2011;25(2183–2447):107–14.

63. GUO RM, XU WM, LIN JC, MO LQ, HUA XX, CHEN PX, et al. Activation of the p38 MAPK/NF-κB pathway contributes to doxorubicin-induced inflammation and cytotoxicity in H9c2 cardiac cells. Mol Med Rep. 2013 Aug;8(2):603–8.

64. Fiordelisi A, Iaccarino G, Morisco C, Coscioni E, Sorriento D. NFkappaB is a Key Player in the Crosstalk between Inflammation and Cardiovascular Diseases. Int J Mol Sci. 2019 Mar 30;20(7):1599.

65. Ho WC, Dickson KM, Barker PA. Nuclear Factor-κB Induced by Doxorubicin Is Deficient in Phosphorylation and Acetylation and Represses Nuclear Factor-κB–Dependent Transcription in Cancer Cells. Cancer Res. 2005 May 15;65(10):4273–81.

66. Enzler T, Sano Y, Choo MK, Cottam HB, Karin M, Tsao H, et al. Cell-Selective Inhibition of NF-κB Signaling Improves Therapeutic Index in a Melanoma Chemotherapy Model. Cancer Discov. 2011 Nov 1;1(6):496–507.

67. Alves MT, Simões R, Pestana RMC, de Oliveira AN, Oliveira HHM, Soares CE, et al. Interleukin-10 Levels are Associated with Doxorubicin-Related Cardiotoxicity in Breast Cancer Patients in a One-Year Follow-Up Study. Immunol Invest. 2022 May 19;51(4):883–98.

68. Malik A, Bagchi AK, Jassal DS, Singal PK. Interleukin-10 Mitigates Doxorubicin-Induced Endoplasmic Reticulum Stress as Well as Cardiomyopathy. Biomedicines. 2022 Apr 13;10(4):890.

69. Singla D, Johnson T, Tavakoli Dargani Z. Exosome Treatment Enhances Anti-Inflammatory M2 Macrophages and Reduces Inflammation-Induced Pyroptosis in Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. Cells. 2019 Oct 9;8(10):1224.

70. Kobayashi M, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Mizushina Y, et al. NLRP3 Deficiency Reduces Macrophage Interleukin-10 Production and Enhances the Susceptibility to Doxorubicin-induced Cardiotoxicity. Sci Rep. 2016 May 26;6(1):26489.

71. Chiosi E, Spina A, Sorrentino A, Romano M, Sorvillo L, Senatore G, et al. Change in TNF-α Receptor Expression Is a Relevant Event in Doxorubicin-Induced H9c2 Cardiomyocyte Cell Death. Journal of Interferon & Cytokine Research. 2007 Jul;27(7):589–98.

72. Arunachalam S, Nagoor Meeran MF, Azimullah S, Sharma C, Goyal SN, Ojha S. Nerolidol Attenuates Oxidative Stress, Inflammation, and Apoptosis by Modulating Nrf2/MAPK Signaling Pathways in Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity in Rats. Antioxidants. 2021 Jun 21;10(6):984.

73. Refaie MMM, Shehata S, Ibrahim RA, Bayoumi AMA, Abdel-Gaber SA. Dose-Dependent Cardioprotective Effect of Hemin in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity Via Nrf-2/HO-1 and TLR-5/NF-κB/TNF-α Signaling Pathways. Cardiovasc Toxicol. 2021 Dec 11;21(12):1033–44.

74. Wang Z, Wang M, Liu J, Ye J, Jiang H, Xu Y, et al. Inhibition of TRPA1 Attenuates Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity by Suppressing Oxidative Stress, the Inflammatory Response, and Endoplasmic Reticulum Stress. Oxid Med Cell Longev. 2018 Jan 28;2018(1).

75. Zhang DX, Ma DY, Yao ZQ, Fu CY, Shi YX, Wang QL, et al. ERK1/2/p53 and NF-κB dependent-PUMA activation involves in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016 Jun;20(11):2435–42.

76. Wu J, Feng A, Liu C, Zhou W, Li K, Liu Y, et al. Genistein alleviates doxorubicin-induced cardiomyocyte autophagy and apoptosis via <scp>ERK</scp> / <scp>STAT3</scp> / <scp>c-Myc</scp> signaling pathway in rat model. Phytotherapy Research. 2024 Aug 31;38(8):3921–34.

77. Liu J, Mao W, Ding B, Liang C seng. ERKs/p53 signal transduction pathway is involved in doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cells and cardiomyocytes. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2008 Nov;295(5):H1956–65.

---

[i] Baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver), de 2013.