

Efeito do α -tocoferol e do licopeno sobre a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em ratos

Maria Carolina Munhoz de Oliveira Nascimento

Orientadora: Profa. Adj. Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação "Fisiopatologia em Clínica Médica", Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, para obtenção do título de Doutor.

2009

Dedicatória

Aos meus pais, especialmente minha mãe Maria Dolores, que há
quase 34 anos continua lutando ao meu lado pela minha
felicidade e pelas minhas conquistas.
À minha grande amiga Lolita que, por doze anos, participou de
todos os momentos de alegria e tristeza, vitórias e
aprendizado. Seu “quase” silêncio e seu amor incondicional
foram, muitas vezes, a fonte de força necessária para
continuar. Saudades...

Agradecimentos

À professora Ana Lúcia dos Anjos Ferreira, em primeiro lugar, por me aceitar como sua orientada e participar ativamente de toda a execução deste trabalho. Mas, não poderia deixar de salientar que o papel de professora, pouco valor teria não fossem o carinho e a dedicação com que trata seus orientados. Isso a faz mais que uma orientadora tornando-a uma grande amiga. Obrigada pela oportunidade.

Ao Flávio ("Flavinho") que, aos trancos e, sempre com muita paciência comigo, jamais deixou de me auxiliar na execução deste trabalho, mostrando muita compreensão especialmente nos momentos de maior nervosismo. Obrigada pela sua ajuda.

À professora Beatriz B. Matsubara pela fundamental cooperação na execução dos ecocardiogramas e na elucidação das dúvidas que foram surgindo durante este estudo.

Ao Professor Carlos Roberto Padovani pela valiosa orientação e pelo estudo estatístico.

À minha família, em especial à minha mãe. Gostaria muito de registrar minha gratidão e respeito por tudo que ela faz por mim até os dias de hoje e que sei que vai continuar fazendo por toda minha vida. Outro agradecimento especial vai para minha filha Isadora que, hoje, não pode ter ideia do que representa mais esta conquista. Um dia sei que vai saber que toda minha luta, empenho e carinho com esta tese passou a ter um significado maior depois que ela nasceu! Ao meu marido Alexandre pela companhia e ajuda constante com nossa filha nesta etapa final, toda minha gratidão.

A toda equipe do Laboratório Experimental de Clínica Médica por todo apoio e, em especial:

...à Elenize, pelas dicas e paciência em me ajudar durante toda a parte prática do experimento... não teria conseguido sem a ajuda de vocês!

...à Sueli, deixo renovadas minhas desculpas e agradeço imensamente pela sua ajuda!

...à Camila pela ajuda com o HPLC, no início e, principalmente, na conclusão dos dados. Obrigada pela compreensão!

...ao Zé, sempre tão prestativo e carinhoso e que, em meio a tantas outras atribuições, sempre procurou me atender no que fosse possível. Valeu!!!

E como não poderia deixar de ser, aos ratinhos que foram usados em meu trabalho, assim como tantos animais que são sacrificados em nome da ciência. A vocês todo o meu respeito e gratidão! Como veterinária, espero com este trabalho, poder oferecer cada vez mais qualidade de vida àqueles que tanto amo cuidar...

Índice

RESUMO	10
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	14
MANIFESTAÇÕES DA CARDIOTOXICIDADE	17
ANTIOXIDANTES NUTRIENTES E PREVENÇÃO DA TOXICIDADE PELA DOX	20
EFEITOS GERAIS DO α -TOCOFEROL	20
AÇÕES DO α -TOCOFEROL NA TOXICIDADE CAUSADA PELA DOX	21
TOXICIDADE AGUDA	22
TOXICIDADE CRÔNICA	22
ASSOCIAÇÃO DO α -TOCOFEROL COM OUTROS ANTIOXIDANTES	23
HIPÓTESE	25
OBJETIVOS	25
MATERIAIS E MÉTODOS	26
ANÁLISE DE LICOPENO E α-TOCOFEROL	29
SOLUÇÃO DE SUPLEMENTAÇÃO DE LICOPENO	29
SOLUÇÃO DE SUPLEMENTAÇÃO DE α -TOCOFEROL	29
ANÁLISE DE CAROTENÓIDE E α-TOCOFEROL NA DIETA	30
PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA ANÁLISE DE CAROTENÓIDE E ALFA-TOCOFEROL	30
ANÁLISE DE CAROTENÓIDE E α-TOCOFEROL EM HPLC	31
AVALIAÇÃO DO EFEITO DA DOX	32
ESTUDO ECOCARDIOGRÁFICO	32
ESTUDO MORFOLÓGICO	34
ANÁLISES DE COLESTEROL E FRAÇÕES	35
ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
RESULTADOS	37
CONSIDERAÇÕES GERAIS	37
EVOLUÇÃO CLÍNICA E MORTALIDADE	37
AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	37
EVOLUÇÃO DE PESO CORPÓREO	37

AVALIAÇÃO DO PESO CARDÍACO	38
AVALIAÇÃO DE LICOPENO E α -TOCOFEROL	38
NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES NO TECIDO CARDÍACO	39
NÍVEIS DE LICOPENO NO TECIDO CARDÍACO	39
NÍVEIS DE α -TOCOFEROL NO TECIDO CARDÍACO	39
AVALIAÇÃO DA ANÁLISE HISTOLÓGICA	40
AVALIAÇÃO DE COLESTEROL E FRAÇÕES	41
AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA	43
DISCUSSÃO	45
PESO CARDÍACO	47
EFEITO DOS SUPLEMENTOS EM SUAS RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES TOTAIS NO TECIDO CARDÍACO	48
EFEITO DA DOX NOS NÍVEIS DE LICOPENO E DE α -TOCOFEROL NO TECIDO CARDÍACO	50
AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA	53
AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA	57
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
FIGURAS E TABELAS	71
ANEXOS	99
ARTIGO ORIGINAL	106

Abreviações de variáveis ecocardiográficas

VE = ventrículo esquerdo.

VEs = diâmetro sistólico do VE.

VEd = diâmetro diastólico do VE.

PPd = espessura diastólica da parede posterior do VE.

PPd/VEd = espessura relativa da parede do VE.

AE = diâmetro ântero-posterior do átrio esquerdo, durante a sístole ventricular.

Ao = diâmetro da aorta.

AE/Ao = diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta.

% Δ D = porcentagem de variação do diâmetro ventricular ou fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (VE).

FE = fração de ejeção do VE.

VAo = velocidade máxima do fluxo na aorta.

FC = frequência cardíaca.

E = velocidade máxima de enchimento ventricular no início da diástole.

A = pico máximo de velocidade de fluxo transmitral durante a contração atrial.

E/A = razão entre E e A.

RESUMO

Introdução e Objetivos - O mecanismo da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (DOX) tem sido freqüente objeto de pesquisa. Dentre os vários mecanismos, destaca-se o estresse oxidativo. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito de antioxidantes (α -tocoferol e do licopeno), isolados ou associados, na cardiotoxicidade induzida pela DOX.

Materias e Métodos - Ratos machos Wistar (n, 132 ratos) foram divididos aleatoriamente em 8 grupos: G1 (controle), G2 (licopeno), G3 (α -tocoferol), G4 (licopeno + α -tocoferol), G5 (DOX), G6 (DOX + licopeno), G7 (DOX + α -tocoferol) e G8 (DOX + licopeno + α -tocoferol). Os animais foram tratados via gavagem com licopeno [(4 mg/Kg/dia) G2, G4, G6, G8], α -tocoferol [(250 mg/kg/dia) G3, G4, G7, G8] e óleo de milho [(volume apropriado) G1, G5] por 7 semanas. Eles também foram tratados intraperitonealmente com DOX [(4 mg/Kg/semana), dose cumulativa de 16mg/Kg] na 3^a, 4^a, 5^a, e 6^a semana e na 7^a semana eles foram sacrificados para coleta de dados após a avaliação ecocardiográfica. Foram também analisados: peso corpóreo, peso cardíaco, cardio-histologia, níveis cardíacos de α -tocoferol e licopeno por HPLC e níveis séricos de colesterol e LDL-colesterol.

Resultados - A DOX induziu lesão cardíaca caracterizada por alteração nos valores entre os grupos controle (G1) e DOX (G5) (G1, média $\pm$ desvio padrão vs G5, média $\pm$ desvio padrão) das seguintes variáveis: 1) disfunção sistólica (% Δ d: 53,6 $\pm$ 2,67 vs. % Δ d: 45,6 $\pm$ 4,86; FE: 89,9 $\pm$ 1,85 vs. FE: 83,5 $\pm$ 4,24; VAo: 90,45 $\pm$ 7,01 vs. VAo: 64,42 $\pm$ 14,17); 2) diastólica (E: 75,1 $\pm$ 7,9 vs. E: 60,9 $\pm$ 7,9; A: 57,3 $\pm$ 14,3 vs. A: 43,7 $\pm$ 6,45) e 3) remodelação excêntrica (PPd: 1,64 $\pm$ 0,26 vs. PPd: 1,35 $\pm$ 0,19; PPd/VEd: 0,23 $\pm$ 0,05 vs. PPd/VEd: 0,18 $\pm$ 0,02), o que

foi compatível com as lesões miocárdicas observadas na histologia. A DOX também levou ao aumento dos níveis séricos entre os grupos controle (G1) e DOX (G5) (G1, mediana vs G5, mediana) das seguintes variáveis: 4) colesterol total (54,50 vs. 315,00) e 5) LDL-colesterol (11,50 vs. 88,50), além de perda de peso corpóreo e cardíaco. Todas as alterações referidas não foram atenuadas pela suplementação isolada ou associada com licopeno e α -tocoferol. A associação de licopeno nos animais que receberam α -tocoferol e DOX, foi vantajosa em relação ao VEs e VEd (G7 vs. G8). A suplementação isolada com α -tocoferol induziu cardiotoxicidade (*in vivo* e *in ex vivo*) comportando-se de maneira semelhante à ação da DOX. Além disso, sua suplementação naqueles animais tratados com a droga acentuou as alterações ecocardiográficas induzidas pela mesma. Este efeito foi atenuado pela associação do licopeno ao α -tocoferol. Os níveis cardíacos (mediana) de licopeno (G2: 64,93 vs. G6: 86,23) e de α -tocoferol (G3: 109,91 vs. G7: 108,60) não se modificaram em função da DOX. Os níveis cardíacos de licopeno foram consumidos quando em presença de α -tocoferol tanto nos animais que receberam (G8: zero) como nos que não receberam DOX (G4: zero).

Conclusões - 1) DOX induziu alterações cardíacas e alterações séricas das lipoproteínas que não foram atenuadas pela suplementação isolada ou associada de licopeno e α -tocoferol; 2) a suplementação com α -tocoferol levou à cardiotoxicidade que, foi parcialmente atenuada pela associação com licopeno; 3) os níveis cardíacos de licopeno e de α -tocoferol não foram depletados pela ação da DOX; 4) os níveis cardíacos de licopeno foram depletados pela ação do α -tocoferol. Os resultados indicam que as alterações induzidas pela DOX não são atenuadas com a suplementação com antioxidantes e que a suplementação com α -tocoferol induziu à cardiotoxicidade e ao consumo cardíaco de licopeno.

ABSTRACT

Introduction - Doxorubicin is an excellent chemotherapeutic agent utilized for several types of cancer but the irreversible doxorubicin-induced cardiac damage is the major limitation for its use. Oxidative stress seems to be associated with some phase of the toxicity mechanism process. The aim of this study was to evaluate the effect of antioxidants (α -tocopherol and lycopene) alone or in association on doxorubicin-induced cardiotoxicity.

Materials and Methods - 132 male Wistar rats were randomly distributed into eight groups: G1 (control), G2 (lycopene), G3 (α -tocopherol), G4 (lycopene + α -tocopherol), G5 (DOX), G6 (DOX + lycopene), G7 (DOX + α -tocopherol) or G8 (DOX + lycopene + α -tocopherol). The animals received lycopene [(4 mg/Kg/day) G2, G4, G6 and G8], α -tocopherol [(250 mg/kg/day) G3, G4, G7 and G8] and corn oil [(appropriate volume) G1 and G5] by gavage for a 7- week period. Intraperitoneal injections of DOX were also administered [(4 mg/kg/week), cumulative dose of 16 mg/kg] at 3rd, 4th, 5th and 6th weeks. Rats were killed at the 7th week after echocardiographic analysis. Body weight, heart histology, cardiac levels of α -tocopherol and lycopene by HPLC and serum levels of cholesterol and LDL-cholesterol were also analysed.

Results - DOX induced heart damage characterized by systolic (% Δ d (G1): 53.6 ± 2.67 vs % Δ d (G5): 45.6 ± 4.86 ; FE (G1): 89.9 ± 1.85 vs FE (G5): 83.5 ± 4.24 ; VAO (G1): 90.45 ± 7.01 vs VAO (G5): 64.42 ± 14.17) and diastolic dysfunction (E (G1): 75.1 ± 7.9 vs E (G5): 60.9 ± 7.9 ; A (G1): 57.3 ± 14.3 vs A (G5): 43.7 ± 6.45) and excentric remodelling (PPd (G1): 1.64 ± 0.26 vs PPd (G5): 1.35 ± 0.19 ; PPd/VEd (G1): 0.23 ± 0.05 vs PPd/VEd (G5): 0.18 ± 0.02). These data were compatible with myocardial injury observed on histology. DOX also led to body weight and cardiac weight loss and increase of total cholesterol (G1: $54.50 \pm$

14.00 vs G5: 315.00 $\pm$ 165.00) and LDL-cholesterol (G1: 11.50 $\pm$ 4.00 vs G5: 88.50 $\pm$ 48.00) serum levels. These changes were not attenuated by lycopene and / or α -tocopherol supplementation. α -tocopherol supplementation induced cardiotoxicity (*in vivo* and *ex vivo*) in a similar way when compared to DOX action. Besides, its supplementation to those animals treated with the drug emphasized DOX induced echocardiographic changes. This effect was attenuated by the association with lycopene. Lycopene (median $\pm$ semi range) (G2: 64.93 $\pm$ 32.28 vs G6: 86.23 $\pm$ 125.10) and α -tocopherol (G3, 109.91 $\pm$ 18.43 vs G7: 108.60 $\pm$ 34.50) cardiac levels did not change with DOX use. Lycopene cardiac levels were consumed when α -tocopherol was present in the groups that received (G8: zero) or not DOX (G4: zero).

Conclusions -1) DOX induced cardiac and serum lipoprotein changes, which were not attenuated by supplementation with lycopene and α -tocopherol (alone or in association); 2) α -tocopherol supplementation induced cardiotoxicity that was partially attenuated by lycopene association; 3) Lycopene and α -tocopherol cardiac levels were not depleted in DOX treated animals; 4) Lycopene cardiac levels were depleted in α -tocopherol supplemented animals. The study shows that DOX induced cardiotoxicity, which was not prevented by antioxidants supplementation and that α -tocopherol supplementation resulted in cardiotoxicity and cardiac lycopene consume.

INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX) representa um dos mais importantes agentes antitumorais, desempenhando fundamental papel no tratamento de diversas neoplasias humanas e animais desde a década de 60. Trata-se de um antibiótico da classe das antraciclinas produzido pelo fungo *Streptomyces peucetius* variedade *caesius* (Chabner, 1996; Singal *et al.*, 2000), podendo ainda ser sintetizado quimicamente a partir da daunorrubicina (Singal *et al.*, 2000). A estrutura da DOX é composta por um aminoacúcar ligado a quatro anéis de antraquinonas através de uma ligação glicosídica (Ilustração 1). Um dos principais mecanismos anti-tumor das antraciclinas é desempenhado pelos anéis B e C das antraquinonas, que funcionam como doadores e receptores de elétrons (Tallarico *et al.*, 2003; Chabner, 1996).

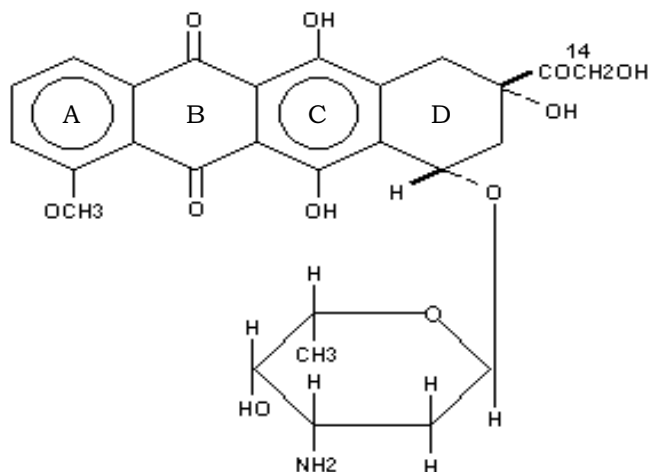


Ilustração 1. Estrutura química da doxorubicina

Apesar de ser excelente quimioterapêutico, a aplicação da DOX tem sido limitada pelo seu potente efeito cardiotoxico dose-dependente capaz de levar à insuficiência cardíaca congestiva irreversível.

São vários os mecanismos pelos quais a DOX leva à lesão cardíaca, mas a geração de espécies reativas do metabolismo do oxigênio favorecida pela sua estrutura química única (Singal *et al.*, 2000) tem sido objeto freqüente de uma gama de estudos. As antraciclinas reagem com o citocromo P₄₅₀ redutase, na presença de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido (NADPH), para formar as semiquinonas que, por sua vez, reagem com o oxigênio para produzir os superóxidos. Estes podem gerar tanto peróxidos de hidrogênio como radicais hidroxilas que são altamente destrutivos para as células (Young *et al.*, 1981, Olson & Mushlin 1990, Chabner 1996, Luo *et al.*, 1997, Morishima *et al.*, 1998, Tokudome *et al.*, 2000, Silva 2001, Quiles *et al.*, 2002, Dudnakova *et al.*, 2003), além de iniciarem a peroxidação lipídica (Olson & Mushlin 1990, Morishima *et al.*, 1998), levando à perda progressiva de miofibrilas e vacuolização mitocondrial, alterações típicas da cardiomiopatia induzida pela DOX (Singal & Iliskovic 1998). Acredita-se que o ciclo de oxidorredução e a ruptura de membrana celular, resultante da lipoperoxidação, sejam eventos chaves no desenvolvimento da toxicidade irreversível (Bagchi *et al.*, 1995). O processo de toxicidade parece estar relacionado com a interação de DOX com íons ferro (Chabner 1996) ou cobre (Bagchi *et al.*, 1995) o que estimula, de forma significativa, a produção de radicais livres (Bagchi *et al.*, 1995, Chabner 1996). Além disso, as reações moleculares de transferência de elétrons das semiquinonas resultam na formação de outros radicais e, portanto, de potentes agentes alquilantes (Chabner 1996). A sensibilidade do miocárdio às antraciclinas deve-se, entre outras razões, ao seu metabolismo oxidativo elevado (Quiles *et al.*, 2002) e ao nível reduzido de catalase e superóxido dismutase (SOD) presentes nos cardiomiócitos (Olson & Mushlin 1990, Chabner 1996, Sawyer *et al.*, 1999, Silva 2001, Abou El Hassan *et al.*, 2002, Quiles *et al.*, 2002,). A DOX ainda reduz a disponibilidade de outros antioxidantes

endógenos, como por exemplo, a glutathione (GSH), responsáveis pela eliminação dos radicais livres, resultando em um aumento do estresse oxidativo seguido por cardiomiopatia e falência cardíaca (Singal *et al.*, 1987, Singal & Iliskovic 1998, Luo *et al.*, 1999). As antraciclina podem interagir diretamente com os lipídeos da membrana celular graças à sua natureza lipofílica e devido a sua estrutura química, onde o anel B é de especial interesse devido ao seu potencial gerador de radicais livres (Young *et al.*, 1981, Singal *et al.*, 2000, Tokudome *et al.*, 2000, Quiles *et al.*, 2002). Tal estrutura lhe confere meia-vida longa no organismo (Singal *et al.*, 2000), alterando suas funções em concentrações iguais ou abaixo das concentrações que afetam a função do DNA (Van Fleet & Ferrans, 1980). A peroxidação lipídica resulta na produção de uma grande variedade de aldeídos, incluindo o malondialdeído (MDA) e o hexanal, que são introduzidos na fase hidrofóbica da membrana alterando sua permeabilidade e, conseqüentemente, a função celular (Singal *et al.*, 1987, Luo *et al.*, 1999). Ao contrário da grande maioria dos radicais livres, os produtos citotóxicos da lipoperoxidação são extremamente ativos e capazes de se difundir pelo organismo, atingindo alvos distantes, agindo como mensageiros citotóxicos secundários (Luo *et al.*, 1999). Células miocárdicas de ratos tratados com DOX apresentaram aumento nos níveis de MDA e aumento nas atividades da glutathione peroxidase (GSHPx), SOD e catalase (Iliskovic *et al.*, 1995, Dzielgel *et al.*, 2003). A DOX leva à redução da atividade da GSHPx e ao aumento de MDA. (Iliskovic *et al.*, 1999, Li & Singal 2000). Além disso, foi descrita inibição da oxidação dos ácidos graxos em ratos tratados com DOX, prejudicando a função miocárdica (Yoon *et al.*, 2003). A administração crônica de DOX a ratos causou aumento significativo nos níveis de ácidos graxos livres e de glutathione oxidada (GSSG), enquanto que os níveis de albumina sérica e GSH encontraram-se significativamente reduzidos (Iliskovic *et al.*, 1998). O mecanismo de

toxicidade da DOX pode ser descrito como o resultado de um distúrbio no balanço pró e antioxidante na célula devido à produção de espécies reativas do oxigênio e ao consumo de GSH intracelular durante o ciclo de oxidorredução da quinona (Pascoe & Reed 1987). A disfunção ventricular também pode ser observada pelo aumento significativo dos níveis séricos de desidrogenase láctica (DHL) e creatina quinase (CK), indicando lesão miocárdica (Singal *et al.*, 2000).

Devido ao seu sucesso como agente quimioterápico, várias estratégias têm sido tentadas para atenuar os efeitos tóxicos da DOX. Assim, há grande número de estudos que utilizaram antioxidantes, incluindo quelantes de metal, bilirrubina, melatonina, ácido úrico, α -tocoferol ascorbato, vitamina A, carotenóides, flavonóides, coenzima Q, e antioxidantes naturais (Myers *et al.*, 1976, Alberts *et al.*, 1978, Bieri *et al.*, 1983, Lu *et al.*, 1995, Pastori *et al.*, 1998, Amann *et al.*, 2002, Kalender *et al.*, 2002, Balestrieri *et al.*, 2004, Limpens *et al.*, 2004). Recentemente, nosso grupo mostrou o efeito protetor do licopeno na cardiotoxicidade induzida pela DOX em ratos, tanto ao nível histológico (Ferreira *et al.*, 2007^a) como ao nível molecular com diminuição da lesão oxidativa do DNA (Ferreira *et al.*, 2007^b).

Manifestações da Cardiotoxicidade

São descritas três formas de cardiotoxicidade induzida pela DOX que podem se desenvolver: a aguda, a crônica e a tardia.

Em sua forma aguda, os efeitos desenvolvem-se dentro de minutos a horas da administração intravenosa de DOX e caracterizam-se por hipotensão, taquicardia e arritmias podendo-se ainda observar disfunção ventricular (Singal *et al.*, 1987) e aumento significativo dos níveis séricos de DHL (Aversano *et al.*, 1983, Abou El Hassan *et al.*, 2003) e CK, indicadores bem conhecidos de danos miocárdicos (Aversano *et al.*, 1983, Singal *et al.*, 2000). Entre os efeitos

precoces da cardiotoxicidade induzida pela DOX estão a distensão do retículo sarcoplasmático e dos túbulos T, edema de mitocôndria e dilatação perinuclear (Kapelko *et al.*, 1999). Esta forma de cardiotoxicidade pode causar arritmias transitórias, síndrome pericardite-miocardite ou insuficiência aguda do ventrículo esquerdo (VE). Pode-se observar anormalidades eletrocardiográficas que resultam em alterações não específicas do segmento ST e onda T, redução da voltagem de QRS e prolongamento do intervalo QT (Chabner 1996, Singal *et al.*, 1998; Braunwald *et al.*, 1999). A taquicardia sinusal é o distúrbio rítmico mais comum, mas outras arritmias têm sido descritas como as taquicardias ventriculares supraventriculares e juncionais, além de bloqueios de ramo e atrioventriculares (Chabner 1996, Singal *et al.*, 1998; Braunwald *et al.*, 1999, Tallarico *et al.*, 2003). Muitos sinais de intoxicação aguda pela adriamicina são mais significantes nas primeiras horas após sua administração e desaparecem em duas a três semanas (Kapelko *et al.*, 1999). Seus efeitos agudos como mielossupressão, náusea, vômitos e arritmias são reversíveis ou passíveis de serem tratados clinicamente (Singal *et al.*, 2000).

Os efeitos crônicos geralmente se desenvolvem após semanas a meses de terapia e, algumas vezes, após o término do tratamento com a DOX. A cardiomiopatia, resultante de danos à célula miocárdica, freqüentemente culmina com insuficiência cardíaca congestiva (Singal *et al.*, 1987, Tallarico *et al.*, 2003), grave hipotensão, taquicardia, redução significativa da voltagem do complexo QRS, dilatação cardíaca e insuficiência ventricular associada à depressão de contratilidade (Singal *et al.*, 1987). O comprometimento da contratilidade se deve a uma variedade de defeitos subcelulares como perda de miofibrilas e vacuolização citoplasmática devido ao edema do sistema sarcotubular (Singal *et al.*, 1987). A vacuolização sarcoplasmática observada em cardiomiócitos de ratos tratados com DOX deve estar relacionada à falência

do sistema microtubular e subsequente alteração da arquitetura citoesquelética (Dudnakova *et al.*, 2003). Estas alterações são acompanhadas por anormalidades nas mitocôndrias, aumento do número de lisossomos e acúmulo de lipídeos (Singal *et al.*, 1987). O tratamento prolongado com a DOX é seguido, ainda, por perda de peso corporal e cardíaco além de alterações focais das membranas nuclear, sarcoplasmática e mitocondrial (Kapelko *et al.*, 1999). A recuperação completa da fração de encurtamento pode ocorrer se a terapia for interrompida em uma fase precoce, mas isto não exclui futuras reduções na reserva funcional (Shan *et al.*, 1996). A detecção precoce da cardiomiopatia crônica pode se dar por meio de biópsia endomiocárdica cuja aplicação é limitada, da angiografia cardíaca por radionuclídeos e da ecocardiografia bidimensional onde a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e a fração de encurtamento são os parâmetros mais comumente utilizados. Entretanto, a compensação cardíaca mantém normal a fração de ejeção no ventrículo esquerdo até que as alterações miocárdicas estejam bem estabelecidas. Reduções no pico da velocidade de enchimento ventricular ocorrem antes da redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo induzida pelas antraciclina, sugerindo disfunção diastólica (Shan *et al.*, 1996). Normalmente, trata-se de insuficiência cardíaca esquerda ou biventricular. Entretanto, insuficiência cardíaca direita isolada tem sido relatada (Tallarico *et al.*, 2003).

A forma tardia pode se manifestar após anos ou décadas do término da quimioterapia. Ocorre em pacientes assintomáticos, mas com já com disfunção ventricular, insuficiência cardíaca e arritmias. Estas anormalidades parecem ser progressivas e resultam na descompensação clínica futura cuja probabilidade aumenta de acordo com a magnitude da dose recebida, com o aumento da velocidade de administração da droga e ainda com a associação com radioterapia mediastinal. Da mesma forma que na cardiomiopatia crônica, a

detecção precoce de lesão cardíaca conta com a ecocardiografia bidimensional em repouso ou associada à administração de dobutamina o que permite revelar disfunções de contratilidade ainda não aparentes (Shan *et al.*, 1996).

Antioxidantes nutrientes e prevenção da toxicidade pela DOX

Efeitos gerais do α -tocoferol

A vitamina E foi utilizada, pela primeira vez, em 1922, para descrever um fator lipossolúvel, essencial na dieta de ratos, responsável pela manutenção da reprodução normal. Trabalhos posteriores mostraram que a vitamina E é essencial na dieta de todos os animais (Halliwell & Gutteridge 1999). Esta vitamina pertence a uma família de oito moléculas (α , β , γ e δ - tocoferóis e α , β , γ e δ - tocotrienóis). A molécula mais importante é o α -tocoferol e, comumente os termos " α -tocoferol" e "vitamina E" são utilizados de forma indiscriminada (Halliwell & Gutteridge 1999, Quiles *et al.*, 2002), o que é incorreto. A vitamina E sintética (*d*/ α -tocoferol, algumas vezes denominada *all-rac*- α -tocoferol) contém cerca de 12,5% de α -tocoferol, com mais sete outros isômeros do tocoferol que são biologicamente menos ativos (Halliwell & Gutteridge 1999). A produção e a secreção de sais biliares são essenciais para a absorção de α -tocoferol que é transportado principalmente pela β -lipoproteína. Os níveis plasmáticos do tocoferol correlacionam-se diretamente aos níveis de lipídeos totais, colesterol total e LDL plasmáticos (Bieri *et al.*, 1983).

O mecanismo de proteção da vitamina E ainda é desconhecido, mas a eliminação de radicais livres e a estabilização de membrana constituem ação inerente a este agente (Herman & Ferrans 1983). Encontram-se entre as funções deste agente, a inibição da formação tumoral, o estímulo da resposta

imune, a inibição da conversão de nitritos em nitrosaminas (Quiles *et al.*, 2002) e, a mais importante delas, a função antioxidante por meio da proteção de células e tecidos dos danos oxidativos, principalmente contra a peroxidação lipídica induzida pelos radicais livres (Milei *et al.*, 1986, Halliwell & Gutteridge 1999, Quiles *et al.*, 2002). Os tocoferóis tanto eliminam como reagem com o oxigênio *singlet*, protegendo as membranas contra estas espécies (Halliwell & Gutteridge 1999). A vitamina E parece, ainda, exercer um efeito anti-hipertensivo por meio da redução da retenção de água e sódio (Washio *et al.*, 1994). É importante ressaltar que altas doses de vitamina E podem levar a distúrbios gastrintestinais, como náuseas, flatulência ou diarreia, aumentar o tempo de protrombina e reduzir a absorção das vitaminas A e K (Bieri *et al.*, 1983). O acúmulo de α -tocoferol nas membranas celulares de mamíferos tende a ser logaritmicamente relacionado aos níveis de α -tocoferol na dieta (Pyke *et al.*, 1990).

Um estudo duplo-cego não encontrou evidência convincente sobre a eficácia do tratamento com doses massivas de vitamina E (Bieri *et al.*, 1983). A administração de uma única dose de α -tocoferol a ratos, 24 horas antes da administração de DOX, diminuiu a mortalidade, além de reduzir significativamente as alterações em miócitos e a perda de peso cardíaco (Myers *et al.*, 1976).

Ações do α -tocoferol na toxicidade causada pela DOX

Estudos com a vitamina E na prevenção de toxicidade causada pela DOX em diversas espécies animais produziram resultados conflitantes,

provavelmente devido ao modo e ao tempo de utilização da mesma (Bieri *et al.*, 1983). (Legha *et al.*, 1982, Herman & Ferrans 1983, Quiles *et al.*, 2002).

Toxicidade aguda. A administração intraperitoneal de 1000 mg/kg de α -tocoferol (divididos em duas aplicações) reduziu os níveis de MDA em porcos da Índia tratados com dose única de DOX, sugerindo a diminuição da peroxidação lipídica com a suplementação. Além disso, constatou-se melhora das alterações bioquímicas e ultraestruturais conseqüentes da nefrotoxicidade induzida pela DOX (Görgün *et al.*, 1999)., *in vivo e in vitro*, A administração de 100 mg/kg de vitamina E reduziu o número de aberrações cromossômicas provocadas pelo tratamento agudo com DOX em ratos (Antunes & Takahashi 1998). Constatou-se que o α -tocoferol bloqueou a diminuição da GSH resultante da administração aguda de DOX, reduzindo a gravidade e a incidência das lesões histológicas cardíacas (Legha *et al.*, 1982).

Toxicidade crônica. A administração oral das vitaminas E e A a coelhos tratados cronicamente com DOX, levou à neutralização do radical superóxido, melhora das alterações eletrocardiográficas, diminuição da extensão e gravidade dos danos miocárdicos, redução da incidência de lesões mucocutâneas, diminuição da lipoperoxidação, redução dos danos de membranas por meio do aumento das defesas antioxidantes endógenas do miocárdio (Milei *et al.*, 1986).

Foram observados aumento da atividade da SOD e redução da produção de MDA circulante, em ratos tratados cronicamente com DOX e, que receberam 10, 45 ou 200 mg/kg de vitamina E, por via oral (Thabrew *et al.*, 1999).

Existem relatos que mostram que o α -tocoferol não atenua as lesões induzidas pela administração crônica da DOX em animais, como os efeitos mielossupressivos (Herman & Ferrans 1983), a toxicidade gastrointestinal e a alopecia (Legha *et al.*, 1982). O α -tocoferol não compromete a atividade antitumoral do tratamento crônico com DOX (Breed *et al.*, 1980, Van Fleet & Ferrans 1980, Herman & Ferrans 1983), embora tenha sido relatado piora da toxicidade da DOX quando a este quimioterápico foi associado ao α -tocoferol (Albert *et al.*, 1978). Foi detectado aumento da atividade antitumoral da DOX utilizando a dose de 250 mg/kg/dia/30 dias de vitamina E em ratos. Em quinze dias de tratamento foi constatado aumento nos níveis de proteína total e na atividade do GSH e SOD, além de redução dos níveis de MDA no coração destes animais (Wahab *et al.*, 2000). Um dos mecanismos da prevenção da toxicidade provocada pela DOX, pela utilização de α -tocoferol, deve-se à manutenção dos tióis de proteína celular durante a depleção de GSH pelo quimioterápico (Pastori *et al.*, 1998).

As lesões cardíacas provocadas pela DOX são muito semelhantes às aquelas observadas em quadros de deficiência de α -tocoferol em ratos e coelhos como, por exemplo, a perda de miofilamentos, a vacuolização citoplasmática, a necrose celular e a perda de miócitos (Legha *et al.*, 1982).

Associação do α -tocoferol com outros antioxidantes

A comparação ou a associação do α -tocoferol a outras substâncias com ação antioxidante também tem sido objeto de estudos.

Ratos que receberam idarrubicina (uma antraciclina com cardiotoxicidade reduzida quando comparada a DOX ou a daunorrubicina) por via endovenosa apresentaram redução da contratilidade cardíaca e queda de

peso cardíaco e corporal menos pronunciadas com a administração concomitante de vitamina E ou catequina (substância pertencente à família dos flavonóides, com ação cardioprotetora, diurética e hipotensora). Além disso, a administração isolada de catequina levou a um aumento na atividade da SOD e GSHPx. Quando associada à idarrubicina, a catequina também resultou em aumento de atividade, tanto da catalase como da GSHPx e redução da atividade do MDA. Apenas a administração de idarrubicina, catequina ou vitamina E, também levou a aumento do MDA, sendo o aumento máximo observado no grupo tratado somente com vitamina E (Kalender *et al.*, 2002).

O licopeno é um carotenóide derivado de produtos do tomate que tem mostrado forte interação com espécies reativas do oxigênio como, por exemplo, H_2O_2 e radical hidroxil (Lu *et al.*, 1995). Tais espécies são envolvidas na cardiotoxicidade provocada pela DOX. Recentemente, foi mostrado que a suplementação de licopeno atenuou a necrose de cardiomiócito (Ferreira *et al.*, 2007^a), protegendo contra a lesão oxidativa de DNA, bem como contra os sítios álcali-lábeis do DNA (Ferreira *et al.*, 2007^b). Entretanto, em ambos os estudos acima citados, não foi observado efeito do licopeno na alta taxa de mortalidade provocada pela DOX. Atualmente, a combinação do licopeno com a vitamina E tem sido motivo de destaque em estudos que envolvem estresse oxidativo. De fato, tal associação mostrou efeito sinérgico na desaceleração do câncer de próstata (Pastori *et al.*, 1998) e na inibição da síntese de fator ativador de plaquetas (FAP) (Balestrieri *et al.*, 2004). Os resultados do último estudo citado sugeriram que o α -tocoferol ou os componentes lipofílicos presentes no tomate potencializam os efeitos do licopeno na modulação dos FAP e na biossíntese de acil-FAP nas células endoteliais durante o estresse oxidativo (Balestrieri *et al.*, 2004).

Apesar de relatos prévios apontarem para possível efeito benéfico da associação entre licopeno e α -tocoferol, não há até a presente data estudos que tenham avaliado tal efeito na cardiotoxicidade induzida pela DOX.

HIPÓTESE

Diante do exposto sugere-se que a cardiotoxicidade induzida pela DOX pode estar relacionada ao aumento do estresse oxidativo e que a suplementação com antioxidantes de forma isolada ou em associação diminuem a lesão cardíaca.

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivos avaliar histológica e funcionalmente:

1. O efeito do α -tocoferol na prevenção da cardiotoxicidade induzida pela DOX.
2. O efeito do licopeno na prevenção da cardiotoxicidade induzida pela DOX.
3. O possível efeito sinérgico do α -tocoferol e licopeno na prevenção da cardiotoxicidade induzida pela DOX.

MATERIAIS e MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado nas dependências do Laboratório de Experimentação do Departamento de Clínica Médica - FMB - UNESP - Botucatu com a devida aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.

Produtos químicos. A doxorrubicina foi obtida da Pharmacia (Milão, Itália). All-trans- β -caroteno (tipo IV), licopeno e acetate de amônio foram adquiridos de Sigma Chemical (St. Louis, MO). A luteína foi obtida das Indústrias Kemin (Des Moines, IA). Zeaxantina, criptoxantina, 13-*cis*- β -caroteno, 9-*cis*- β -caroteno, equinenona e DL- α -tocoferol foram gentilmente cedidos por Hoffmann-La Roche (Nutley, NJ). O licopeno tomato oleoresina, Lyc-O-Mato, foi um presente de LycoRed Natural Products Industries (Beer-Sheva, Israel). α -tocoferol (acetato de dl- α -tocoferol) foi doado por Relthy Labs (Indaiatuba, SP, Brasil). As soluções de carotenóide e α -tocoferol foram preparadas sob luz vermelha imediatamente antes de sua utilização. As grades de metanol e água para o HPLC foram obtidas de J. T. Baker Chemical (Philipsburg, NJ). Éter metileter-butil foi adquirido de Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). Todos os solventes do HPLC foram filtrados em uma membrana de 0.45- μ m e degaseificados antes de serem utilizados. Os padrões do carotenóide e do α -tocoferol foram estocados a -70°C até o uso. Pentobarbital sódico (Cristália, Paulínia, SP, Brasil), cloridrato de quetamina (Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) e xilazina (Bayer, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados para anestesia.

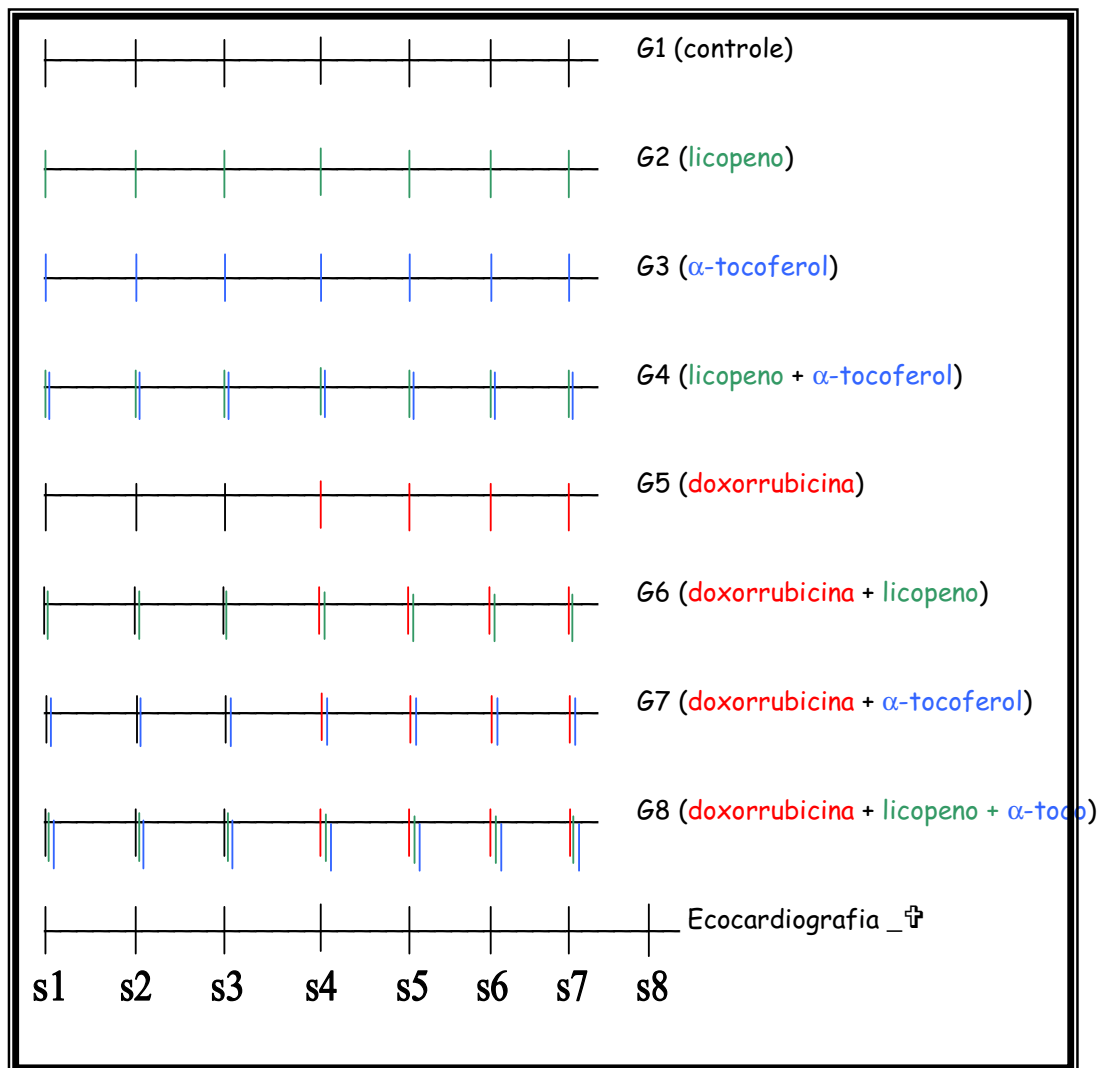
Ratos Wistar (n=132), adultos machos, com peso médio de 400g, provenientes do CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica,

UNICAMP, Campinas, SP) foram randomizados em oito grupos: G1 (controle, n=11), G2 (licopeno, n=11), G3 (α -tocoferol, n=11), G4 (licopeno + α -tocoferol, n=11), G5 (doxorubicina, n=22), G6 (doxorubicina + licopeno, n=22), G7 (doxorubicina + α -tocoferol, n=22) ou G8 (doxorubicina + licopeno + α -tocoferol, n=22) (**Ilustração 2**).

Volumes de 1 mL de solução salina (G1, G2, G3, G4) ou de 4mg/Kg de DOX (G5, G6, G7, G8) foram administrados por injeções via intraperitoneal (IP) semanalmente na 3^a, 4^a, 5^a e 6^a semanas. Os animais dos grupos G1 e G5 receberam óleo de milho como placebo e os ratos dos demais grupos (G2, G3, G4, G6, G7 e G8) foram suplementados com antioxidantes via gavagem, cinco vezes/semana por 7 semanas. Desta forma, os grupos G2 e G6 receberam solução de licopeno (5mg/Kg), G3 e G7 receberam solução de α -tocoferol (250 mg/Kg), e G4 e G8 receberam a associação de licopeno (5mg/Kg) + α -tocoferol (250 mg/Kg). Para evitar diferenças de energia fornecida, todos os grupos receberam o mesmo volume de óleo de milho (~ 0,5 mL/Kg peso corpóreo/dia). Segundo informação do fabricante (Mazola), cada mL de óleo de milho contem 0,15 mg de Vitamina E. Desta maneira, os animais dos grupos G1, e G5 receberam 0,075 mg de Vitamina E/Kg peso corpóreo/dia.

A duração total do experimento foi de sete semanas e, neste período os animais foram observados e pesados semanalmente. Os ratos foram mantidos sob uma temperatura média local de cerca de 24°C, umidade relativa de 55% e 12 horas diárias de exposição à luz; receberam água e foram alimentados com ração comercial descrita por Paiva *et al.*, (2005) *ad libitum*.

Ilustração 2. Protocolo experimental.



| S, semanas de tratamento;

| Aplicações de licopeno (5 vezes por semana);

| Aplicações de α -tocoferol (5 vezes por semana);

| Injeções IP administradas nas 3^a, 4^a, 5^a e 6^a semanas (Solução salina ou de DOX);

† Eutanásia, coleta de tecido cardíaco e plasma.

Uma semana após o final do tratamento com DOX, os ratos foram submetidos à ecocardiografia e, posteriormente sacrificados sob anestesia (com pentobarbital sódico 4%, na dose de 1 mL/kg de peso vivo) por via IP, procedendo-se desta forma a eutanásia com posterior coleta e registro do peso dos corações.

Análise de Licopeno e α -tocoferol na solução de suplementação.

Solução de suplementação de licopeno. Lyc-O-Mato 6% (LycORed) foi misturado com óleo de milho e estocado a 4°C sob luz vermelha até o uso. Uma boa mistura foi obtida após aquecer a solução por 20 min em banho-maria a 54°C. Para checar a concentração de carotenóides na solução, a mesma foi esfriada naturalmente até atingir a temperatura ambiente. Os carotenóides foram monitorizados a 450 nm cuja metodologia está detalhada neste relatório (item denominado Análise por HPLC). A extração dos carotenóides consistiu em adicionar 100 μ L da solução de licopeno em 900 μ L de etanol. Para dissolver o licopeno a solução foi triplamente sonicada em banho-maria a 4 °C (1 min) e também *vortexada* (30 segundos). A seguir, 20 μ L desta solução foram injetados no HPLC. Após o término da leitura a concentração do licopeno foi obtida por meio de quantificação dos cromatogramas onde se utiliza cálculo da área de cada carotenóide dividido pela área do padrão interno (equinenona) corrigido pela magnitude da diluição entre a solução e etanol. A solução foi oferecida diariamente aos animais via gavagem com o cuidado em manter a dose 5 mg licopeno/Kg Peso corpóreo/dia. A concentração de licopeno foi confirmada por espectrofotometria no momento do preparo e após 9 semanas (ANEXO 1). *Solução de suplementação de α -tocoferol.* A metodologia para aferição de α -tocoferol seguiu os mesmos passos descritos acima para solução de licopeno com a diferença de que a monitorização ocorreu a 294 nm, além de

utilizar acetato de DL- α -tocoferol como padrão interno. A solução foi oferecida diariamente aos animais via gavagem com o cuidado em manter a dose 250 mg α -tocoferol /Kg peso corpóreo dia. A concentração de α -tocoferol foi também confirmada por espectrofotometria (ANEXO 2).

Análise de carotenóide na dieta. A dieta foi analisada segundo o descrito por Ferreira *et al.*, 2000. Para cada 10 g de dieta, 5 mL de H₂O foram adicionados e misturados por meio de movimentos giratórios durante 1 min. A solução de extração [30 mL; hexano/acetona/etanol/tolueno (50:35:30:35)] foi adicionada e misturada por 1 min, seguido por 16 horas de repouso sob luz vermelha à temperatura ambiente; 4 mL de 40% KOH metanólico e hexano (30 mL) foram adicionados e a mistura foi deixada no escuro à temperatura ambiente. Após 1 hora, 10% Na₂SO₄ (30 mL) foi adicionado, agitado e deixado foi deixada no escuro à temperatura ambiente. Após 1 hora, a camada de hexano foi coletada e o volume foi registrado. Alíquotas de 200 μ L foram evaporadas completamente sob N₂, e o resíduo foi dissolvido novamente em 100 μ L etanol, *vortexado* e sonicado por 30 segundos. Alíquotas de 50- μ L do extrato final foram injetadas no sistema HPLC.

Preparação do tecido para análise de carotenóide e alfa-tocoferol. Utilizou-se o ápice do ventrículo esquerdo (VE) assumindo que essa amostra é representativa do miocárdio total do VE. O VE (150g) foi submetido à saponificação e posterior aferição cromatográfica dos carotenóides. O VE foi fragmentado antes da adição de pirogalol, hidróxido de potássio e etanol. Após a solução ter sido misturada (*vortex*), esta foi incubada a 37°C em banho-maria e agitada por 2 h continuamente, enquanto os tubos foram cobertos com parafilme. Após a incubação, os tubos foram resfriados à temperatura

ambiente e posteriormente foi adicionada H₂O e a mistura foi novamente agitada (*vortex*). Foram adicionados então, equinenona e DL- α -tocoferol, como padrões internos, e a mistura foi novamente agitada com éter anidro e hexano. Após centrifugação a 800 X g a 4°C, a camada superior foi removida, reservada e, posteriormente, combinada com a outra camada superior resultante da segunda extração. As duas camadas combinadas foram misturadas com H₂O e, posteriormente, com etanol. Após nova centrifugação a 800 X g a 4°C, a camada de hexano foi evaporada completamente em banho-maria sob N₂. O resíduo foi dissolvido em etanol e duplamente *vortexado* e sonificado, sendo posteriormente centrifugado a 800 X g a 4°C por 2 min. Cinquenta microlitros foram utilizados para análise no HPLC. Todo o procedimento de preparo das amostras foi realizado sob luz vermelha (Ferreira et al., 2000).

Análise de carotenóide e α -tocoferol em HPLC. Foram utilizados cromatógrafo e bomba Alliance - Waters 2695 (Waters, Wilmington, MA, USA) acoplados a um detector fotodiodo 2996 e detector de fluorescência 2475 Waters. Um software, Empower, foi utilizado para decodificar o sistema. As condições operacionais para determinação de carotenóides e α -tocoferol estão descritas a seguir. A coluna utilizada foi a C30 (4.6 μ m x 150 mm, YMC, Wilmigton, MC), e o comprimento de onda do detector foi fixado em 455nm e 292nm para leitura de carotenóides e α -tocoferol, respectivamente. Este método usou duas soluções, cada uma infundida por uma bomba de infusão, com a finalidade de se estabelecer um gradiente: solvente A - metanol: éter metílico: água (83:15: 2, v/v/v, com acetato de amônio 1,5% diluído em água; solvente B-metanol: éter metílico: água (8:90:2, v/v/v, com acetato de amônio 1% diluído em água). O fluxo total de 1 mL/min foi utilizado durante todo o

procedimento analítico à temperatura de 16°C. 1) inicialmente, após a injeção da amostra, do tempo zero até cinco minutos, foi bombeada a fase móvel na seguinte proporção: 90% do solvente A e 10% do solvente B; 2) ao fim do quinto minuto ocorreu aumento de infusão da bomba "B", mantendo-se o aumento linear do solvente B por 12 minutos. Neste intervalo de tempo, a concentração do solvente B passou a ser 45%; 3) aos 17 minutos ocorreu outro aumento linear do solvente B por 12 minutos; neste tempo, a concentração do solvente B chegou a 95%; 4) esta concentração (95% do solvente B) foi mantida por mais cinco minutos; 5) após estes últimos cinco minutos ocorreu aumento linear de 2 minutos do solvente A para retornar a concentração de 90% do solvente A e 10% do solvente B. A corrida terminou ao fim de 36 minutos. Aguardou-se, então, mais quatro minutos, correspondentes ao período suficiente para estabilizar novamente a coluna para possibilitar novas determinações. Carotenóides como luteína, zeaxantina, criptoxantina, α -caroteno, 13-cis- β -caroteno, all-trans- β -caroteno, 9-cis- β -caroteno/ ζ -caroteno e as formas trans e cis licopeno foram adequadamente separadas por este método (Yeum *et al.*, 1995). Os cromatogramas foram quantificados pela comparação entre as relações área da substância/área do padrão interno (equinenona ou acetato de DL- α -tocoferol), obtidas na análise da amostra em estudo (solução de suplementação ou dieta) e da amostra da solução padrão. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar.

Avaliação do efeito da DOX

Estudo Ecocardiográfico. Uma semana após a última dose de DOX, todos os animais foram avaliados *in vivo* por meio da ecocardiografia transtorácica, para a qual utilizamos um ecocardiógrafo SONOS 2000 (Hewlett-Packard Medical

Systems, Andover, MA, USA) equipado com um transdutor de 7.5 MHz. As imagens foram obtidas com um ângulo setorial de 60° e profundidade de 3 cm. Os ratos receberam anestesia superficial através de injeção intramuscular com solução de quetamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg). Para os ratos que receberam DOX, foi administrada metade da dose anestésica. Após a tricotomia da região peitoral, os ratos foram colocados em decúbito lateral esquerdo em base de madeira apropriada. Imagens bidimensionais e em modo-M foram obtidas nos planos do eixo curto do ventrículo esquerdo (VE) na extremidade dos folhetos da válvula mitral, e ao nível da válvula aórtica. Imagens em modo-M do VE, átrio esquerdo (AE) e da aorta foram registradas em impressora térmica em branco e preto (Sony Up-890MD) na velocidade de varredura de 100 mm/s. Todos os exames foram executados pelo mesmo examinador e obtidos de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn *et al.*, 1978). As aferições representaram a média de pelo menos cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico final (VE_d) e a espessura da parede posterior (PP_d) foram medidas no maior diâmetro diastólico, e o diâmetro sistólico final (VE_s) foi obtido durante o maior movimento anterior da parede posterior. O AE foi medido em seu maior diâmetro e a aorta teve suas medidas tomadas ao final da diástole. A espessura relativa da parede foi calculada pela razão PP_d/VE_d. As velocidades máximas de fluxo diastólico transmitral (velocidades E e A) foram obtidos no plano apical 4 câmaras. A razão E/A foi usada como um índice de função diastólica ventricular esquerda. O intervalo de tempo entre dois ciclos cardíacos consecutivos foi medido para o cálculo da frequência cardíaca (FC). A função sistólica ventricular foi avaliada por meio dos seguintes índices: fração de ejeção (FE) = $(VE_d^3 - VE_s^3) / VE_d^3$ e fração de encurtamento (% ΔD) = $[(VE_d - VE_s) / VE_d] \times 100$.

Estudo Morfológico. O estudo morfológico do ventrículo esquerdo (VE) incluiu o histológico geral (Hematoxilina & Eosina). A secção coronal de VE (3 mm de espessura, a partir de sua porção média) foi fixada por 48 h em solução de formalina tamponada a 10% e parafina. Após sua fixação, o bloco de tecido foi submetido a cortes histológicos (5 micras) para posterior coloração com hematoxilina & eosina (HE). O **Quadro 1** mostra o método de Billingham modificado (Billingham *et al.*, 1978) que foi adotado para graduação do nível de gravidade patológica identificado por HE, em uma escala de zero (normal) a três (marcada anormalidade).

Quadro 1. Graduação do nível de gravidade histológica cardíaca pela coloração Hematoxilina-Eosina.

Grau	Características morfológicas
0	Morfologia normal
1	Poucas células afetadas com alterações precoces miofibrilares (perda) e vacuolização citoplasmática
2	Grupos de células afetados com perda de elementos contráteis (perda miofibrilar marcante) e vacuolização sarcoplasmática
3	O tecido encontra-se difusamente afetado por alterações mais severas incluindo morte celular

Este procedimento foi avaliado utilizando análise semiquantitativa (**ANEXO 3**). Foram avaliadas as seguintes variáveis: 1) vacúolos citoplasmáticos (VC), 2) necrose nuclear (NN), 3) degeneração miocítica (DM), 4) infiltrado

inflamatório (II) e 5) desorganização celular (DC). A necrose nuclear foi identificada por picnose, cariorrexis e cariólise, correspondendo à redução do tamanho, fragmentação e desaparecimento do núcleo, respectivamente. A degeneração miocítica pôde ser reconhecida pela identificação de células menores, reduzidas e com citoplasma pálido e homogêneo. Esse estudo histológico foi realizado usando equipamento da Carl Zeiss - Alemanha, e consistiu de um microscópio de luz (Axio Imager A1; magnification X400) conectado à câmera digital (Zeiss Vision) e a um computador equipado com programa analisador de imagem (Axio Vision software rel., versão 4.3).

Análises de Colesterol e Frações

No momento da eutanásia, foram coletados (via punção cardíaca) aproximadamente 3 a 5 mL de sangue para análise dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides, lipoproteínas de alta (HDL) e de baixa (LDL) densidade. As amostras sangüíneas foram enviadas para a Seção de Laboratórios de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu - Setor de Bioquímica, onde foram submetidas ao sistema de automação Vitros 950 - Johnson & Johnson.

Para a obtenção dos valores de colesterol total e triglicérides utilizou-se o método colorimétrico de ponto final - química seca. O método utilizado para aferição dos níveis séricos de HDL foi o colorimétrico magnético - química seca.

Para determinação direta dos níveis de LDL, utilizamos kit específico da DiaSys (Diagnostic Systems International) - C LDL Select FS, cujo método também baseou-se na colorimetria enzimática.

Análise estatística

O estudo das variáveis ecocardiográficas e pesos corpóreo e cardíaco nos diferentes grupos experimentais foi realizado pela técnica da análise de variância paramétrica complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey. Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão (Zar, 1999).

Quanto às variáveis histológicas, laboratoriais e concentração total dos suplementos no tecido cardíaco, foi utilizada a técnica da análise de variância não paramétrica, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn (Zar, 1999) e os resultados apresentados como mediana e semi-amplitude total.

Todas as discussões no presente estudo foram realizadas no nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Considerações gerais

Evolução clínica e Mortalidade Os animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 apresentaram-se em bom estado geral durante todo o período de estudo e apenas um animal (do grupo G4) foi a óbito por causa indeterminada. Por outro lado, os animais tratados com DOX (G5, G6, G7 e G8) apresentaram a partir da terceira dose da droga, progressiva hipotrofia muscular, redução do peso corpóreo e da atividade física, além de aumento do volume abdominal com conteúdo líquido e eriçamento dos pêlos. Ainda foi observado nos grupos que receberam α -tocoferol (G3, G4, G7, G8) comportamento agressivo, menor aceitação à suplementação por gavagem e manifestação hemorrágica em região facial próxima às narinas e boca. A frequência de mortalidade total foi de 6% (8 animais) tendo evoluído para óbito animais dos grupos G4 (n=1), G5 (n=1), G6 (n=2), G7 (n=1) e G8 (n=3).

Avaliação macroscópica. A ascite esteve presente em ratos que receberam DOX (G5 a G8). Palidez renal bilateral também foi observada em animais que receberam DOX.

Evolução de peso corpóreo. As Figuras 2 e 4 mostram que os animais tratados com DOX sofreram perda progressiva de peso a partir do início da série de aplicações de DOX (4ª semana). Esta perda de peso não foi prevenida pelas suplementações isoladas ou em associação. Foi observado também que, os

ratos suplementados com α -tocoferol mostraram desaceleração significativa no ganho de peso ($G3 < G1$), que não foi prevenida pela associação com licopeno ($G4 < G1$). Esse comportamento foi confirmado no momento final do estudo pela análise estatística pareada ($p < 0,05$) que, mostra $G1 > G5$, $G2 > G6$, $G3 > G7$, $G4 > G8$, $G1 > G3$ e $G1 > G4$ (Figuras 2 e 4).

Avaliação do peso cardíaco

A Figura 5 mostra que a DOX induziu perda de peso cardíaco não prevenida pelas suplementações isoladas ou em associação. Da mesma forma, a suplementação com α -tocoferol ($G3$) levou à redução do peso cardíaco global que não foi atenuada pela associação com o licopeno ($G4$).

A variável peso cardíaco não foi corrigida pelo peso corpóreo do animal em decorrência do acentuado emagrecimento identificado nos animais tratados com DOX.

Avaliação de Licopeno e α -tocoferol

Dieta - Segundo informação do fabricante, a ração (Nuvilab CR₁) utilizada continha 30 mg de vitamina E por Kg de dieta. Não foi detectado licopeno na dieta. Os níveis de luteína e zeaxantina foram 4 e 2 mg por Kg de dieta, respectivamente.

Solução de suplementação com licopeno - Os animais ($G2$, $G4$, $G6$ e $G8$) receberam a solução de licopeno via gavagem por 7 semanas. Esta solução continha 13-*cis*- β -caroteno, todo-*trans*- β -caroteno e licopeno total em concentrações equivalentes a 0,77, 2,02 e 5,0 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente. A denominação licopeno total corresponde à soma dos isômeros de licopeno (todo *trans* - licopeno + *cis* - licopeno). A solução foi aquecida por 20 min em banho-maria a 54°C antes de ser oferecida via

gavagem aos animais. A concentração de licopeno foi também checada por espectrofotometria fixando-se o comprimento de onda em 450 nm (**Anexo 1**). O licopeno na solução de óleo de milho permaneceu estável por no mínimo 9 semanas à 4°C.

Solução de suplementação com α -tocoferol. Os animais (G3, G4, G7 e G8) receberam solução de α -tocoferol, via gavagem, por 7 semanas. Esta solução continha α -tocoferol em concentração equivalente a 250 mg/Kg peso corpóreo. A concentração de α -tocoferol foi também checada por espectrofotometria fixando-se o comprimento de onda em 294 nm (**Anexo 2**). A solução foi aquecida por 20 min em banho-maria a 54°C antes de ser oferecida via gavagem aos animais.

Níveis de antioxidantes no tecido cardíaco

Níveis de licopeno no tecido cardíaco. Após sete semanas de suplementação com tomato oleoresina, o nível de licopeno miocárdio apresentou mediana de 64,93 nmol/kg (G2) e 86,23 nmol/kg (G6). Não existiu licopeno detectável nos demais grupos (G1, G3, G4, G5, G7 e G8). Destaca-se que o carotenóide não foi detectado inclusive nos grupos suplementados com a associação de licopeno e α -tocoferol (**Tabela 2**).

Níveis de α -tocoferol no tecido cardíaco. Após sete semanas de suplementação observamos que em relação ao grupo controle (G1), a suplementação com licopeno (G2) não alterou os níveis de α -tocoferol presentes no miocárdio. Por outro lado, como esperado, os ratos suplementados com α -tocoferol (G3) e também aqueles suplementados com a associação de licopeno e α -tocoferol (G4) mostraram níveis elevados desta substância no miocárdio. Não foi identificada diferença nos níveis de α -tocoferol entre os grupos G3 e G4. O

tratamento com DOX (G5) não modificou os níveis do suplemento em questão no tecido cardíaco. Os níveis de α -tocoferol não foram influenciados pelo tratamento com DOX (G5 vs G1; $P > 0,05$). Esta observação se manteve independente da suplementação utilizada (G6 vs G2, G7 vs G3, G8 vs G4; $P > 0,05$). Quando os animais tratados com DOX foram comparados entre si (G5, G6, G7 e G8) foi observado que a mediana dos níveis de α -tocoferol dos grupos G5 (52.326,98 nmol/kg) e G6 (49.860,79 nmol/kg) apresentaram níveis de α -tocoferol semelhantes. O mesmo ocorreu na comparação entre os grupos G7 (108597,15 nmol/kg) e G8 (106644,94 nmol/kg). Foi também identificado que os animais suplementados com α -tocoferol (G7 e G8) apresentaram níveis deste suplemento maiores do que os animais não suplementados (G5 e G6) (Tabela 2).

Avaliação da análise histológica

A análise histológica por HE mostrou que o tratamento com DOX (G5) foi seguido por distribuição multifocal de lesões e os principais destaques são apresentados na **Figura 3**. As diferenças estatísticas entre os grupos são apresentadas na **Tabela 3**. Primeiramente, destacamos que não foi observado infiltrado inflamatório em quaisquer dos grupos experimentais, exceto pela rara presença de células mononucleares ou polimorfonucleares isoladas, não caracterizando infiltrado propriamente dito. Desta forma tal variável não foi avaliada estatisticamente.

Em relação ao grupo controle (G1), a graduação destas lesões mostrou que a DOX (G5) levou a uma exacerbação significativa das lesões cardíacas identificadas pelas variáveis NN, DM e DC. Os ratos do grupo controle (G1) e aqueles suplementados com licopeno (G2) não apresentaram lesões cardíacas, embora tenha sido observada a presença de poucos vacúolos citoplasmáticos.

Por outro lado, a suplementação de α -tocoferol (G3) e de sua associação com o licopeno (G4) levou a uma piora do grau de lesão miocítica determinada pelas variáveis NN, DM e DC, sendo que ambos os grupos comportaram-se de forma semelhante entre si. A administração de α -tocoferol (G3) exacerbou ainda a visualização de vacúolos citoplasmáticos, o que não foi observado com a associação de ambos os suplementos (G4). Em relação ao grupo que recebeu DOX (G5), a suplementação de licopeno (G6), de α -tocoferol (G7) ou da associação de ambos (G8) não interferiu no grau das lesões histológicas observadas neste estudo.

Em resumo, pode-se afirmar que o modelo utilizado no presente estudo resultou em cardiotoxicidade histológica. Os grupos comportaram-se de modo muito parecido em relação às variáveis NN, DM e DC, mostrando que, na ausência de DOX, a suplementação com licopeno isoladamente não provoca lesão histológica. Ao contrário, a suplementação com α -tocoferol induziu cardiotoxicidade que não foi atenuada quando associada ao licopeno. Além disso, os resultados também mostraram que a suplementação com licopeno, isolada ou em associação com α -tocoferol, não atenuou as lesões induzidas pela DOX.

Avaliação de Colesterol e Frações

Colesterol (COL) e HDL colesterol (HDL). Em relação ao grupo controle (G1), a suplementação com licopeno (G2), α -tocoferol (G3) e com a associação de ambos (G4), não influenciou os níveis de COL e HDL. Contudo, o tratamento com DOX (G5, G6, G7 e G8) levou a um aumento significativo nos níveis destas variáveis quando comparado aos seus respectivos controles (G1, G2, G3 e G4). Quando os grupos G5, G6, G7 e G8 foram comparados entre si, foi observado que a suplementação com licopeno, com α -tocoferol ou com a

associação de ambos não atenuou a alteração induzida pela DOX (**Tabela 4 e Anexo 6**).

Triglicérides (TG). Em relação ao grupo controle (G1), a suplementação com licopeno (G2), α -tocoferol (G3) e com a associação de ambos (G4) não influenciou os níveis de TG. Contudo, o tratamento com DOX (G5, G6, e G8) levou a um aumento significativo nos níveis destas variáveis quando comparado aos seus respectivos controles (G1, G2 e G4). Destaca-se que o tratamento com a DOX não aumentou os níveis de TG nos animais suplementados com α -tocoferol (G7) em relação ao seu respectivo controle (G3). Quando os grupos G5, G6, G7 e G8 foram comparados entre si, foi observado que a suplementação com licopeno, com α -tocoferol ou com a associação de ambos não atenuou a alteração induzida pela DOX (**Anexo 6**).

LDL colesterol (LDL). Em relação ao grupo controle (G1), a suplementação com licopeno (G2), com α -tocoferol (G3) e com a associação de ambos (G4) não modificou os níveis séricos de LDL. Em relação ao grupo tratado com licopeno (G2) verificamos que o grupo suplementado com a associação de licopeno com α -tocoferol (G4) apresentou níveis maiores de LDL. O tratamento com DOX (G5, G6, e G7) levou a um aumento significativo nos níveis desta variável quando comparado aos seus respectivos controles (G1, G2 e G3). Destaca-se que o tratamento com a DOX não aumentou os níveis de LDL nos animais suplementados com a associação de licopeno com α -tocoferol (G8) em relação ao seu respectivo controle (G4). Quando os grupos G5, G6, G7 e G8 foram comparados entre si, foi observado que a suplementação com licopeno, com α -tocoferol ou com a associação de ambos não atenuou a alteração induzida pela DOX (**Tabela 4**).

Avaliação ecocardiográfica

Os resultados das variáveis morfológicas são apresentados na **Tabela 5**, **Figura 6** e **Anexo 4**. Em relação ao grupo controle (G1), a DOX (G5) levou a um aumento significativo de VEs e AE/Ao e redução de PPd, Ao e PPd/VEd. Por outro lado, as variáveis VEd e o AE não foram influenciadas pela tratamento com DOX. Ainda em relação ao grupo controle (G1), a suplementação com licopeno (G2) não interferiu em qualquer das variáveis morfológicas analisadas. Por outro lado, a suplementação com α -tocoferol (G3) reduziu PPd e Ao, ao passo que a suplementação com a associação licopeno e α -tocoferol (G4) induziu a um aumento de VEs e AE/Ao e a uma redução de PPd e PPd/VEd, comportando-se, portanto, de forma semelhante à ação da DOX. Em relação ao grupo DOX (G5), a suplementação com licopeno não interferiu na lesão provocada pela droga (G6). Já a suplementação de α -tocoferol (G7) amplificou o aumento induzido pela droga isolada sobre o VEs. Embora a DOX tenha apenas mostrado uma tendência em aumentar o VEd em relação ao grupo controle (G1), quando analisamos o grupo 7 (suplementado com α -tocoferol) verificamos que ocorreu uma amplificação do aumento de VEd induzido pela droga (G5) [embora esta variável não tenha mostrado diferença em relação ao grupo controle (G1 vs G5)]. Quando comparamos G7 com G8, identificamos que a VEd e a VEs estavam reduzidas em G8, indicando que o licopeno pode ter introduzido um efeito protetor em relação a estas variáveis. Em relação a variável Ao foi observado que a suplementação com licopeno (G6) e com α -tocoferol (G7) não modificou tal variável. Contudo, a associação de licopeno e α -tocoferol (G8) induziu um aumento de Ao.

Em resumo, o tratamento utilizado nos grupos G3 (PPd, Ao), G4 (PPd/VEd), G5 (PPd, Ao, PPd/VEd), e G7 (VEd) induziu a uma remodelação

excêntrica identificada pela alteração de pelo menos uma das variáveis AE, VEd, PPd e PPd/VEd.

As variáveis funcionais são apresentadas na **Tabela 6**. A **Figura 7** e **Anexo 5** destacam as diferenças estatísticas entre os grupos. Em relação ao grupo controle (G1), a DOX reduziu de forma significativa as variáveis funcionais A, E, Δd , FE, VAo e FC, mas não interferiu na relação E/A (**Figura 7**). A suplementação com licopeno (G2) não alterou nenhuma variável funcional. Por outro lado, α -tocoferol (G3) e sua associação com licopeno (G4) interferiram de forma negativa nas variáveis E, Δd e FE. Em relação ao grupo DOX (G5), pôde ser observado que o tratamento com qualquer um dos tipos de suplementação (G6, G7 e G8) não interferiu na agressão funcional induzida pela DOX.

As variáveis ecocardiográficas também não foram corrigidas pelo peso corpóreo dos animais em decorrência emagrecimento exagerado verificado nos animais tratados com DOX.

Em resumo, observamos que o tratamento dos grupos G3 (E, Δd , FE), G4 (E, Δd , FE) e G5 (E, A, VAo, Δd , FE), induziu à disfunção ventricular sistólica e/ou diastólica.

DISCUSSÃO

A doxorubicina (DOX) é um dos mais importantes agentes antitumorais utilizada no tratamento de diversas neoplasias humanas e animais. Contudo, sua aplicação tem sido limitada pelo seu potente efeito cardiotóxico dose-dependente capaz de levar à insuficiência cardíaca congestiva irreversível.

No presente estudo, a DOX foi injetada por quatro vezes na dose de 4 mg/kg de PC, resultando numa dose cumulativa de 16 mg/kg, equivalente a 500 mg/m² de DOX em ser humano de 50 kg (Hiroe *et al.*, 1992). O protocolo experimental utilizado simula situações clínicas onde múltiplas doses de DOX são administradas aos pacientes. A alta dose da droga levou à cardiotoxicidade evidenciável tanto histologicamente como por meio da ecocardiografia. Estes achados estão em acordo com resultados prévios obtidos pelo nosso grupo (Ferreira *et al.*, 2007^a). Esta alta dose foi selecionada para suportar a hipótese de uma possível proteção pela suplementação antioxidante.

A dose de licopeno para suplementação foi escolhida (5 mg/kg/dia) baseada em estudos experimentais prévios que mostraram um efeito protetor do licopeno na cardiotoxicidade induzida pela DOX (Karimi *et al.* 2005, Yilmaz *et al.*, 2006, Ferreira *et al.*, 2007^{a, b}).

A dose de α -tocoferol foi selecionada (250 mg/kg/dia) tendo em vista outros estudos que mostraram proteção cardíaca (Thabrew *et al.*, 1999, Wahab *et al.*, 2000, Giakoustidis *et al.*, 2002).

O presente estudo mostra que a DOX induziu a redução progressiva do tônus muscular, da atividade física e do peso corpóreo dos animais. Estas alterações não foram prevenidas com a suplementação tanto com licopeno (G6), como com α -tocoferol (G7) ou com a associação de ambos (G8). Interessante notar que mesmo na ausência do tratamento com DOX, a suplementação com α -tocoferol isolada (G3) ou em associação com o licopeno (G4) induziu discreta desaceleração do ganho de peso corpóreo dos ratos. A suplementação de licopeno não induziu tal efeito.

Foi surpreendente a baixa (6%) frequência de mortalidade observada no presente estudo, uma vez que havíamos identificado taxas de mortalidade de 50% em outros estudos de nosso grupo (Ferreira *et al.*, 2007^{a,b}), onde se utilizou modelo semelhante. Além de nossa experiência anterior, tem sido descrita frequência de mortalidade entre 50-60% (Abdel-aleem *et al.*, 1997; Danelisen *et al.*, 2002) em estudos experimentais. Alguns cuidados como a adequada posição com elevação de patas traseiras previamente à aplicação IP (droga ou salina) associada aos cuidados com a assepsia do local com álcool, com o uso de seringas/agulhas descartáveis e o não compartilhamento das mesmas, podem explicar a redução expressiva da mortalidade.

Palidez renal e serosite foram identificadas nos animais que receberam DOX. Estes sinais patológicos são características comuns tanto na toxicidade cardíaca como na renal. Desta maneira, embora não tenhamos realizado a análise histológica do tecido renal, é possível que a serosite identificada tenha sido decorrente de hipoalbuminemia, tipicamente relatada em pacientes com insuficiência renal induzida pela DOX (Deepa *et al.*, 2003). A serosite também poderia ser decorrente da falência cardíaca que foi confirmada pelas análises

histológica e ecocardiográfica. É importante ser mencionado que, usualmente, o quadro clínico de insuficiência cardíaca é acompanhado por aumento compensatório da FC o que não ocorreu neste estudo. No entanto, a queda de FC observada no presente estudo não deve ser interpretada como ausência de falência cardíaca, mas sim como provável alteração induzida pela ação do anestésico utilizado no procedimento ecocardiográfico. Esta afirmação é suportada por prévios estudos que mostraram que a DOX retarda o metabolismo dos fármacos (Bachi *et al.*, 1995; Iliskovic *et al.*, 1999) levando à depressão cardíaca causada pela xilazina (Massone, 1994). Este efeito já havia sido observado em trabalhos anteriores de nosso grupo e, por isso, tomamos o cuidado de reduzir pela metade a dose dos anestésicos, conforme descrito em material e métodos. Contudo, esta decisão não foi suficiente para impedir a redução da FC. Desta forma, não foi possível usar esta variável para esclarecer a causa da serosite. Qualquer uma das suplementações com antioxidantes (G6, G7 e G8) não atenuou a serosite induzida pela DOX.

Peso cardíaco

A DOX induziu uma redução do peso cardíaco. Esta redução pode ser decorrente da morte celular miocárdica induzida pela DOX (G5) a qual foi confirmada histologicamente pela marcada necrose miocítica. Este resultado está em concordância com prévios relatos (Van Boxtel *et al.*, 1978, Olson *et al.*, 1990, Singal *et al.*, 1998, Quiles *et al.*, 2002). A suplementação com qualquer um dos antioxidantes não preveniu a redução de peso cardíaco induzida pela DOX, o que também foi confirmado pela histologia. Contrariamente ao descrito, estudo prévio identificou atenuação da perda de massa cardíaca após a suplementação com vitamina E de animais tratados com DOX (Myers *et al.*, 1976). Concomitantemente, há descrição de aumento relativo do peso cardíaco

de ratos Wistar após tratamento com dose inferior de vitamina E (Yang & Desai, 1977) à empregada no presente estudo. De fato, o estudo de Yang & Desai (1977) utilizou 10.000 UI e 25.000 UI de vitamina E/kg de dieta/8 meses, o que corresponde a aproximadamente 90 UI e 225 UI da vitamina/animal/dia/8 meses, respectivamente. Este cálculo foi realizado considerando-se que a ingestão diária de dieta de um rato Wistar (peso corpóreo, 400g) seja de aproximadamente 9 g. Em relação ao licopeno, não há até o presente momento relatos na literatura consultada sobre o efeito deste carotenóide no peso cardíaco de animais tratados ou não com DOX, o que impossibilita comparações com outros estudos.

A redução de peso cardíaco identificada em nosso estudo também poderia ter sido influenciada pela perda de peso corporal ocorrida nos animais que receberam DOX (G5, G6, G7 e G8) e também naqueles que receberam α -tocoferol isoladamente ou associado ao licopeno (G3 e G4). Embora não tenha sido aferido o consumo diário de dieta pelos ratos, podemos supor que houve redução da ingestão protéico-calórica nos grupos acima citados o que, comprovadamente, restringe o ganho de peso corporal e do VE (Cicogna *et al.*, 1999).

Efeito dos suplementos em suas respectivas concentrações totais no tecido cardíaco

O tratamento oral com 5 mg/kg/dia/7 semanas de licopeno resultou na detecção de licopeno no tecido cardíaco saponificado. Embora poucos estudos tenham avaliado o nível de licopeno cardíaco, os níveis encontrados nos animais do grupo G2 são consistentes com estudos prévios (Ferreira *et al.*, ^{a, b}). Outro estudo usando corações humanos adultos obtidos de autópsias mostrou maior

valor de níveis de licopeno cardíaco. Contudo, a história de suplementação de licopeno nesta população era desconhecida (Kaplan *et al.*, 1990).

O tratamento oral com 250 mg/kg/dia/7 semanas de α -tocoferol levou à detecção deste antioxidante no tecido cardíaco saponificado. Existem poucos relatos na literatura sobre o nível de α -tocoferol cardíaco. Estudo prévio identificou maior concentração de α -tocoferol cardíaco (93000 nmol/kg tecido cardíaco) em ratos não suplementados. Os autores, contudo, não referem o valor de α -tocoferol na composição da dieta (Danelisen *et al.*, 2002).

Uma vez que não foi detectado qualquer nível de licopeno na dieta dos animais, a observação de concentrações elevadas deste carotenóide no tecido cardíaco de ratos suplementados com este carotenóide era esperada (G2 vs G1 e G6 vs G5), confirmando sua absorção. De forma semelhante, esperávamos que os grupos que receberam a associação de licopeno e α -tocoferol (G4 e G8), também mostrassem níveis elevados do carotenóide no miocárdio. Surpreendentemente, na presença de α -tocoferol e, independente da administração de DOX, não foi detectado qualquer nível de licopeno no tecido cardíaco analisado. A causa da ausência de detecção de licopeno no tecido cardíaco de ratos suplementados com a associação licopeno e α -tocoferol é desconhecida. Nós especulamos que o α -tocoferol pode, de alguma maneira, ter acelerado o metabolismo do licopeno diminuindo, portanto, os níveis de licopeno *todo-trans*- e *cis*- que, são os isômeros habitualmente detectados pelo sistema HPLC. É, no entanto, descrito o oposto em relação ao β -caroteno. Estudo *in vitro* mostrou que o metabolismo do β -caroteno é retardado na presença do α -tocoferol (Yeum *et al.*, 2000). Uma outra questão a ser levantada é a de que a fonte de licopeno ("tomato oleoresina") utilizada neste estudo é composta por

vários outros antioxidantes (γ -tocoferol, α -tocoferol, β -caroteno, fitoflueno, e fitoeno) (Richelle *et al.*, 2002). Desconhecemos, no entanto, o comportamento de tais componentes da oleoresina na vigência de dose adicional de α -tocoferol. A literatura consultada apresenta estudos que destaca o efeito sinérgico benéfico entre o licopeno e outros antioxidantes como o α -tocoferol (Pastori *et al.*, 1998, Fuhrman *et al.* 2000, Shi *et al.*, 2004), β -caroteno, flavonóides como a glabridina, entre outros (Fuhrman *et al.* 2000). Não encontramos, no entanto, dados que suportassem a hipótese de possíveis efeitos antagônicos entre o licopeno e os antioxidantes presentes na solução de tomate oleoresina, impossibilitando assim qualquer discussão. Outra possibilidade é estar ocorrendo algum fenômeno oxidativo induzido pela suplementação com α -tocoferol que, preferencialmente tenha consumido mais licopeno do que α -tocoferol. Esta é uma possibilidade relevante, uma vez que foi identificada uma toxicidade induzida pela suplementação com α -tocoferol. Em síntese, a não detecção do licopeno no coração de ratos suplementados com a associação pode pelo menos em parte ser resultado de: 1) alto consumo preferencial de licopeno via estresse oxidativo, e/ou; 2) aceleração do metabolismo de licopeno estimulado pela presença de α -tocoferol. Nenhum outro marcador de estresse oxidativo foi utilizado, mas a possibilidade de lesão induzida pelo α -tocoferol foi confirmada tanto histológica como ecocardiograficamente, e este poderá ser assunto de um futuro projeto.

Efeito da DOX nos níveis de licopeno e α -tocoferol no tecido cardíaco

Os níveis de licopeno no miocárdio não diminuíram com o tratamento com DOX (G2 vs G6). Estes resultados estão de acordo com prévio estudo que mostrou a manutenção do nível de licopeno cardíaco em modelo de

cardiotoxicidade induzida pela DOX (Ferreira *et al.*, 2007). A terapia com DOX também não diminuiu os níveis de α -tocoferol no miocárdio de ratos suplementados com tal substância (G3 vs G7). Não há dados na literatura mostrando o efeito da suplementação com α -tocoferol tanto nos níveis cardíacos deste antioxidante como na cardiotoxicidade induzida pela DOX, o que impede comparações. Contudo, coração de ratos não suplementados e tratados com DOX apresentou manutenção dos níveis de α -tocoferol (oriundo da dieta) (Danelisen *et al.* 2002).

A razão da manutenção dos níveis de α -tocoferol e licopeno é desconhecida. Contudo, estudo prévio mostrou que animais tratados com DOX apresentaram um retardo do metabolismo de licopeno. Este retardo se traduziu por um aumento do licopeno intacto (*todo-trans-* e *cis-*) e redução dos subprodutos do metabolismo do licopeno (produtos de clivagem e produtos de oxidação) (Ferreira *et al.*, 2007^c).

Estudos relacionados à toxicidade induzida pela DOX têm descrito tanto aumento (Quiles *et al.* 1999) como diminuição da lipoperoxidação após a infusão da droga (Minotti *et al.*, 1996). Esta controvérsia sobre o estado do estresse oxidativo é possivelmente devido ao potencial de dois diferentes mecanismos patológicos, um para toxicidade aguda e outro para toxicidade crônica. Alguns estudos usando suplementação antioxidante falharam em mostrar efeitos protetores sobre a cardiomiopatia induzida pela DOX (Van Vleet *et al.*, 1980, Legha *et al.*, 1982). Por outro lado, desenhos experimentais agudos (dose única de DOX) têm apontado para o comprometimento de componentes antioxidantes hidrofílicos (Deepa *et al.*, 2003, Yilmaz *et al.*, 2006) e lipofílicos (Deepa *et al.*, 2003) em tecidos cardíacos. Estes estudos sugerem que a cardiotoxicidade aguda provocada pela DOX está relacionada ao estresse oxidativo, ao passo que

a administração crônica do quimioterápico está associada a outros mecanismos de toxicidade, tais como redução da produção de energia no miocárdio. Desta forma, foi recentemente sugerido que a terapia crônica com DOX deve exercer pelo menos parte da sua cardiotoxicidade pelo retardo do metabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa no coração (Abdel-aleem *et al.*, 1997), que é acompanhado pelo aumento sérico do colesterol total, triglicérides e LDL (Iliskovic *et al.*, 1997). Este fenômeno foi observado no presente estudo uma vez que todos os animais que receberam DOX isolada ou em associação com os suplementos, exibiram aumento dos níveis séricos de colesterol e de suas frações (**Tabela 4 e Anexo 6**). Devido aos ácidos graxos de cadeia longa constituírem os principais substratos para produção de energia no miocárdio adulto aeróbico (Neely *et al.*, 1974), a inibição do metabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa poderia levar à cardiomiopatia pela deficiência no suprimento de energia (Corr *et al.*, 1985).

Sabe-se que a maior parte do licopeno (Krinsky *et al.*, 1958) e do α -tocoferol (Esterbauer *et al.*, 1987) é transportada via LDL. Uma vez que a DOX pode aumentar os níveis de LDL, especulamos que uma maior disponibilidade de LDL poderia ser um mecanismo importante para explicar a razão da manutenção dos níveis de tais antioxidantes no coração. A manutenção de licopeno já havia sido observada previamente, por nosso grupo, em fígado, plasma e coração de ratos suplementados com este carotenóide e tratados com DOX (Ferreira *et al.*, 2007^a). Esta afirmação é suportada por outro estudo que reportou níveis de α -tocoferol hepático maiores em ratos tratados com DOX quando comparados aos animais do grupo controle (Danelisen *et al.*, 2002).

Avaliação histológica

Ação da DOX

As alterações identificadas por análise histológica semiquantitativa e duplamente cega de miocárdio (vacuolização citoplasmática, necrose nuclear, degeneração miocítica, infiltrado inflamatório e desorganização miofibrilar) de animais submetidos à DOX, valida o protocolo experimental utilizado para indução de cardiotoxicidade pelo quimioterápico em questão.

Ação dos suplementos

A suplementação isolada com licopeno (G2) não alterou quaisquer das variáveis histológicas estudadas. Por outro lado, foi observada uma exacerbação da perda miocítica (NN e DM) e da desorganização celular em ratos suplementados com α -tocoferol (G1 vs G3) mostrando um efeito agressor deste suplemento sobre a cardiomiócito. Não foi observada atenuação destas lesões histológicas quando utilizamos a associação de licopeno e α -tocoferol (G3 vs G4), sugerindo, desta maneira, que o licopeno não foi capaz de proteger a célula cardíaca das alterações provocadas pelo α -tocoferol. A perda de miofilamentos, a vacuolização citoplasmática, a necrose celular e a perda de miócitos também foram observadas em estudo prévio (Legha *et al.*, 1982), onde animais foram submetidos à deficiência de α -tocoferol.

Na presença de DOX (G5, G6, G7 e G8), nenhuma das suplementações interferiu no sentido de acentuar ou atenuar a lesão induzida pelo quimioterápico. De fato, o licopeno não interferiu nas alterações histológicas (necrose nuclear, degeneração miocítica e desorganização celular) induzidas pela DOX o que também foi observado nas demais variáveis estudadas (pesos cardíaco e corpóreo, e variáveis ecocardiográficas à exceção da variável

PPd/VEd). Quando comparamos os resultados histológicos com os dados morfológicos obtidos pelo ecocardiograma, observamos que o α -tocoferol acentua a remodelação excêntrica (VEd e VEs) apenas na presença de DOX (G5 vs G7), o que não ocorre na ausência da droga (G1 vs G3). Houve atenuação da remodelação induzida pelo α -tocoferol quando associado ao licopeno (G7 vs G8), sugerindo que o licopeno preveniu o agravamento da lesão induzida pelo α -tocoferol na presença da DOX. Esta proteção conferida pelo licopeno, no entanto, é evidente apenas quando a DOX está envolvida na lesão miocítica. De fato, quando analisamos somente os grupos G1, G2, G3 e G4, pudemos identificar que a ação protetora do licopeno não ocorreu. A falta de consistência entre os dados histológicos e morfológicos (em relação ao licopeno) verificada neste estudo impede a afirmação de que o licopeno exerça de fato um efeito protetor sobre o miocárdio de ratos tratados com DOX, embora nosso estudo anterior tenha detectado atenuação significativa da fragmentação de DNA com a suplementação do carotenóide em cardiomiócitos de ratos tratados com o quimioterápico (Ferreira *et al.*, 2007^b). Já o papel agressor do α -tocoferol é evidente tanto quando analisamos as variáveis histológicas como quando interpretamos as variáveis ecocardiográficas (morfológicas e funcionais). Por outro lado, constatou-se que o α -tocoferol diminuiu, *in vivo* e *in vitro*, a gravidade e a incidência das lesões histológicas cardíacas induzidas pela administração aguda de DOX em decorrência do melhora de níveis de GSH (Legha *et al.*, 1982). Não há na literatura consultada, contudo, estudos mostrando que esta alta dose de α -tocoferol (250 mg/kg), pode levar a alterações histológicas em cardiomiócitos.

A variação observada nestes resultados pode indicar ainda que, o modelo experimental adotado pode ter interferido na magnitude das lesões

miocárdicas. Dentre as diferenças de modelos devemos destacar a espécie e linhagem do animal, o fracionamento da DOX, as doses de antioxidantes e o período de avaliação após o tratamento com a DOX. Uma semana após o fim do tratamento pode corresponder a um período de transição onde a recuperação de lesões poderia ser evidente com uma análise histológica mais acurada e sensível, como a microscopia eletrônica. Nossa decisão por avaliar os animais após um curto período (1 semana) após a DOX foi baseada na alta mortalidade (50%) após a última dose de DOX identificada em estudo anterior (Ferreira *et al.*, 2007^a).

De qualquer maneira, estudos prévios têm apontado para a utilidade da histologia como análise prognóstica da cardiotoxicidade induzida pela DOX (Billingham *et al.*, 1978; Petit *et al.*, 2004). A evidência histopatológica inequívoca de lesões miocárdicas identificadas no G5 está em acordo com estudos anteriores que submeteram animais (Saad *et al.*, 2001; Koh *et al.*, 2002; Yagmurca *et al.*, 2003; Yilmaz *et al.*, 2006) e pacientes humanos (Lefrak *et al.*, 1975; Billingham *et al.*, 1978) ao tratamento com DOX. Áreas com desorganização na morfologia miofibrilar (Yagmurca *et al.*, 2003; Saad *et al.*, 2001; Yilmaz *et al.*, 2006), vacuolização citoplasmática (Santos *et al.*, 2002; Yilmaz *et al.*, 2006) e alterações nucleares (Yagmurca *et al.*, 2003) têm sido descritas em diferentes modelos experimentais de animais após elevada dose de DOX. Estudo prévio mostrou que após período superior a uma semana do tratamento com DOX, ocorreu atenuação de danos histológicos cardíacos em animais submetidos à suplementação com antioxidantes. Tal estudo mostrou que a administração de erdoesteina, um antioxidante derivado da cisteína, atenuou as alterações histológicas miocárdicas de ratos de outra linhagem (Sprague-Dawley) após 10 dias de uma única dose de DOX (Yagmurca *et al.*,

2003). A administração de deferoxamina também melhorou os danos histológicos após única dose de DOX em ratos (Saad *et al.*, 2001). Por outro lado, outros estudos não mostraram melhora histológica após suplementação com antioxidantes. Assim, a suplementação com licopeno (3,5 mg/kg/dia/4 dias) não levou a atenuação marcante tanto na inflamação como na degeneração miocítica em camundongos após 3 dias da administração única de DOX (15 mg/kg) (Karimi *et al.*, 2005). Da mesma forma, não foi observada melhora histológica cardíaca após 3 semanas do tratamento fracionado com DOX em cães suplementados com α -tocoferol (Van Vleet *et al.*, 1980).

Os resultados dos estudos citados nos levam a questionar sobre o mecanismo de lesão envolvido na cardiotoxicidade resultante do protocolo utilizado no presente estudo. De maneira geral, nota-se que existe efeito protetor do antioxidante quando o modelo experimental é agudo (dose única de DOX). Em contrapartida, quando o modelo é crônico (múltiplas doses de DOX), o efeito protetor do antioxidante não é evidente. Em conjunto, pode ser sugerido que o estresse oxidativo não deve ser fator determinante na patogênese da lesão crônica. Pode ser sugerido também, que o nosso modelo inclui lesões agudas e crônicas (crônica reagudizada). De fato, em relação às três primeiras doses de DOX, o modelo deve ser considerado crônico. Contudo, deve também ser considerado agudo porque a última dose de DOX foi administrada apenas 1 semana antes da análise histológica. Apesar de no presente estudo não termos avaliado o depósito de colágeno que, usualmente, é um marcador de lesão crônica, nosso grupo já havia observado expressivo aumento do colágeno intersticial miocárdico utilizando o mesmo modelo experimental (Ferreira *et al.*, 2007^a). Assim, a exemplo do ocorrido

anteriormente, é provável que a lesão cardíaca ocorrida nos animais do presente estudo também contenha depósito de colágeno.

Avaliação ecocardiográfica

A avaliação seriada ecocardiográfica corresponde ao método não invasivo mais importante para o acompanhamento da evolução da cardiomiopatia induzida pelas antraciclinas.

As variáveis estudadas foram selecionadas baseadas nos achados de literatura que descrevem alterações de desempenho sistólico, diastólico e aumento de câmaras esquerdas após tratamento com DOX (Delgado *et al.*, 2004; Ha 2005; de Andrade 2005; Katona 2004; Matsui 1999; Koh 2004).

Face a extensa e necessária discussão ecocardiográfica, apresentaremos inicialmente um resumo das interpretações para facilitar a leitura dos detalhes. A lesão induzida pela DOX foi evidenciada pela remodelação excêntrica (PPd, Ao, PP/VEd) e pelos índices de função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, o que valida o modelo experimental adotado. Surpreendentemente, algumas dessas alterações foram também identificadas no grupo (G3) suplementado apenas com α -tocoferol, sugerindo que este suplemento pode ter induzido remodelação cardíaca e disfunção sistólica e diastólica. A associação de α -tocoferol com licopeno também levou a alterações morfológicas e funcionais. Contudo, a associação licopeno e α -tocoferol (G4) atenuou a remodelação induzida pelo α -tocoferol (G3). A ação cardiotoxica observada pela ação da DOX (G5) não foi prevenida pela suplementação com qualquer antioxidante isolado ou em associação (G6, G7, G8). Ao contrário, pudemos identificar que a suplementação com α -tocoferol aos animais tratados

com DOX (G7) parece ter desvendado um sinal de remodelação (VE_d) que não havia sido significativo nos animais tratados apenas com DOX sem suplementação (G5 vs G1, $p > 0,05$). Além disso, também observamos que a suplementação com α -tocoferol aos animais tratados com DOX (G7) acentuou a disfunção sistólica (VEs) já verificada pela ação da DOX sem suplementação (G5). Por outro lado, a associação de licopeno ao α -tocoferol em animais tratados com DOX (G8) parece ter induzido um efeito atenuador da toxicidade do α -tocoferol tanto na remodelação (VE_d) como na disfunção sistólica (VEs).

Ação da DOX (G1 vs G5)

Apesar da não alteração de VE_d, pode ser afirmado que a DOX induziu adelgaçamento da parede e remodelação ventricular demonstradas pelo aumento de AE/Ao e redução de PP/VE_d, sugerindo perda miocítica. Esta perda miocítica foi confirmada tanto pela histologia como pela análise de peso cardíaco. As alterações morfológicas referidas foram acompanhadas por disfunção sistólica. Estes resultados devem ser interpretados com cautela, tendo em vista que a variação observada em VAO, FE, e Δd pode estar sob a influência da redução da FC. É importante ressaltar também que as variações do diâmetro ventricular e da FE não avaliam contratilidade e, portanto, não podem ser utilizadas como indicadores desta propriedade intrínseca do miocárdio. Além da contratilidade, o desempenho sistólico do VE depende da pré e pós-carga. Aumentos na pós-carga, redução na pré-carga e/ou na contratilidade causam redução na FE e Δd (Boon *et al.*, 1998). Pré e pós-carga, por sua vez, dependem da dimensão da câmara ventricular, da espessura de sua parede e da pressão arterial (PA). No presente estudo, não se avaliou a PA, mas as alterações geométricas do ventrículo, detectadas pelo ecocardiograma, justificam a pressuposição de que os animais operavam sob um regime de pré e

pós-carga aumentadas. Isto é, o aumento do raio da cavidade durante a sístole (VEs) e a redução da espessura da parede (PPd) podem ter contribuído para o prejuízo adicional do desempenho sistólico do ventrículo esquerdo. No entanto, apesar da ausência de índices mais específicos da função contrátil do miocárdio e, mesmo diante da redução de FC observada no grupo DOX, é possível assumir que a necrose histologicamente confirmada no músculo cardíaco foi suficiente para justificar o prejuízo da contratilidade e da conseqüente disfunção sistólica. Outra observação relevante foi o aumento da relação AE/Ao determinado pela redução do diâmetro da aorta, sem uma correspondente alteração do diâmetro do AE. A ausência de aumento significativo do AE pode decorrer do viés causado pelo menor peso animal. Contudo, uma vez corrigido com a normalização da dimensão atrial pela dimensão da raiz da aorta, foi possível evidenciar que de fato houve um aumento da câmara atrial. Em resumo, os resultados apresentados sugerem que a DOX induziu remodelação cardíaca excêntrica associada à disfunção sistólica e diastólica do VE. A disfunção sistólica identificada no presente estudo está em concordância com prévios estudos em pacientes (Sung *et al.*, 1997; Marchandise *et al.*, 1989) ou em animais tratados com DOX. Experimentalmente, tem-se identificado tanto redução de FE (Delgado *et al.*, 2004; Ha *et al.*, 2005) como redução de Δd em cães (de Andrade *et al.*, 2005) e ratos (Katona *et al.*, 2004) com significativa deterioração da função sistólica após a 4ª semana do tratamento com DOX (Koh *et al.*, 2004). Outras alterações como o aumento de átrio esquerdo (AE/Ao) em ratos (Katona *et al.*, 2004) e remodelação ventricular excêntrica (PP, PP/VEd) em crianças (Lipshultz *et al.*, 1995) também são confirmadas por outros estudos sobre o efeito da DOX na geometria cardíaca.

Ação do licopeno (G1 vs G2; G5 vs G6)

Não foi observada nenhuma alteração funcional ou geométrica cardíaca nos animais suplementados com licopeno isoladamente (G2). Da mesma maneira, as alterações induzidas pela DOX não foram atenuadas pela suplementação do licopeno (G5 vs G6). Estudos prévios que abordaram a ação benéfica do licopeno na cardiotoxicidade induzida pela DOX não incluíram avaliação ecocardiográfica (Yilmaz 2006; Karimi 2005), impossibilitando qualquer comparação. Por outro lado, estudo recente mostrou correlação positiva entre os níveis séricos de licopeno e o valor da fração de ejeção de pacientes portadores de grave insuficiência cardíaca congestiva (classe III), sugerindo que este carotenóide pode ter efeito benéfico na disfunção sistólica (Polidori *et al.*, 2002).

Ação do α -tocoferol (G1 vs G3; G5 vs G7)

Quando comparado com o grupo controle (G1), observamos prejuízo funcional sistólico e diastólico do VE além de alteração geométrica induzidos pela suplementação com α -tocoferol isoladamente (G3), comportamento este semelhante à ação da DOX (G5). Essas alterações sugerem que a suplementação com α -tocoferol (G3) levou a um adelgaçamento de parede sugerindo uma perda miocítica ou atraso no crescimento corporal geral. Apesar da perda miocítica não ter sido confirmada histologicamente, é possível inferir que, face ao prejuízo funcional identificado pela redução de encurtamento e da fração de ejeção do VE, leva-nos a enfatizar a hipótese de que o α -tocoferol causou a perda miocítica e enfraquecer a hipótese de atraso no crescimento do animal. Esses surpreendentes resultados sugerem efeito cardiotóxico do α -tocoferol.

Quando analisamos o efeito da suplementação dessa vitamina na cardiotoxicidade induzida pela DOX (G7) pudemos verificar ausência de

proteção. Mais do que isso, pudemos identificar que, a suplementação de α -tocoferol aos ratos tratados com DOX causou alteração geométrica do VE não observada com o tratamento isolado de DOX. Portanto, pode-se concluir que as alterações morfológicas induzidas pela DOX foram intensificadas pela suplementação com α -tocoferol (G7), sem reflexo na piora adicional da função. O curto período de seguimento de uma semana adotado (ecocardiograma ocorreu uma semana após o fim do tratamento com a DOX) pode ter impedido a demonstração de perda adicional da função.

Esses resultados reforçam a hipótese de um efeito tóxico (G7 vs G5) desta vitamina sobre o coração, como também um efeito deletério potencializado. É bem conhecido o efeito protetor do α -tocoferol sobre a etapa de propagação da lipoperoxidação. No entanto, este efeito ocorrerá de modo completo se houver um número de 2 radicais lipoperoxil ($\text{LOO}^\bullet$) disponíveis para cada molécula de α -tocoferol. Caso essa proporção não seja guardada, ocorrerá a formação de radicais tocoferoxil ($\alpha\text{-T}^\bullet$), considerado um composto instável capaz de induzir fenômeno pro-oxidante. Este é um dos mecanismos classicamente descritos que explicam a razão de antioxidantes serem também potencialmente indutores de estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge *et al.*, 1999).

Apesar do possível efeito prooxidante do α -tocoferol, a cardiotoxicidade identificada pelo ecocardiograma no presente estudo não foi relatada na extensa revisão de literatura realizada. São referidos apenas transtornos vasculares (Keaney 1994) e redução de coagulação (Schulte *et al.*, 2006) após suplementação desta vitamina mesmo em baixas doses. O desequilíbrio na relação moléculas de α -tocoferol por moléculas de $\text{LOO}^\bullet$ poderia ocorrer devido a dose de α -tocoferol ou em decorrência do excesso de

LOO^{*}. Contudo, prévios estudos não mostraram toxicidade após 250 mg/kg de vitamina E (Wahab *et al*; 2000).

Ao contrário de toxicidade, o resultado de revisão da literatura mostra que, mesmo em doses mais elevadas, a suplementação com vitamina E leva a proteção contra o estresse oxidativo. Sonneveld *et al* (1978) administraram 3200 UI/kg (equivalente a 3200 mg/kg de α -tocoferol) de vitamina E, por via subcutânea, 24 horas antes da administração de DOX. Seus resultados demonstraram que o α -tocoferol inibiu a lipoperoxidação induzida pela DOX. Wahab *et al* (2000) notaram que a administração de 250 mg/kg/dia de vitamina E a camundongos, durante 30 dias, aumentou os níveis de GSH e SOD e reduziu os níveis de MDA, no tecido cardíaco, além de melhorar a atividade antitumoral da DOX. O α -tocoferol também tem induzido benefício em outros modelos de estresse oxidativo. Assim, modelo em ratos Wistar usando isquemia e reperfusão hepática mostrou que, altas doses de α -tocoferol (300 mg/kg/dia/3 dias) contribuíram para a redução da lipoperoxidação (Giakoustidis *et al*, 2002). Da mesma forma, Amann *et al* (2002) identificaram efeito protetor da vitamina ao administrarem 3000 UI/kg/semana (equivalente a 3000 mg/kg/semana/12semanas) de α -tocoferol a ratos Sprague Dawley submetidos à insuficiência renal experimental crônica. Os resultados desse estudo mostraram que, o α -tocoferol preveniu a queda do hematócrito e o desarranjo capilar e celular cardíaco do VE, além de reduzir a fibrose intersticial miocárdica e os níveis de endotelina 1 (ET1). Os autores ainda salientaram que a administração de vitamina E pode não ser suficiente para reduzir os níveis de espécies reativas se o estresse oxidativo for excessivamente massivo, mas a utilização de uma dose muito alta, como a empregada neste estudo, não resultou em toxicidade. Por outro lado, alguns autores chamam atenção para um possível efeito pró-oxidante da vitamina E,

bem como de outras vitaminas antioxidantes (Albanês *et al.*, 1996, Versari *et al.*, 2006), devendo-se levar em consideração, entre outros fatores, a possibilidade de processo oxidativo quando sob regime de altas doses de antioxidantes (Wang *et al.*, 2002). Seguindo este raciocínio, o butilato hidroxitolueno (BHT), conhecido por sua ação antioxidante, quando administrado em doses elevadas a ratos Wistar, demonstrou efeitos tóxicos sobre os lipídeos séricos (Faine *et al.*, 2006). Desta forma, este aparente efeito tóxico da vitamina E, observado em nosso estudo, merece ser futuramente estudado.

Ação da associação licopeno+ α -tocoferol (G1 vs G4; G5 vs G8)

A associação licopeno com α -tocoferol também levou a alterações relacionadas à remodelação excêntrica ventricular, aumento atrial esquerdo, disfunção sistólica e disfunção diastólica. Contudo, a associação de licopeno ao α -tocoferol (G4) atenuou a remodelação induzida pelo α -tocoferol (G3). Até o momento não encontramos estudos sobre efeito tóxico desta associação, o que impede realizarmos comparações.

Em relação ao papel da associação licopeno e α -tocoferol na cardiotoxicidade induzida pela DOX (G5 vs G8), foi identificado um aumento na variável Ao, indicando que a associação vitamínica anulou o efeito da DOX sobre o diâmetro da aorta. Não podemos, no entanto, valorizar esta variável isoladamente, uma vez que o diâmetro da aorta pode estar associado à pressão arterial (PA), entre outros fatores. Como não aferimos a PA neste estudo, o efeito da associação dos suplementos observado na Ao não deve ser interpretado simplesmente como protetor. Pudemos identificar que a suplementação com α -tocoferol aos animais tratados com DOX (G7) parece ter desvendado um sinal de remodelação (VEd) que não havia sido significante nos

animais tratados apenas com DOX sem suplementação. Além disso, também observamos que a suplementação com α -tocoferol aos animais tratados com DOX (G7) amplificou a piora da função sistólica (VEs) já verificada pela ação da DOX sem suplementação (G5). Por outro lado, a associação de licopeno ao α -tocoferol em animais tratados com DOX (G8) parece ter induzido um efeito atenuador da toxicidade do α -tocoferol tanto na remodelação (VEd) como na disfunção sistólica (VEs). A esta altura, podemos sugerir que o licopeno foi capaz de atenuar o estresse oxidativo cardíaco induzido não apenas pelo α -tocoferol isoladamente, mas também quando α -tocoferol está associado a DOX.

Até o momento, não há relatos sobre o papel da associação de α -tocoferol e licopeno na toxicidade induzida pela DOX. Contudo, é descrita uma ação sinérgica protetora das vitaminas em outros modelos de estresse oxidativo. De fato, foi descrita inibição da proliferação celular no carcinoma de próstata (Pastori *et al.*, 98) e redução da oxidação do LDL colesterol (Fuhrman *et al.*, 2000).

Em resumo, no presente estudo, foi observado que a DOX induziu lesão miocárdica, a qual não foi atenuada com a suplementação com licopeno e α -tocoferol. Quando os suplementos foram administrados isoladamente (na ausência de DOX) identificamos pela primeira vez, que o α -tocoferol induziu cardiotoxicidade (histológica e ecocardiográfica) não prevenida pela associação com o licopeno.

Os surpreendentes resultados deste experimento não puderam ser esclarecidos com base na literatura disponível, merecendo assim o desenvolvimento de projetos que envolvam variação do protocolo experimental

atual e estudo do metabolismo do licopeno. O emprego de dose inferior a 250 mg/Kg de α -tocoferol, o aumento do período de avaliação após o tratamento com DOX, bem como o estudo do efeito do α -tocoferol no metabolismo do licopeno poderão ser objetos de futuros projetos.

Conclusões

- 1- A DOX induziu alterações clínicas gerais durante o estudo e também diminuição do peso corpóreo, peso cardíaco e comprometimento morfo-funcional *in vivo* o qual foi compatível com as lesões histológicas do miocárdio.
- 2- A suplementação com licopeno (G2) não induziu alterações gerais, de peso corpóreo, de peso cardíaco, ecocardiográficas ou histológicas. A suplementação com licopeno não atenuou as alterações provocadas pela DOX (G6).
- 3- A suplementação com α -tocoferol (G3) induziu perda de peso corpóreo, peso cardíaco e não atenuou tais alterações induzidas pela DOX (G7). O α -tocoferol induziu cardiotoxicidade confirmada ecocardiográfica e histologicamente (G3). A suplementação com α -tocoferol não só não atenuou as alterações provocadas pela DOX como as amplificou (G7), revelando-se um provável agente agressor adicional. As alterações ecocardiográficas introduzidas pela suplementação com α -tocoferol nos animais tratados com DOX (G7) não foram observadas histologicamente.
- 4- A suplementação com α -tocoferol e licopeno associados (G8) ou não (G4) à DOX não interferiu nas variáveis de peso corpóreo ou peso cardíaco. A associação de ambos os suplementos (G4) resultou em prejuízo funcional e remodelação excêntrica do VE. A suplementação com α -tocoferol e

licopeno não atenuou as lesões induzidas pela DOX (G8). Contudo, preveniu o aumento do diâmetro ventricular na diástole (VE_d) e melhorou a disfunção diastólica (VE_s). Estes resultados podem indicar que o licopeno foi agente atenuador da lesão adicional gerada pelo α -tocoferol à agressão da DOX.

- 5- O tratamento com DOX foi associado ao aumento sérico de colesterol, triglicérides, HDL-colesterol e LDL-colesterol. A suplementação com antioxidantes (isolados ou em associação) não atenuou tal alteração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-aleem, S., *et al.*, (1997). Acute and chronic effects of adriamycin on fatty acid oxidation in isolated cardiac myocytes. *Journal of Molecular & Cell Cardiology*, 29: p. 789-797.

Abou El Hassan M, Heijn M, Rabelink M, van der Vijgh, W, Bast A & Hoebe R (2003). The protective effect of cardiac gene transfer of CuZn-SOD in comparison with the cardioprotector monohydroxyethylrutoside against doxorubicin-induced cardiotoxicity in cultured cells. *Cancer Gene Therapy*, 10:270-277.

Albanes, D. *et al.* (1996). Alpha-tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(21): 1560-1570.

Albert DS, Peng YM & Moon TE (1978). Alpha-tocopherol pretreatment increases adriamycin bone marrow toxicity. *Biomedical*, 29:189-191.

Amann K, Törnig J, Buzello M, Kuhlmann A, Gross ML, Adamczak M, Buzello M & Ritz E (2002). Effect of antioxidant therapy with dl-[alpha]-tocopherol on cardiovascular structure in experimental renal failure. *Kidney International*, 62(3):877-884.

Antunes LM & Takahashi CS (1998). effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research*, 419:137-143.

Aversano RC & Boor PJ (1983). Histochemical alterations of acute and chronic doxorubicin cardiotoxicity. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 15:543-53.

Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Kelly J & Stohs SJ (1995). Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats. *Toxicology*, 95:1-9.

Balestrieri ML, Prisco R, Nicolaus B, Pari P, Moriello VS, Strazzullo G, Iorio EL, Servillo L & Balestrieri C (2004). Lycopene in association with α -tocopherol or tomato lipophilic extracts enhances acyl-platelet-activating factor biosynthesis in endothelial cells during oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(8):1058-1067.

Bieri JG, Corash L & Hubbard Van S (1983). Medical uses of vitamin E. *The New England Journal of Medicine*, 308: 1063-1071.

Billingham ME, Mason JW, Bristow MR & Daniels JR (1978). Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treatment Reports*, 62: 865-872.

Boon, J. A. (1998). Evaluation of size, function and hemodynamics In: Boon, J. A. (editor). *Manual of veterinary echocardiography*, 1st ed. Williams & Wilkins, p. 151-260.

Braunwald E, Shulman LN, Rosenthal DS (1999). Distúrbios hematológicos-oncológicos e cardiopatias. In: Braunwald E. Tratado de medicina cardiovascular. São Paulo: Ed. Roca Ltda; p. 1930-1934.

Breed JG, Zimmerman AN, Dormans JA & Pinedo HM (1980). Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Research*, 40: 2033-2038.

Chabner BA (1996). Agentes antineoplásicos. In: Gilman A G & Goodman L S (Editors). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 9th ed. McGraw Hill, 932-933.

Cicogna AC *et al.* (1999). Efeito da restrição protéico-calórica sobre a função mecânica dos músculos cardíacos hipertrofiados. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, 72(4): 431-435.

Corr PB, Gross RS & Sobel BE (1985). Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium. *Circulatory Research*, 55: 135-154.

Danielson I *et al.* (2002). Maintenance of myocardial levels of vitamin A in heart failure due to adriamycin. *Journal of Molecular & Cell Cardiology*, 34: 789-795.

de Andrade JN *et al.* (2005). Plication of the free wall of the left ventricle in dogs with doxorubicin-induced cardiomyopathy. *American Journal of Veterinary Research*, 66(2): 238-243.

Deepa PR & Varalakshmi P (2003). The cytoprotective role of a low-molecular-weight heparin fragment studied in an experimental model of glomerulotoxicity. *European Journal of Pharmacology*, 478: 199-205.

Delgado RM *et al.* (2004). Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment improves left ventricular function and mortality in a murine model of doxorubicin-induced heart failure. *Circulation*, 109(11): 1428-1433.

Dudnakova TV, Lakomkin VL, Tsyplenkova VG, Shekhonin BV, Shirinsky VP & Kapelko VI (2003). Alterations in myocardial cytoskeletal and regulatory protein expression following a single doxorubicin injection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 41: 788-794.

Dziegel P, Murawska-Cialowicz E, Jethon Z, Januszewska L, Podhorska-Okolow M, Surowiak P, Zawadzki M, Rabczynski J & Zabel M (2003). Melatonin stimulates the activity of protective antioxidative enzymes in myocardial cells of rats in the course of doxorubicin intoxication. *Journal of Pineal Research*, 35: 183-187.

Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O & Koller E (1987). Antioxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *Journal of Lipid Research*, 28: 495-509.

Faine LA, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ebaid GMX, Diniz YS, Fernandes AAH & Novelli ELB (2006). Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57: 221-226.

Ferreira ALA, Yeum KJ, Liu C, Smith D, Krinsky NJ, Eang XD & Russel RM (2000). Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. *Journal of Nutrition*, 130: 1256-1260.

Ferreira ALA, Rocha NS, Tang GW, Yeum KJ, Qin J, Russel RM, Krinsky NI, Matsubara LS & Matsubara BB (2002). Effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity in rats. *FASEB Journal*, 16: (4) A628.

Ferreira ALA, Ladeira MSP, Salvadori DMF, Yeum KJ, Tang G, Russel RM, Krinsky NI, Matsubara LS & Matsubara BB (2004). Effect of lycopene on myocardial dysfunction and on DNA damage induced by adriamycin in rats. *FASEB Journal*, 18(4): A534.

^aFerreira ALA, Russell RM, Rocha NS, Ladeira MSP, Salvadori DMF, Nascimento MCMO, Matsui M, Carvalho FA, Tang G, Matsubara LS, Matsubara BB (2007). Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: An echocardiographic, histological, and morphometrical assessment. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology Journal*, 101: 16-24.

^bFerreira ALA, Salvadori DMF, Nascimento MCMO, Rocha NS, Correa CR, Pereira EJ, Matsubara LS, Matsubara BB, Ladeira MSP (2007). Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutation Research*, 631 (1): 26-35.

^cFerreira ALA, Yeum KJ, Matsubara LS, Matsubara BB, Correa CR, Pereira EJ, Russell RM, Krinsky NI & Tang, G (2007). Doxorubicin as an antioxidant: maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. *Free Radical Biology & Medicine*, 43: 740-751.

Fuhrman B *et al.* (2000). Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid or garlic. *Antioxidant and Redox Signaling*, 2: 491-506.

Giakoustidis D *et al.* (2002). Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia-reperfusion injury. *World Journal of Surgery*, 26(7): 872-877.

Görgün M, Erdogan D, Abban G, Türközkın N & Elberg S (1999). Effect of vitamin E on adriamycin-induced nephrotoxicity at the ultrastructural level in guinea pigs. *Nephron*, 82: 155-163.

Ha JW *et al.* (2005). Serial assessment of myocardial properties using cyclic variation of integrated backscatter in an adriamycin-induced cardiomyopathy rat model. *Yonsei Medical Journal*, 46(1): 73-77.

Halliwell B & Gutteridge JMC (1999). Antioxidant protection by low-molecular mass agents: Compounds derived from the diet. In: Halliwell B & Gutteridge JMC (Editors) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, Oxford University Press, Inc, New York, 208-219.

Herman EH & Ferrans VJ (1983). Influence of vitamin E and ICRF-187 on chronic doxorubicin cardiotoxicity in miniature swine. *Laboratory Investigation*, 49(1): 69-77.

Hiroe M, Ohta Y & Fujita N (1992). Myocardial uptake of ¹²⁵I in monoclonal antimyosin Fab in detecting doxorubicin cardiotoxicity in rats. Morphological and hemodynamic findings. *Circulation*, 86: 1965-1972.

Iliskovic N, Hill M, Chow DA & Singal PK (1995). Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*, 91: 10-15.

Iliskovic N & Singal PK (1997). Lipid lowering: an important factor in preventing adriamycin-induced heart failure. *American Journal of Pathology*, 150: 727-734.

Iliskovic N, Li T, Khaper N, Palace V & Singal PK (1998). Modulation of adriamycin-induced changes in serum free fatty acids, albumin and cardiac oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 188: 161-166.

Iliskovic N, Hasinoff BB, Malisza KL, Li T, Danelisen I & Singal PK (1999). Mechanisms of beneficial effects of probucol in adriamycin cardiomyopathy. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 196: 43-49.

Kalender S, Kalender Y, Ates A, Yel M, Olcay E & Candan S (2002). Protective role of antioxidant vitamin E and catechin on idarubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 1379-1387.

Kapelko VI, Tsyplenkova VG, Khatkevich AN, & Beskrovnova (1999). Morphological and functional estimation of acute and protracted cardiomyocyte alterations caused by doxorubicin in varied doses. *Experimental Clinics of Cardiology*, 1:35-42.

Kaplan LA, Lau JM & Stein EA (1990). Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clinical & Physiological Biochemistry*, 8: 1-10.

Karimi G, Ramezani M & Abdi A (2005). Protective effects of lycopene and tomato extract against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Phytotherapy Research*, 19: 912-914.

Katona M *et al.* (2004). Selective sensory denervation by capsaicin aggravates adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 370(6): 436-443.

Keaney JF *et al.* (1994). Low-dose alpha-tocopherol improves and high-dose alpha-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Clinical Investigation*, 93(2): 844-851.

Koh ET, & Takahashi H (2004). Troponin-T and brain natriuretic peptide as predictors for adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. *Circulation Journal*, 68(2): 163-167.

Krinski NI, Cornewell DG & Oncley JL (1958). The transport of vitamin A and carotenoids in human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 73: 233-246.

Lefrak EA *et al.* (1975). Adriamycin (NSC-123127) cardiomyopathy. *Cancer Chemotherapy Reports*, 3(6): 206-208.

Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS & ALI MK (1982). Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Annals of New York Academy of Sciences*, 393: 411-418.

Li T & Singal PK (2000). Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol. *Circulation*, 24: 2105-2110.

Limpens J, van Weerden WM, Krämer K, Pallapies D, Obermüller-Jevic UC and Schöder FH (2004). Prostate carcinogenesis in n-methyl-n-nitrosourea (nmu)-testosterone treated rats fed tomato powder, lycopene or energy-restricted diets. *Journal of National Cancer Institute*, 96(7): 554.

Lipshultz SE, Lipsitz SR, Mone SM, Goorin AM, Sallan SE, Sanders SP, Orav EJ, Gelber RD, & Colan SD (1995). Female sex and drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer. *New England Journal of Medicine*, 332, 1738-43.

Lu Y, Etoh H, Watanabe N, Ina K, Ukai N, Oshima S, Ojima F, Sakamoto H & Ishiguro Y (1995). A new carotenoid, hydrogen peroxide oxidation products from lycopene. *Bioscience & Biotechnological Biochemistry*, 59: 2153-2155.

Luo X, Evrovsky Y, Cole D, Trines J, Benson LN & Lehotay DC (1997). Doxorubicin-induced acute changes in cytotoxic aldehydes, antioxidant status and cardiac function in the rat. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1360: 45-52.

Luo X, Reichetzer B, Trines J, Benson LN & Lehotay DC (1999). L-carnitine attenuates doxorubicin-induced lipid peroxidation in rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 1158-1165.

MacCarthy PA & Shah AM (2003). Oxidative stress and heart failure. *Coronary Artery Disease*, 14(2): 109-113.

Marchandise B, Schroeder E, Bosly A, Doyen C, Weynants P, Kremer R & Pouleur H (1989). Early detection of doxorubicin cardiotoxicity: interest of Doppler echocardiographic analysis of left ventricular filling dynamics. *American Heart Journal* **118**, 92-8.

Massone F (1994). Neuroleptoanalgesia e anestesia dissociativa In: Massone, F (editor). *Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas*. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 94-96.

Matsui H *et al.* (1999). Protective effects of carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Life Sciences*, 65(12): 1265-1274.

Milei J, Boveris A, Llesuy S, Molina HA, Storino R, Ortega D & Milei SE (1986). Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *American Heart Journal*, 111(1): 95-102.

Minotti G *et al.* (1996). Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin. Pharmacological and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Clinical Investigation*, 98: 650-661.

Morishima I, Matsui H, Mukawa H, Hayashi YT, Okumura K, Ito T & Hayakawa T (1998). Melatonin, a pineal hormone with antioxidant property, protects against adriamycin cardiomyopathy in rats. *Life Sciences*, 63: 511-521.

Myers CE, McGuire W & Young R (1976). Adriamycin: amelioration of toxicity by α -tocopherol. *Cancer Treatment Reports*, 60: 961-962.

Neely JR & Morgan HE (1974). Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu Rev of Physiology*, 36: 413-459.

Okoshi K, Matsubara LS, Okoshi MP, Cicogna AC, Fioretto JR, Padovani CR, Aragon FF, Matsubara BB (2002). Food restriction-induced myocardial dysfunction demonstrated by the combination of *in vivo* and *in vitro* studies. *Nutrition Research*, 22: 1363-1364.

Olson RD & Mushlin PS (1990). Doxorubicin cardiotoxicity: analysis of prevailing hypotheses. *The FASEB Journal*, 4: 3076-3086.

Otani H, Mune M, Yukawa S, Smith D, Meydani M & Blumberg J (1999). Vitamin E treatment of experimental glomerular disease in rats. *Kidney International*, 56(S71): S66-S69.

Paiva MG, Petrilli AS, Moises VA, Macedo CR, Tanaka C & Campos O (2005). Cardioprotective effect of dexrazoxane during treatment with doxorubicin: a study using low-dose dobutamine stress echocardiography. *Pediatr Blood Cancer* 45, 902-8.

Paiva SA, Novo R, Matsubara BB, Matsubara LS, Azevedo PS & Minicucci MF (2005). Beta-carotene attenuates the paradoxical effect of tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. *Journal of Nutrition*, 135: 2109-2113.

Pascoe GA & Reed DJ (1987). Vitamin E protection against chemical-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 256(1): 159-166.

Pastori M, Pfander H, Boscoboinik D & Azzi A (1998). Lycopene in association with alpha-tocopherol inhibits at physiological concentrations proliferation of prostate carcinoma cells. *Biocemistry and Biophysical Research Comm*, 250(3): 582-585.

Petty MA, Grisar JM & Jong WD (1992). Protective effects of an a-tocoferol analogue against myocardial reperfusion injury in rats. *European Journal of Pharmacology*, 210: 85-90.

Polidori MC, Savino K, Alunni G, Freddio M, Senin U, Sies H, Stahl W & Mecocci P (2002). Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. *Free Radic Biol Med* 32, 148-52.

Pyke DD & Chan AC (1990). Effects of vitamin E on prostacyclin release and lipid composition of the ischemic rat heart. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277(2): 429-433.

Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J & Ramírez-Tortosa MC (2002). Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, 180: 79-95.

Richelle M, Bortlik K, Liardet S, Hager C, Lambelet P, Baur M, Applegate LA & Offord EA (2002). A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. *Journal of Nutrition*, 132: 404-408.

Sahn DJ *et al.* (1978). The Committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography. Recommendations regarding

quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*, 58: 1072-1083.

Sawyer DB, Fukazawa R, Arstall MA & Kelly RA (1999). Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circulation*, 19: 257-265.

Schulte I *et al.* (2006). Vitamin E in heart transplantation: effects on cardiac gene expression. *Transplantation*, 81(5): 736-745.

Shan K, Lincoff AM & Young JB (1996). Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Annals of Internal Medicine*, 125: 47-58.

Shi J, Kakuda Y & Yeung D (2004). Antioxidative properties of Lycopene and other carotenoids from tomatoes: synergistic effects. *Biofactors*, 21 (1-4): 203-210.

Silva CEV (2001). Estudo clínico da cardiotoxicidade induzida pelo tratamento crônico com doxorubicina (Adriblastina®) em cães. Master Thesis, Departamento de Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brazil.

Singal PK, Deally CM & Weinberg LE (1987). Subcellular effects of adriamycin in the heart: a concise review. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 19: 817-828.

Singal PK & Iliskovic N (1998). Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, 339: 900-905.

Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I & Iliskovic N (2000). Adryamicin-Induced herat failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 207: 77-85.

Sonneveld P (1978).Effect of alpha-tocopherol on the cardiotoxicity of adriamycin in the rat. *Cancer Treatment Reports*, 62(7): 1033-1035.

Sung RY, Huang GY, Shing MK, Oppenheimer SJ, Li CK, Lau J & Yuen MP (1997). Echocardiographic evaluation of cardiac function in pediatric oncology patients treated with or without anthracycline. *International Journal of Cardiology* 60: 239-48.

Tallarico D, Rizzo V, Di Maio F, Petretto F, Bianco G, Placanica G, Marziali M, Paravati V, Gueli N, Meloni F & Campbell SV (2003). Myocardial cytoprotection by trimetazidine against anthracycline-induced cardiotoxicity in anticancer chemotherapy. *Angiology, The Journal of Vascular Diseases*, 54: 219-27.

Thabrew MI, Samarawickrema N, Chandrasena LG & Jayasekera S (1999). Effect of oral supplementation with vitamin E on the oxiredutive status of red-blood-cells in normal mice and mice subject to oxidative stress by chronic administration of adriamycin. *Annals of Clinical Biochemistry*, 36: 216-220.

Tokudome T, Mizushige K, Noma T, Manabe K, Murakami K, Tsuji T, Nozaki S, Tomohiro A & Matsuo H (2000). Prevention of doxorubicin (adriamycin)-induced cardiomyopathy by simultaneous administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor assessed by acoustic densitometry. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 36: 361-368.

Van Boxtel CJ *et al.* (1978). Doxorubicin: inotropic effects and inhibitory action on ouabain. *Journal of Pharmacological and Experimental Therapy*, 207(2): 277-283.

Van Vleet JF & Ferrans VJ (1980). Evaluation of vitamin E and selenium protection against chronic adriamycin toxicity in rabbits. *Cancer Treatment Reports*, 64 (2-3): 315-317.

Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE (1980). Cardiac disease induced by chronic DOX administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *American Journal of Pathology*, 99(1): 13-25.

Versari D *et al.* (2006). Chronic antioxidant supplementation impairs coronary endothelial function and myocardial perfusion in normal pigs. *Hypertension*, 47: 475-481.

Wahab MHA, Akoul EEMS & Abdelaziz AH (2000). Modulatory effects of melatonin and vitamin E on Doxorubicin-induced cardiotoxicity in ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Tumori*, 86: 157-162.

Wang S *et al.* (2002). Immunomodulatory effects of high-dose alpha-tocopherol acetate on mice subjected to sidestream cigarette smoke. *Toxicology*, 175(1-3): 235-245.

Washio M, Nanishi F, Okuda S, Onoyama K & Fujishima M (1994). Alpha-tocopherol improves focal glomerulosclerosis in rats with adriamycin-induced progressive renal failure. *Nephron*, 68: 347-352.

Yagmurca M *et al.* (2003). Erdosteine prevents doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacological Research*, 48: 377-382.

Yang NYJ & Desai ID (1977). Effect of High Levels of Dietary Vitamin E on Hematological Indices and Biochemical Parameters in Rats *Journal of Nutrition*, 107: 1410-1417.

Yeum K-J *et al.* (1995). Similar metabolites formed from β -carotene by either human gastric mucosal homogenates, lipoxygenase or linoleic acid hydroperoxide. *Arch Biochem Biophys*, 321(1): 167-174.

Yeum KJ, Ferreira ALA, Smith D, Krinsky NI & Russel RM (2000). The effect of α -tocopherol on the oxidative cleavage of β -carotene. *Free Radical Biology & Medicine*, 29 (2): 105-114.

Yilmaz, S. *et al.* (2006).Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity. *Toxicology*, 218: 164-171.

Yoon H, Hong YM & Bennett MJ (2003). Effect of L-carnitine supplementation on cardiac carnitine palmitoyltransferase activities and plasma carnitine concentrations in adriamycin-treated rats. *Pediatric Research*, 53: 788-792.

Young RC, Ozols RF & Myers CE (1981). The anthracycline antineoplastic drugs. *The New England Journal Medicine*, 305: 139-153.

Zar JH (1999). Biostatistical analysis, 4th ed. Prentice-Hall, New Jersey, p663.

Figuras e Tabelas

Figura 2. Evolução do Peso corpóreo

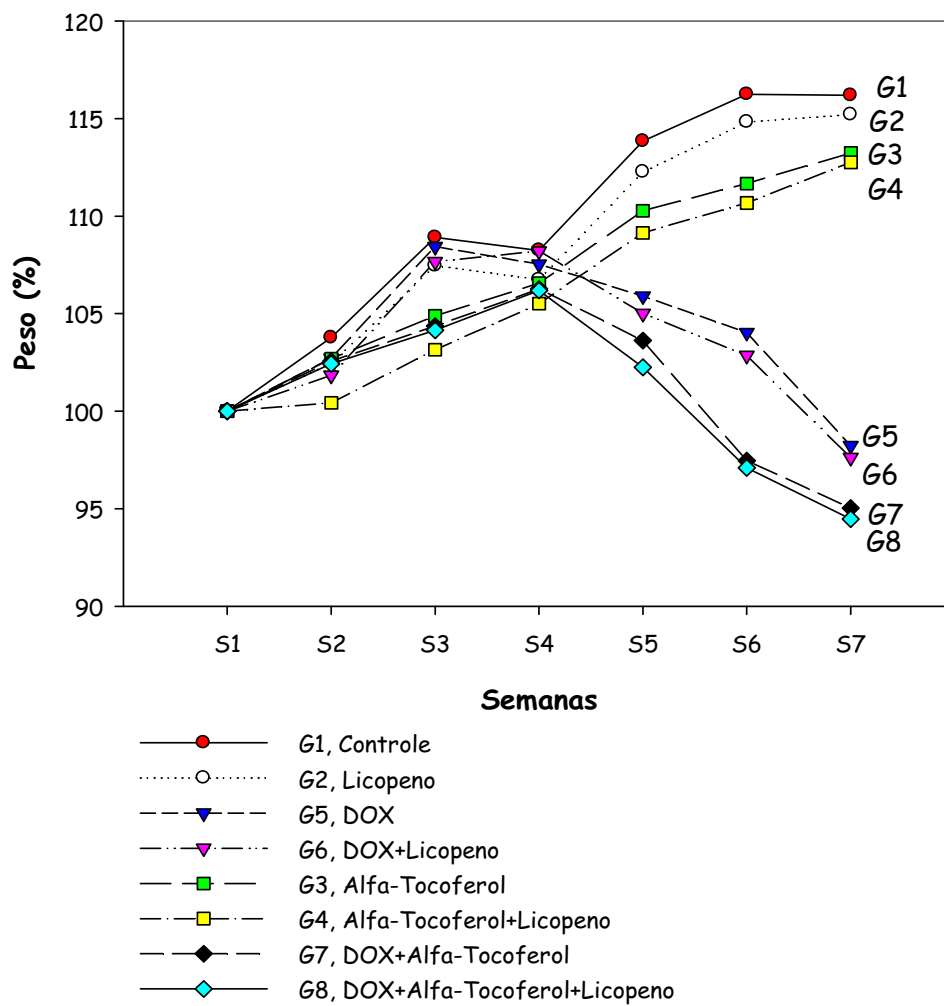


Tabela 2. Efeito do tratamento com DOX sobre os níveis totais de licopeno e α -tocoferol presentes no tecido cardíaco de ratos, obtidos por HPLC.¹

Níveis de licopeno no tecido cardíaco (nmol/kg de tecido)			
G1	G2	G3	G4
0,00 (0,00) A	64,93 (32,28) B	0,00 (0,00) A	0,00 (0,00) A
G5	G6	G7	G8
0,00 (0,00) A	86,23 (125,10) B	0,00 (0,00) A	0,00 (0,00) A

Níveis de α -tocoferol no tecido cardíaco (mmol/kg de tecido)			
G1	G2	G3	G4
52,09 (17,62) A	62,03 (17,96) A	109,91 (18,43) B	114,86 (25,52) B
G5	G6	G7	G8
52,33 (19,66) A	49,86 (15,58) A	108,60 (34,49) B	106,64 (37,21) B

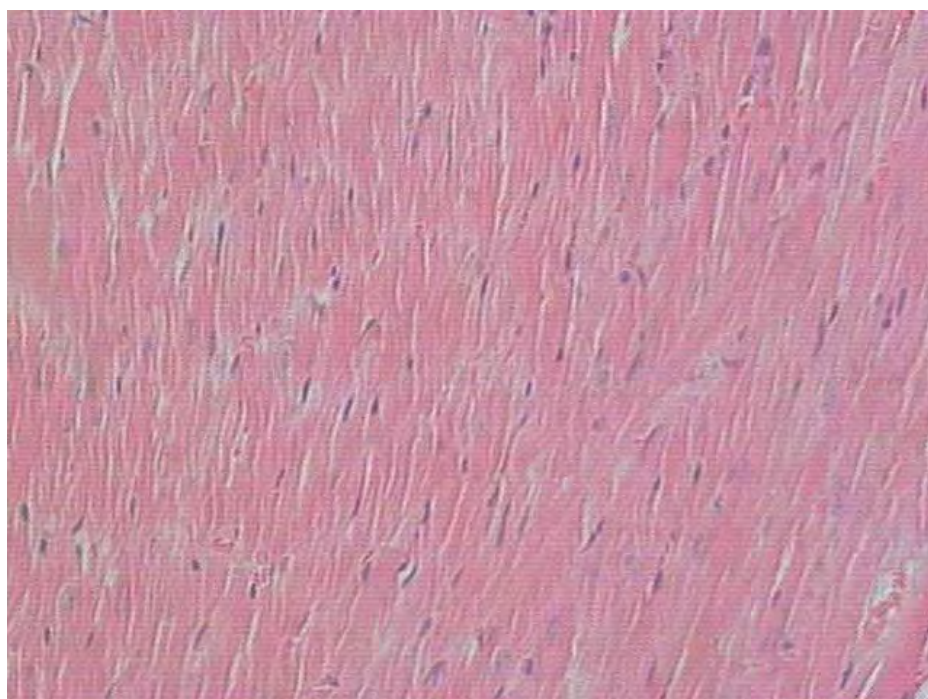
¹Os valores são apresentados em mediana e semi-amplitude total. As diferenças estatísticas entre os grupos são apontadas por presença de letras diferentes. Letras maiúsculas comparam grupos de uma mesma linha. A ausência de letras minúsculas indica que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de mesma coluna. G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorubicina; G6, doxorubicina + licopeno; G7, doxorubicina + α -tocoferol; G8, doxorubicina+ α -tocoferol+licopeno.

Tabela 3. Efeito da suplementação com licopeno, α -tocoferol e licopeno + α -tocoferol nas alterações histológicas miocárdicas induzidas por DOX em ratos.¹

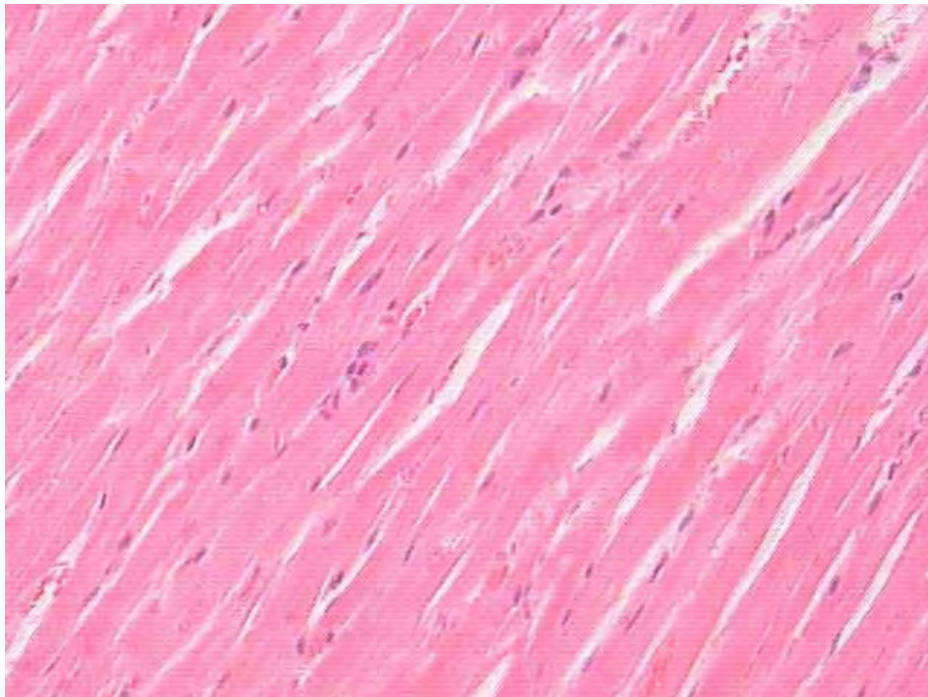
Vacuolização Citoplasmática			
G1	G2	G3	G4
0,00 (0,50) AB	0,00 (0,00) A	2,00 (0,50) C	1,00 (0,50) BC
G5	G6	G7	G8
1,00 (1,00)	1,00 (1,00)	2,00 (1,00)	1,00 (0,50)
Necrose Nuclear (NN)			
G1	G2	G3	G4
0,00 (0,00) aA	0,00 (0,00) A	1,00 (0,50) B	1,50 (0,50) B
G5	G6	G7	G8
2,00 (1,00) b	1,00 (1,00)	2,00 (0,50)	2,00 (0,50)
Degeneração Miocítica (DM)			
G1	G2	G3	G4
0,00 (0,00) aA	0,00 (0,00) A	2,00 (1,00) B	2,00 (0,50) B
G5	G6	G7	G8
2,00 (1,00) b	1,00 (1,50)	2,50 (0,50)	2,00 (0,50)
Desorganização Celular (DC)			
G1	G2	G3	G4
0,00 (0,00) aA	0,00 (0,00) A	1,00 (0,50) B	1,50 (0,50) B
G5	G6	G7	G8
2,50 (1,00) b	1,00 (0,50)	2,00 (0,50)	3,00 (1,00)

¹Os valores são apresentados em mediana e semi-amplitude total. As diferenças estatísticas entre os grupos são apontadas por presença de letras diferentes. Letras minúsculas comparam grupos de mesma coluna e letras maiúsculas comparam grupos de uma mesma linha. G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorrubicina; G6, doxorrubicina + licopeno; G7, doxorrubicina + α -tocoferol; G8, doxorrubicina+ α -tocoferol+licopeno.

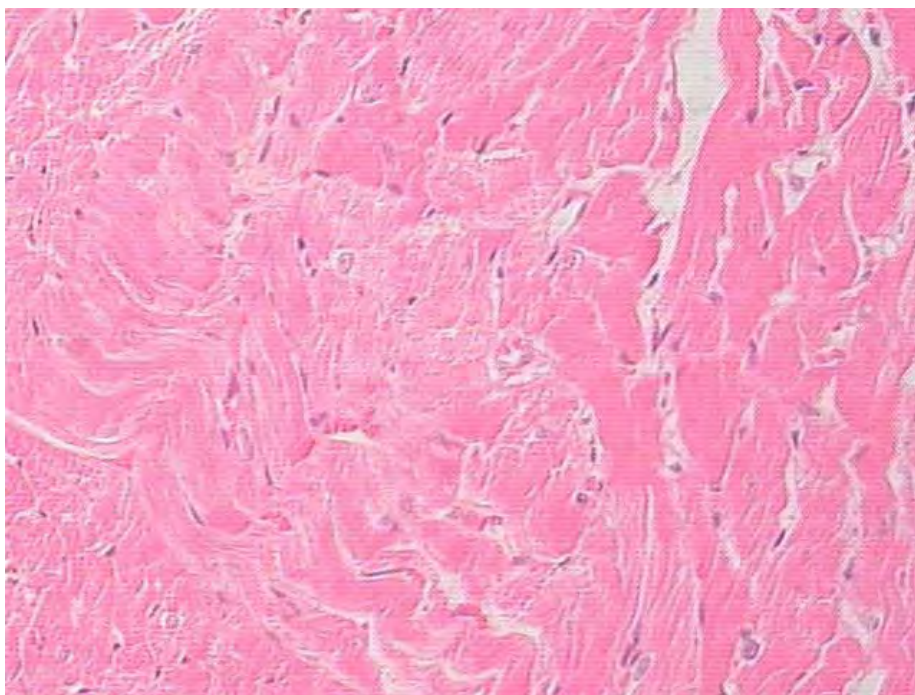
Figura 3 - Efeito da suplementação com licopeno, α -tocoferol e licopeno + α -tocoferol nas alterações histológicas miocárdicas induzidas por DOX em ratos. Não foram encontradas anormalidades histológicas no grupo controle (G1) a não ser pela presença de vacúolos citoplasmáticos. Os ratos suplementados com licopeno (G2) apresentaram padrão histológico semelhante ao grupo G1. Já os grupos suplementados com α -tocoferol (G3) e com licopeno + α -tocoferol (G4) evidenciaram alterações como necrose nuclear, degeneração miocítica, desorganização celular e vacuolização citoplasmática (Painéis 3C e 3D). O tratamento com DOX (G5) foi seguido por marcante desorganização da morfologia miofibrilar, vacuolização de miócitos, edema intersticial, necrose nuclear e degeneração celular (Painel 3E). O tratamento com ambos os suplementos não preveniu o aparecimento das lesões induzidas pela DOX (G6, G7 e G8) (Painéis 3F a 3H) (coloração HE, amplificação 400 x).



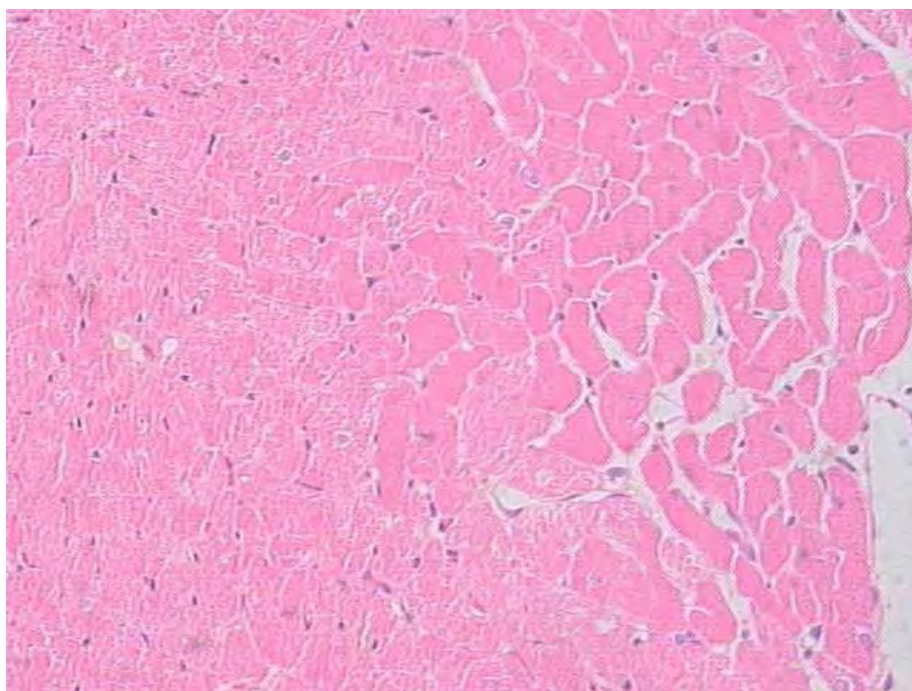
3A - Cardiomiócito normal de animal do grupo controle (G1).



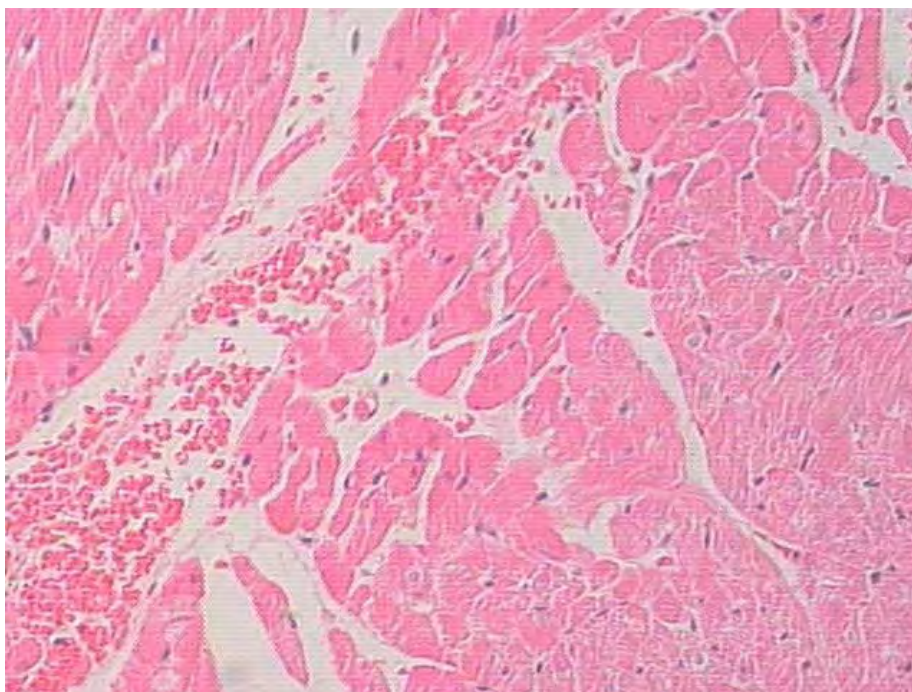
3B - Aspecto morfológico normal de miocárdio de rato do grupo suplementado com licopeno (G2).



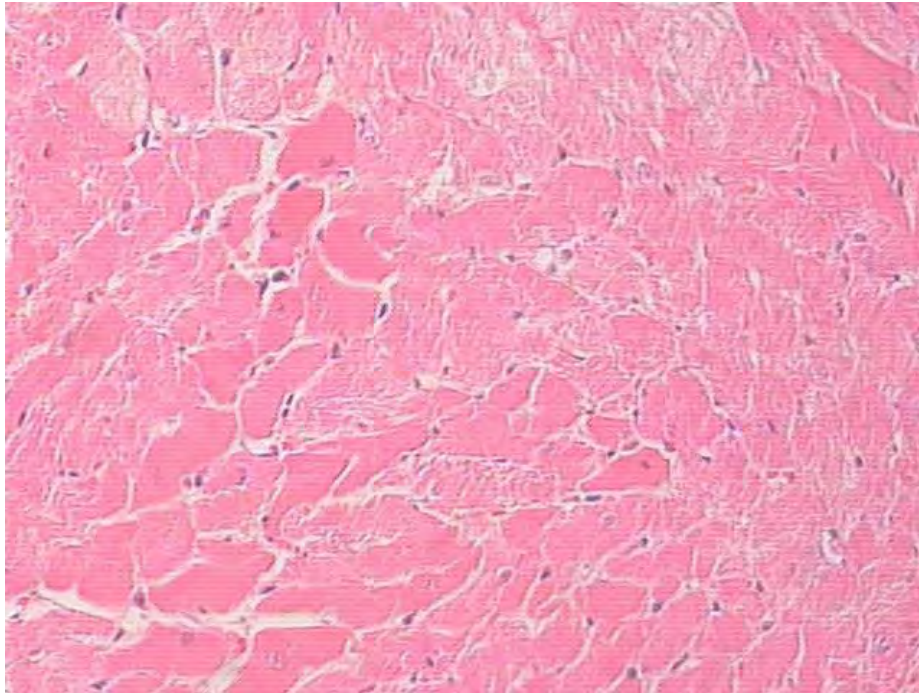
3C - Degeneração miocítica e desorganização celular em miocárdio de rato do grupo G3. Aspecto semelhante foi observado em animais dos grupos G5 a G8 (tratados com DOX).



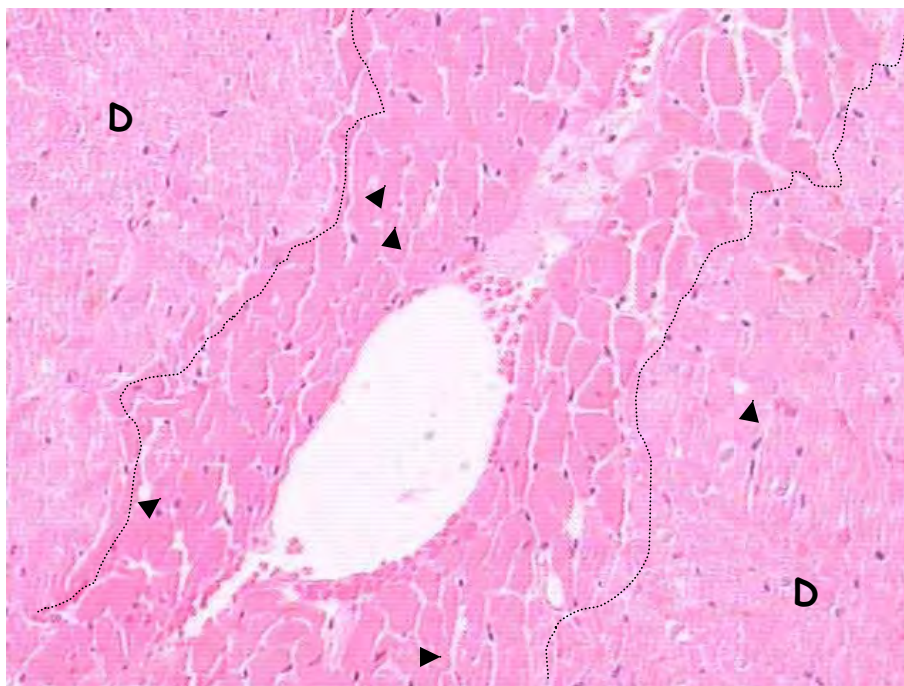
3D- Áreas de degeneração miocítica, vacuolização citoplasmática e edema intersticial de miocárdio de rato suplementado com a associação de licopeno e α -tocoferol (G4).



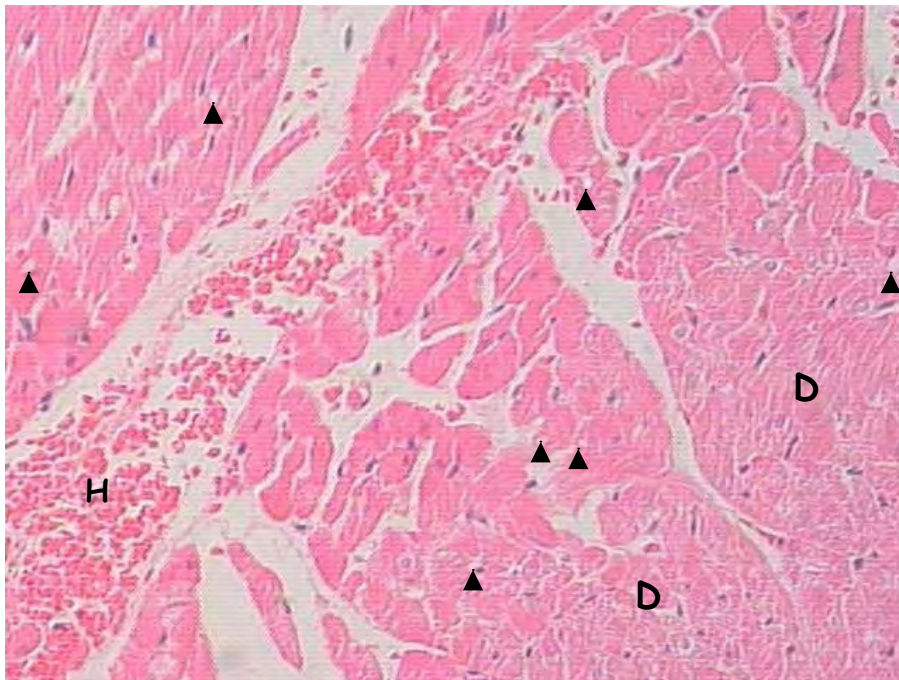
3E - Áreas de degeneração miocítica, vacuolização citoplasmática e desorganização celular em rato do grupo DOX (G5).



3F - Áreas de degeneração miocítica, vacuolização citoplasmática e desorganização celular em rato suplementado com licopeno e tratado com DOX (G6).



3G - Ampla área de degeneração miocítica (D), vacuolização citoplasmática (setas pequenas) e desorganização celular em rato suplementado com α -tocoferol e tratado com DOX (G7).



3H - Área de degeneração miocítica (D), vacuolização citoplasmática (setas pequenas), desorganização celular e extensa área de hemorragia (H), em rato suplementado com licopeno e α -tocoferol e tratado com DOX (G8).

Tabela 4. Efeito da suplementação de licopeno, α -tocoferol e licopeno + α -tocoferol sobre os níveis séricos de colesterol total e LDL colesterol em ratos tratados com DOX.¹

Colesterol total (mg/dL)			
G1	G2	G3	G4
54,50 (14,00) a	45,00 (10,00) a	45,50 (9,00) a	56,00 (16,00) a
G5	G6	G7	G8
315,00 (165,00) b	260,00 (189,50) b	193,00 (138,00) b	224,00 (96,50) b
LDL colesterol (mg/dL)			
G1	G2	G3	G4
11,50 (4,00) aAB	9,00 (6,00) aA	11,50 (10,50) aAB	27,00 (6,00) B
G5	G6	G7	G8
88,50 (48,00) b	49,00 (45,50) b	63,50 (30,00) b	75,00 (70,50)

¹Os valores são apresentados em mediana e semi-amplitude total. As diferenças estatísticas entre os grupos são apontadas por presença de letras diferentes. Letras maiúsculas comparam grupos de uma mesma linha e letras minúsculas comparam grupos de uma mesma coluna. G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorubicina; G6, doxorubicina + licopeno; G7, doxorubicina + α -tocoferol; G8, doxorubicina+ α -tocoferol+licopeno.

Tabela 5 - Avaliação morfométrica por ecocardiograma dos corações dos ratos após suplementação com licopeno e α -tocoferol. ^{1,2}

Grupo	AE (mm)	VEd (mm)	VEs (mm)	PP (mm)	PP/VEd ratio	Ao (mm)	AE/Ao ratio
G1 n=11	3,5 $\pm$ 0,4	7,37 $\pm$ 0,62	3,43 $\pm$ 0,43	1,64 $\pm$ 0,26	0,23 $\pm$ 0,05	3,8 $\pm$ 0,2	0,93 $\pm$ 0,10
G2 n=11	3,5 $\pm$ 0,3	7,51 $\pm$ 0,62	3,8 $\pm$ 0,57	1,47 $\pm$ 0,13	0,20 $\pm$ 0,02	3,6 $\pm$ 0,2	0,98 $\pm$ 0,12
G3 n=11	3,5 $\pm$ 0,5	7,22 $\pm$ 0,41	3,78 $\pm$ 0,41	1,42 $\pm$ 0,14	0,20 $\pm$ 0,03	3,4 $\pm$ 0,4	1,05 $\pm$ 0,13
G4 n=10	3,9 $\pm$ 0,7	7,83 $\pm$ 0,34	4,16 $\pm$ 0,49	1,29 $\pm$ 0,14	0,16 $\pm$ 0,02	3,6 $\pm$ 0,3	1,09 $\pm$ 0,12
G5 n=11	3,6 $\pm$ 0,5	7,45 $\pm$ 0,43	4,05 $\pm$ 0,45	1,35 $\pm$ 0,19	0,18 $\pm$ 0,02	3,3 $\pm$ 0,4	1,09 $\pm$ 0,18
G6 n=11	3,5 $\pm$ 0,5	7,35 $\pm$ 0,46	3,99 $\pm$ 0,52	1,32 $\pm$ 0,16	0,18 $\pm$ 0,02	3,4 $\pm$ 0,2	1,02 $\pm$ 0,11
G7 n=11	4,0 $\pm$ 0,7	8,05 $\pm$ 0,74	4,66 $\pm$ 0,58	1,25 $\pm$ 0,16	0,16 $\pm$ 0,03	3,5 $\pm$ 0,3	1,14 $\pm$ 0,26
G8 n=11	3,8 $\pm$ 0,5	7,23 $\pm$ 0,57	3,84 $\pm$ 0,51	1,22 $\pm$ 0,17	0,17 $\pm$ 0,03	3,7 $\pm$ 0,4	1,02 $\pm$ 0,15

¹ dados correspondem a média $\pm$ desvio padrão; n, número de animais analisados; G, grupo; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorrubicina; G6, doxorrubicina + licopeno; G7, doxorrubicina + α -tocoferol; G8, doxorrubicina+ α -tocoferol+licopeno.

² AE = diâmetro sistólico antero-posterior do átrio esquerdo, durante a sístole ventricular; AEc = diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso do animal; VEd = diâmetro diastólico do VE; VEs = diâmetro sistólico do VE; PP = espessura da parede posterior do VE, durante a diástole; PP/VEd = espessura relativa da parede do VE; Ao = diâmetro da aorta AE/Ao = diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta.

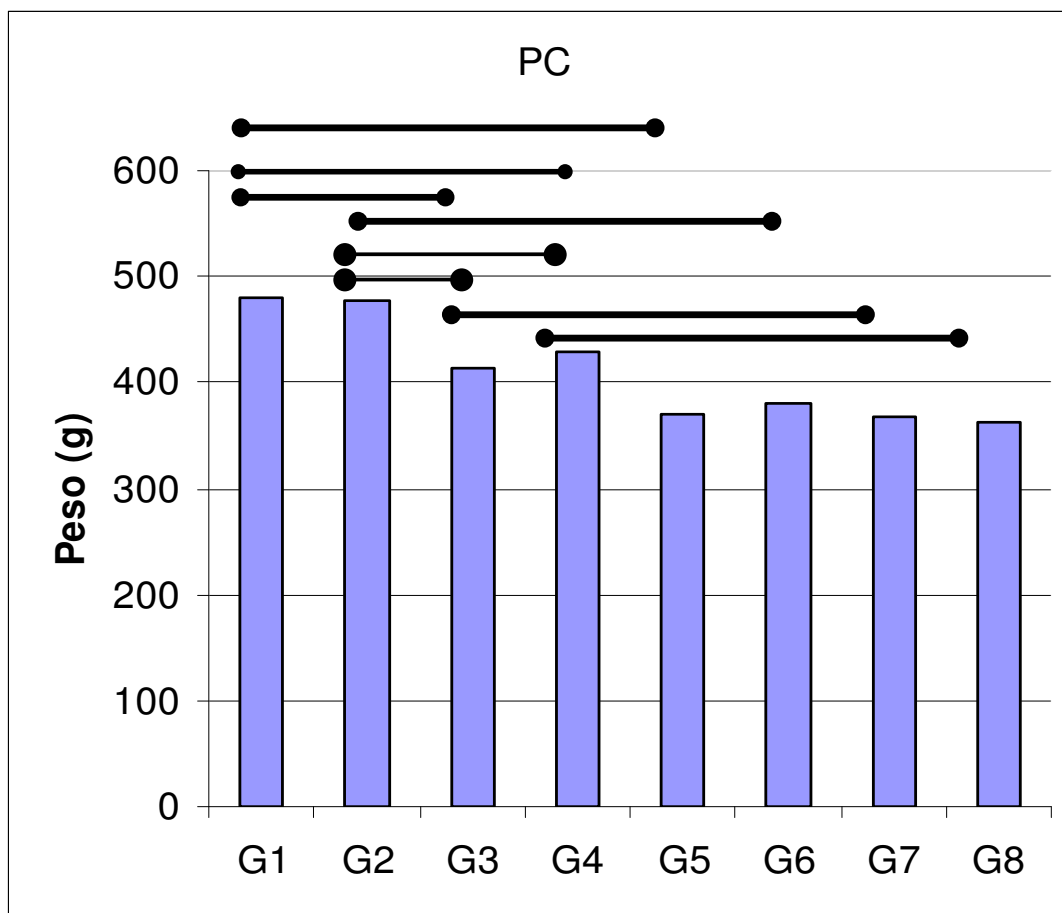
Tabela 6. Avaliação funcional por ecocardiograma dos corações dos ratos após suplementação com licopeno e α -tocoferol ^{1,2}

Grupo	A (cm/seg)	E (cm/seg)	E/A ratio	Δd (%)	FE (%)	VAo (cm/seg)	FC (bpm)
G1 n=11	57,3 $\pm$ 14,3	75,1 $\pm$ 7,9	1,4 $\pm$ 0,3	53,6 $\pm$ 2,67	89,9 $\pm$ 1,85	90,45 $\pm$ 7,01	331 $\pm$ 36
G2 n=11	47,3 $\pm$ 7,87	68,4 $\pm$ 8,0	1,5 $\pm$ 0,20	49,5 $\pm$ 5,23	86,8 $\pm$ 3,79	85,84 $\pm$ 12,56	314 $\pm$ 32
G3 n=11	50,1 $\pm$ 13,8	64,6 $\pm$ 10,2	1,3 $\pm$ 0,3	47,6 $\pm$ 4,47	85,4 $\pm$ 3,92	79,27 $\pm$ 13,73	329 $\pm$ 29
G4 n=10	41,4 $\pm$ 9,33	61,0 $\pm$ 8,7	1,5 $\pm$ 0,5	46,8 $\pm$ 6,21	84,4 $\pm$ 4,93	81,83 $\pm$ 11,49	327 $\pm$ 37
G5 n=11	43,7 $\pm$ 6,45	60,9 $\pm$ 7,9	1,4 $\pm$ 0,2	45,6 $\pm$ 4,86	83,5 $\pm$ 4,24	64,42 $\pm$ 14,17	276 $\pm$ 38
G6 n=11	47,1 $\pm$ 14,3	61,2 $\pm$ 12,0	1,3 $\pm$ 0,2	45,7 $\pm$ 5,4	83,6 $\pm$ 4,29	68,94 $\pm$ 12,37	283 $\pm$ 39
G7 n=11	41,8 $\pm$ 8,34	62,4 $\pm$ 8,6	1,5 $\pm$ 0,3	42,1 $\pm$ 4,75	80,3 $\pm$ 4,96	73,65 $\pm$ 11	264 $\pm$ 34
G8 n=11	45,3 $\pm$ 10,6	62,7 $\pm$ 7,5	1,5 $\pm$ 0,4	47 $\pm$ 4,86	84,7 $\pm$ 4,05	70,43 $\pm$ 10,73	282 $\pm$ 32

¹ dados correspondem a média $\pm$ desvio padrão; n, número de animais analisados; G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorrubicina; G6, doxorrubicina + licopeno; G7, doxorrubicina + α -tocoferol; G8, doxorrubicina+ α -tocoferol+licopeno.

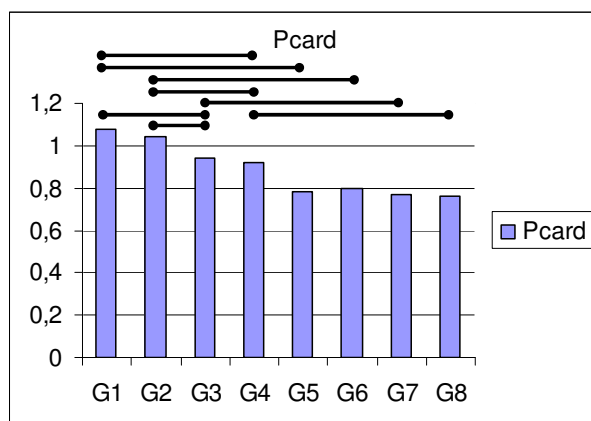
²A= pico máximo de velocidade de fluxo transmitral durante a contração atrial; E= velocidade máxima de enchimento do VE no início da diástole; E/A = razão entre E e A, indica função diastólica do VE durante a diástole; $\% \Delta D$ = porcentagem de variação do diâmetro ventricular ou fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (VE); FE= fração de ejeção do VE; VAo = velocidade do fluxo na aorta; FC = frequência cardíaca.

Figura 4 - Peso Corpóreo dos animais no final do estudo ¹



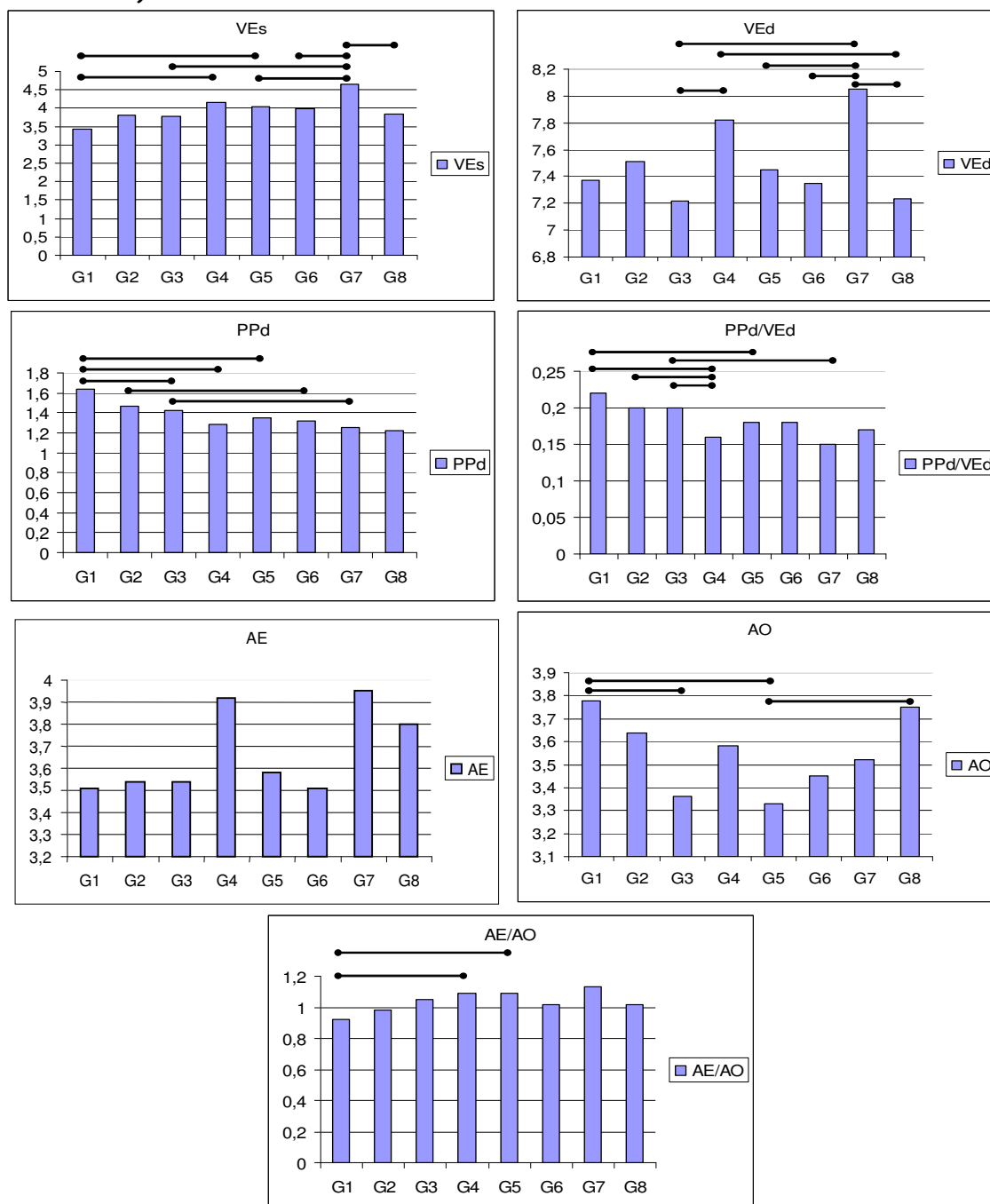
¹ valores correspondem a média de peso corpóreo no fim do experimento; PC, peso corpóreo. A presença da linha no topo da figura corresponde a $p < 0.05$; as extremidades das linhas apontam quais grupos foram comparados entre si. G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorubicina; G6, doxorubicina + licopeno; G7, doxorubicina + α -tocoferol; G8, doxorubicina+ α -tocoferol+licopeno.

Figura 5 - Peso Cardíaco Final e Peso Cardíaco Final Corrigido por Peso Corpóreo Final (Média e Diferença Estatística)¹



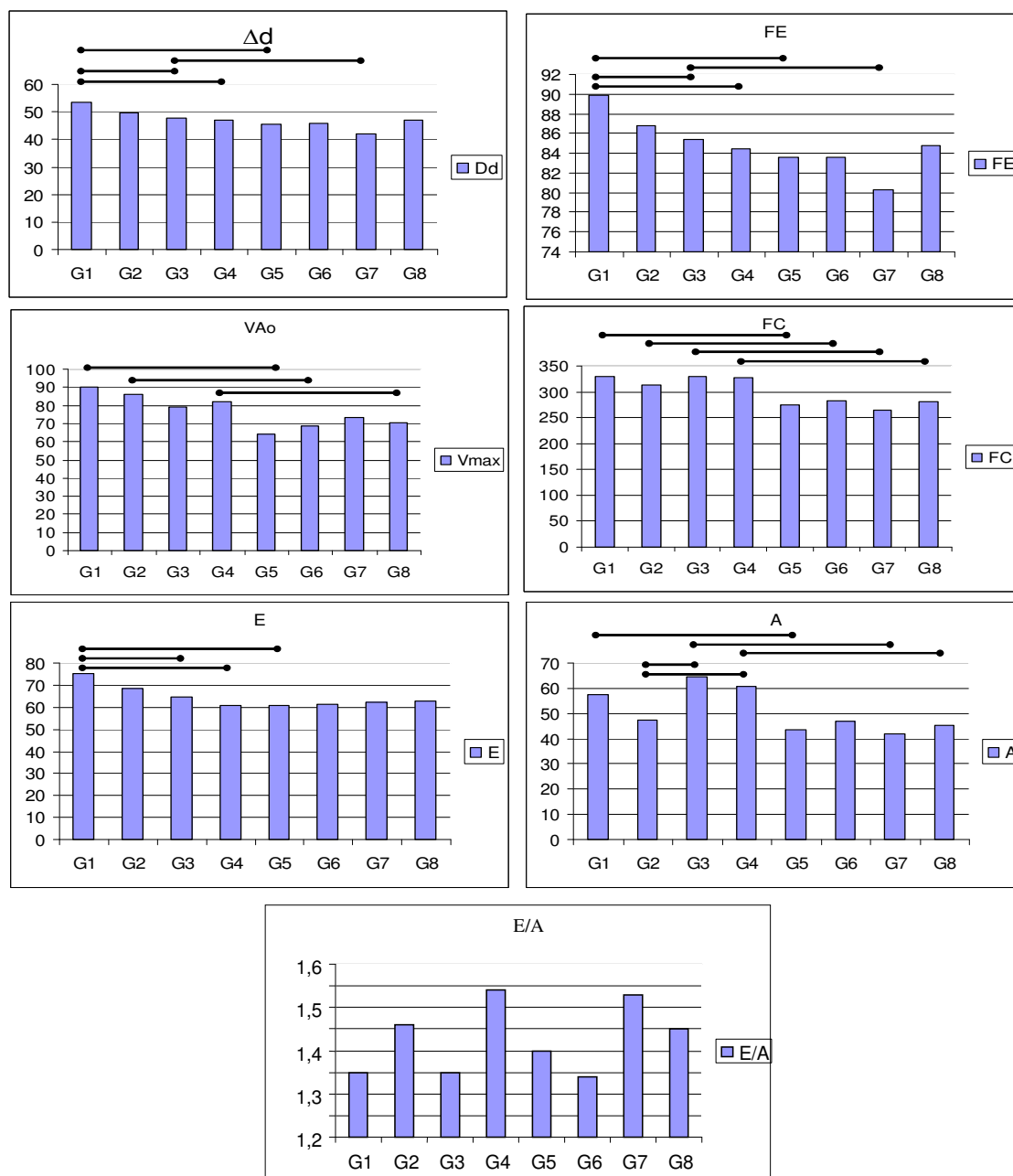
¹ As unidades correspondem a gramas no painel a esquerda. PCard, peso cardíaco; a presença da linha no topo da figura corresponde a $p < 0.05$; as extremidades das linhas apontam quais grupos foram comparados entre si. G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorubicina; G6, doxorubicina + licopeno; G7, doxorubicina + α -tocoferol; G8, doxorubicina + α -tocoferol + licopeno.

Figura 6 - Avaliação Ecocardiográfica Morfológica (Média e Diferença Estatística)¹



¹As unidades das variáveis correspondem a *mm*, com exceção das relações PPd/VEd e AE/AO. A presença da linha no topo da figura corresponde a $p < 0.05$; as extremidades das linhas apontam quais grupos foram comparados entre si. G, grupo; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorrubicina; G6, doxorrubicina + licopeno; G7, doxorrubicina + α -tocoferol; G8, doxorrubicina + α -tocoferol + licopeno. AE = diâmetro sistólico antero-posterior do átrio esquerdo, durante a sístole ventricular; VEd = diâmetro diastólico do VE; VEs = diâmetro sistólico do VE; PP = espessura da parede posterior do VE, durante a diástole; PP/VEd = espessura relativa da parede do VE; AE/Ao = diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta.

Figura 7 - Avaliação Ecocardiográfica Funcional (Média e Diferença Estatística)¹



¹ A figura apresenta as principais variáveis funcionais. As variáveis A, E e VAo são mostradas em cm/s. As variáveis Δd e FE são mostradas em %. A variável FC é mostrada em bpm. As barras ligadas entre si apresentaram diferença estatística ($p < 0.05$). G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, a-tocoferol; G4, licopeno + a-tocoferol; G5, doxorrubicina; G6, doxorrubicina + licopeno; G7, doxorrubicina + a-tocoferol; G8, doxorrubicina + a-tocoferol+licopeno. A= pico máximo de velocidade de fluxo transmitral durante a contração atrial; E= velocidade máxima de enchimento do VE no início da diástole; E/A = razão entre E e A, indica função diastólica do VE durante a diástole; % Δd = porcentagem de variação do diâmetro ventricular ou fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (VE); FE= fração de ejeção do VE; VAo = velocidade do fluxo na aorta; Ao = diâmetro da aorta; FC = frequência cardíaca.

Anexos

Anexo 1. Diluição de Licopeno e checagem por Espectrofotometria

Tem-se Lyc-O-Mato 6%

$$6000 \text{ mg}/100 \text{ mL} = 60 \text{ mg}/1 \text{ mL}$$

Deseja-se que cada mL tenha 2.5 mg de licopeno

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$60 \times 38 = 2.5 \times V2$$

$$V2 = 912 \text{ mL}$$

Portanto, deve-se acrescentar 912 mL de óleo Mazola aos 38 mL que havia do Lyc-O-Mato 6%

Modo de diluir:

- 1) Aquecer 38 mL Lyc-O-Mato 6% no banho-maria à 54° C
- 2) Em separado, aquecer 912 mL de óleo mazola no banho-maria à 54° C
- 3) Misturar itens 1 e 2 ainda quentes em banho-maria à 54° C até a mistura tornar-se homogênea
- 4) Manter a 4° C (geladeira)

Para checar a concentração em espectrofotômetro

Tirou-se frasco da solução (lyco + óleo) da geladeira e aqueceu-se em banho-maria temperatura 54 °C agitando-se manualmente por 20 min.

$$C \text{ (g/dL)} = 1000 \text{ mg}/100 \text{ mL} = 10 \text{ mg/mL} = \frac{\text{Absorbância}_{472 \text{ nm}}}{E \% 1 \text{ cm}}$$

$$E \% 1 \text{ cm lycopene} = 3450$$

Diluiu-se 1000 (10 mL acetona + 10 uL licopeno) vezes para conseguir-se dosar no espectrofotômetro. Acetona foi utilizada como padrão de correção (blank).

$$C = 2.06 / 3450 = 5.971 \times 10^{-7} \times 1000 \text{ (fator de diluição)} \times 10 \text{ (unidade mg/mL)} = 5.971 \text{ mg/mL.}$$

Portanto, nosso cálculo da diluição está aproximadamente correto.

Anexo 2. Diluição de α -tocoferol e checagem por Espectrofotometria

Têm-se α -tocoferol a 102% = 102000 mg/100 mL = 1020mg / 1mL

Deseja-se que cada mL tenha 125 mg

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

$$1020 \times 100 = 125 \times V2$$

$$V1 = 816 \text{ mL}$$

Portanto, deve-se completar até 816 mL de óleo mazola nos 100 mL que tenho da solução a 102% que dispunha.

Modo de diluir:

- 1) Aquecer 100 mL α -tocoferol a 102% no banho-maria à 54° C
- 2) Em separado, aquecer 816 mL de óleo mazola no banho-maria à 54° C
- 3) Misturar itens 1 e 2 ainda quentes em banho-maria à 54° C até a mistura tornar-se homogênea.
- 4) Manter a 4° C (geladeira)

Para checar a concentração espectrofotômetro

Tirou-se frasco da solução (α -tocoferol + óleo) da geladeira e aqueceu-se em banho-maria (54 °C) agitando-se manualmente por 20 min.

$$C \text{ (g/dL} = 1000\text{mg/100mL} = 10\text{mg/mL}) = \frac{\text{Absorbância}_{294\text{mm}}}{E \% 1\text{cm}}$$

$$E\%1\text{cm } \alpha\text{-tocoferol} = 71$$

Diluiu-se 1000 vezes (10 mL acetona + 10 μ L α -tocoferol) para se conseguir dosar no espectrofotômetro. Acetona foi utilizada como padrão de correção (blank).

$$C = 0,889 / 71 = 125 \times 1000 \text{ (fator de diluição)} \times 10 \text{ (unidade mg/mL)} = 125 \text{ mg/mL.}$$

Portanto, nosso cálculo da diluição está correto.

Anexo 3. Análise Histológica da Lesão Cardíaca¹

	Vacuolização citoplasmática	Necrose nuclear	Degeneração Miocítica	Desorganização celular
G1	♦	♦	♦	♦
G2	—	—	—	—
G3	↑	↑	↑	↑
G4	—	↑	↑	↑
G5	—	↑	↑	↑
G6	—	—	—	—
G7	—	—	—	—
G8	—	—	—	—

¹As linhas na lateral esquerda indicam quais grupos foram comparados. As setas indicam aumento da variável em questão. Linha e seta de mesma cor indicam os grupos comparados e resultado da comparação, respectivamente. O traço significa que não houve diferença significativa. G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorubicina; G6, doxorubicina + licopeno; G7, doxorubicina + α -tocoferol; G8, doxorubicina+ α -tocoferol+licopeno.

Anexo 4. Variáveis morfológicas avaliadas pelo ecocardiograma¹

	AE	VEd	VEs	PP	Ao	PP/VEd	AE/Ao
G1	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
G2	—	—	—	—	—	—	—
G3	—	—	—	↓	↓	—	—
G4	—	—	↑	—	—	↓	↑
G5	—	—	↑	↓	↓	↓	↑
G6	—	—	—	—	—	—	—
G7	—	↑ ↑	↑ ↑	—	—	—	—
G8	—	—	—	—	↑	—	—

¹As linhas na lateral esquerda indicam quais grupos foram comparados. As setas indicam aumento ou redução da variável em questão. Linha e seta de mesma cor indicam os grupos comparados e resultado da comparação, respectivamente. O traço significa que não houve diferença significativa.

G, grupo; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorubicina; G6, doxorubicina + licopeno; G7, doxorubicina + α -tocoferol; G8, doxorubicina+ α -tocoferol+licopeno. AE = diâmetro sistólico antero-posterior do átrio esquerdo, durante a sístole ventricular; VEd = diâmetro diastólico do VE; VEs = diâmetro sistólico do VE; PP = espessura da parede posterior do VE, durante a diástole; PP/VEd = espessura relativa da parede do VE; AE/Ao = diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta.

Anexo 5. Variáveis funcionais avaliadas pelo ecocardiograma¹

	E	A	VAo	Δd	FE	FC	E/A
G1	♦	♦	♦	♦	♦	♦	♦
G2	—	—	—	—	—	—	—
G3	↓	—	—	↓	↓	—	—
G4	↓	—	—	↓	↓	—	—
G5	↓	↓	↓	↓	↓	↓	—
G6	—	—	—	—	—	—	—
G7	—	—	—	—	—	—	—
G8	—	—	—	—	—	—	—

¹As linhas na lateral esquerda indicam quais grupos foram comparados. As setas indicam aumento ou redução da variável em questão. Linha e seta de mesma cor indicam os grupos comparados e resultado da comparação, respectivamente. O traço significa que não houve diferença significativa. G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorubicina; G6, doxorubicina + licopeno; G7, doxorubicina + α -tocoferol; G8, doxorubicina+ α -tocoferol+licopeno. A= pico máximo de velocidade de fluxo transmitral durante a contração atrial; E= velocidade máxima de enchimento do VE no início da diástole; E/A = razão entre E e A, indica função diastólica do VE durante a diástole; $\% \Delta D$ = porcentagem de variação do diâmetro ventricular ou fração de encurtamento do ventrículo esquerdo (VE); FE= fração de ejeção do VE; VAo = velocidade do fluxo na aorta; Ao = diâmetro da aorta; FC = frequência cardíaca.

Anexo 6. Efeito da suplementação de licopeno, α -tocoferol e licopeno + α -tocoferol sobre os níveis séricos de colesterol total, HDL colesterol, triglicérides e LDL colesterol em ratos tratados com DOX.¹

Colesterol total (mg / dl)			
G1	G2	G3	G4
54,50 (14,00) _a	45,00 (10,00) _a	45,50 (9,00) _a	56,00 (16,00) _a
G5	G6	G7	G8
315,00 (165,00) _b	260,00 (189,50) _b	193,00 (138,00) _b	224,00 (96,50) _b
HDL colesterol (mg / dl)			
G1	G2	G3	G4
32,50 (9,50) _a	31,00 (14,00) _a	27,50 (9,00) _a	31,00 (9,00) _a
G5	G6	G7	G8
126,50 (60,00) _b	112,00 (59,00) _b	91,00 (75,50) _b	108,00 (84,50) _b
Triglicérides (mg / dl)			
G1	G2	G3	G4
74,50 (39,50) _a	79,00 (53,50) _a	111,00 (63,50)	75,50 (48,50) _a
G5	G6	G7	G8
400,00 (832,00) _b	779,00 (738,50) _b	199,50 (422,50)	254,00(986,00) _b
LDL colesterol (mg / dl)			
G1	G2	G3	G4
11,50 (4,00) _{aAB}	9,00 (6,00) _{aA}	11,50 (10,50) _{aAB}	27,00 (6,00) _B
G5	G6	G7	G8
88,50 (48,00) _b	49,00 (45,50) _b	63,50 (30,00) _b	75,00 (70,50)

¹Os valores são apresentados em mediana e semi-amplitude total. As diferenças estatísticas entre os grupos são apontadas por presença de letras diferentes. Letras maiúsculas comparam grupos de uma mesma linha e letras minúsculas comparam grupos de uma mesma coluna. G, grupos; G1, Controle; G2, Licopeno; G3, α -tocoferol; G4, licopeno + α -tocoferol; G5, doxorrubicina; G6, doxorrubicina + licopeno; G7, doxorrubicina + α -tocoferol; G8, doxorrubicina+ α -tocoferol+licopeno.

Artigo Original

(a ser submetido à revista *Cardiovascular Research*)

Alpha-tocopherol-induced cardiotoxicity in rats: an echocardiographic and histological assessment

Maria Carolina Munhoz Oliveira Nascimento¹, Beatriz Bojikian Matsubara¹, Luiz Shiguero Matsubara¹, Camila Renata Correa¹, Elenize Jamas Pereira¹, Priscila Lucelia Moreira¹, Caio Henrique Paganini Burini², Kyung-Jin Yeum³, Ana Lucia Anjos Ferreira¹

¹Department of Internal Medicine, Botucatu School of Medicine, UNESP, São Paulo State University, CEP: 18618-970, Botucatu, SP, Brazil;

²Department of Veterinary Pathology, School of Veterinary Medicine, UNESP, São Paulo State University, CEP: 18618-000, Botucatu, SP, Brazil.

³United States Department of Agriculture, Human Nutrition Research Center on Aging at Tufts University, Boston, MA, 02111, USA;

Address correspondence to: Maria Carolina M.O. Nascimento; Dept. Clinica Medica; Faculdade Medicina de Botucatu; UNESP; CEP: 18618-970; Botucatu; SP; Brazil; phone +55-14-3882.2969; FAX: +55-14-3882.2238; carolinamon@terra.com.br

Number of words: 5589

Abbreviations

A, late peak transmitral flow velocity;

E, early peak transmitral flow velocity;

E / A, left ventricle diastolic function index;

FS, left ventricle fractional shortening or left ventricle diameter variation percentage $[(LVD - LVS) / LVD] \times 100$;

EF, ejection fraction (EF) $(LVD^3 - LVS^3) / LVD^3$;

Ao, aortic diameter;

HR, heart rate;

LA, left atrium antero-posterior systolic diameter during ventricle systole;

LV, left ventricle;

LVD, left ventricle end-diastolic dimension measured at maximal dimension;

LVS, left ventricle end-systolic dimension;

PWT, left ventricle posterior wall thickness measured at maximal dimension;

PWT/LVD ratio, free wall relative thickness was calculated by the ratio;

LA/Ao, left atrium diameter normalized to the aortic diameter.

Introduction

Ascribed in 1922 as an essential lipid-soluble factor for maintaining normal reproduction, vitamin E is currently recognized as an important dietary nutrient for all animals (1). Vitamin E is a term used to describe a family of tocopherols (α , β , γ and δ - tocopherols and α , β , γ and δ - tocotrienols) of which α -tocopherol is the most important and abundant molecule (2). Bile production and secretion are essential to the absorption of α -tocopherol which is carried mainly by low-density lipoprotein LDL fraction (LDL-cholesterol) (3).

It has been shown that vitamin E may attenuate several events and diseases. Although its protective mechanism is not completely understood, the antioxidant effect seems to be the most important (1, 2, 4). It is also essential for tumour inhibition, immune response stimuli, membrane stability (5) and inhibiting the conversion of nitrites into nitrosamines (2). Its protection has been examined specifically in cardiovascular diseases (6-8) including hypertension (9) and *angina pectoris* (10). A protective effect on myocardium infarction-induced-left ventricle dilatation has been identified when Vitamin E is associated with ascorbate (11). Cardiovascular observational studies that examined mortality (7)(12) and coronary artery event (13) risks showed their inverse association with high intake of food rich in Vitamin E. On the other hand, there was no Vitamin E supplementation efficacy on coronary disease in a double-blind study (10) or under cardiotoxicity experimental models (14, 15).

The reported side effects of vitamin E supplementation have included gastrointestinal disturbances, increase in prothrombin time, decrease in absorption of vitamins A and K (10), elevated oxidative chemotherapeutic toxicity in mice (16) and

promotion of mice skin tumour (17) at high doses. Few studies, however, have examined the undesirable effect of vitamin E on cardiac diseases. They showed that vitamin E was associated with a strong *in vitro* pro-oxidant action on low-density lipoprotein (18), with a 20% higher probability of developing congestive heart failure in humans with ventricular dysfunction (19) and with augmented mortality risk in patients with coronary disease (20). However, to our knowledge, the effect of Vitamin E supplementation on hearts free of disease has not been studied. Factors that may determine the switch from antioxidant to pro-oxidant behaviour of vitamin E can be associated, in part, with the vulnerability of organs already compromised by a disease-induced heavy oxidative stress (21).

In light of these considerations, the present study was undertaken to evaluate the effect of α -tocopherol supplementation on the heart of animals without previous cardiac disease. Additionally, we estimated α -tocopherol uptake into the heart. A significant cardiotoxicity followed by α -tocopherol treatment was found for all parameter investigated. Uptake of the supplement into the heart was confirmed by chromatography.

Material and Methods

Chemical Products. α -tocopherol (dl- α -tocopherol-acetate) was donated by Relthy Labs (Indaiatuba, SP, Brazil). HPLC-grade methanol and water were obtained from J. T. Baker Chemical (Philipsburg, NJ). Methyltert-butyl ether was purchased from Aldrich Chemical (Milwaukee, WI). All HPLC solvents were passed through a 0.45-mm membrane filter and degassed before use. The standard (DL- α -tocopherol) was stored at -70°C until use. Pentobarbital sodium (Cristalia, Paulinia, SP, Brazil), ketamine chlorhydrate (Vetbrands, Jacarei, SP, Brazil) and xylazine (Bayer, Sao Paulo, SP, Brazil) were used for anaesthesia.

Animals. Male Wistar rats (400 g) from CEMIB (Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica, UNICAMP, Campinas, SP, Brazil) were housed for seven weeks (wks) and kept three per cage in plastic cages in the animal facility at the Experimental Laboratory of Internal Medicine Department, Botucatu School of Medicine, UNESP where they consumed water and commercial diet (22) *ad libitum*. Rats were randomly assigned either to C (control, n = 11) or E (α -tocopherol, n = 11). α -tocopherol or corn oil was administered daily by gavage every morning for the entire seven-wk period. The α -tocopherol supplement mixed with corn oil [250 mg α -tocopherol / (Kg body wt)/day] was given to E animals, while the C group received only corn oil. To avoid differences in the energy provided, all groups received the same corn oil volume [(~0.5 mL/(Kg body wt) / day]. One day before euthanasia all animals underwent a transthoracic Doppler echocardiogram using light anaesthesia [ketamine [50mg/(kg body wt)] and xylazine [1mg/(kg body wt)]]. Rats fasted overnight before euthanasia under pentobarbital sodium IP [50 mg/(kg body wt)] anaesthesia and necropsied immediately after death. After collection, heart and plasma were stored at -80°C until α -tocopherol analyses. Tissues were fixed with 10% buffered formalin for 48 h for morphological analysis. The protocol used was in accordance with the Ethical Principles for Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the local Animal Research Ethics Committee (Document # 445/2004).

Alpha-tocopherol preparation. The α -tocopherol-corn oil mixture was stirred for 20 min in a water bath at 54°C before being fed to the animals. Each milliliter of solution contained 250 mg of α -tocopherol. The α -tocopherol was monitored at 294 nm and confirmed by diode-array spectra, as previously described (23). The stability of α -tocopherol in corn oil

was checked by HPLC, while the α -tocopherol was stable in the α -tocopherol-corn oil mixture for 9 weeks at 25°C.

The extraction of α -tocopherol was performed by adding 100 μ L of α -tocopherol solution to 900 μ L of ethanol. To dissolve α -tocopherol, the solution was sonicated three times at 4°C (1 minute) and also vortexed for 30 seconds. Thus, 20 μ L of this solution was injected in the HPLC. After the end of the analysis, α -tocopherol concentration was obtained by the quantification of chromatograms where the area of this vitamin is divided by the area of the internal standard (DL- α -tocopherol).

Analysis of α -tocopherol in the diet. The diet was analyzed according to a previous study (24). Five mL of H₂O was added to 10 g of diet and then swirled for 1 minute. Extraction solution [30 mL; hexane/acetone/ethanol/toluene (50:35:30:35)] was added and swirled for 1 minute, followed by 16 hours in the dark at room temperature; 4 mL of 40% methanolic KOH and hexane (30 mL) were added and the mixture was left in the dark at room temperature. After 1 hour, 10% Na₂SO₄ (30 mL) was added, shaken and left in the dark at room temperature. After 1 hour the hexane layer was collected and volume was recorded. Aliquots of 200 μ L were evaporated under N₂ and the residue redissolved in 100 μ L of ethanol, vortexed and sonicated for 30 seconds. Aliquots of 50 μ L of the final extract were injected into the HPLC system.

Tissue Preparation and Extraction. Heart (left ventricle) was harvested, weighed and analyzed after saponification as previously described (24). Briefly, samples (150g) were cut into small slices before the addition of 100 μ L (0.095 mol/L) of pyrogallol in ethanol, 300

μL (0.5 mol/L) KOH in H_2O and 1 mL ethanol. The solution was vortexed, incubated and shaken at 37°C for 2 hours, while the tubes were covered with parafilm. After incubation, tubes were cooled to room temperature, 1 mL H_2O was added and the mixture were revortexed. DL- α -tocopherol was added as an internal standard. This mixture was shaken with 3 mL anhydrous ether/hexane (2:1, stabilized with 1% ethanol v/v), then vortexed, and centrifuged at $800 \times g$ at 4°C for 5 min. The upper layer was removed, the extraction repeated and the upper layers were combined. H_2O (2mL) was added, the solution was vortexed and 2 mL ethanol was added before centrifugation at $800 \times g$ for 5 min. The hexane layer was evaporated completely under N_2 , and the residue was redissolved in 100 μL of ethanol, vortexed and sonicated twice for 30 sec and centrifuged at $800 \times g$ at 4°C for 2 min. A 50- μL aliquot was used for HPLC analysis. All sample analyses were done in duplicate. All sample processing was carried out under red light. The recovery of the added internal standard was consistently $> 90\%$.

HPLC analysis of α -tocopherol. The HPLC system was a Waters Alliance 2695 (Waters, Wilmington, MA, USA) and consisted of a pump and chromatography bound to a 2996 programmable photodiode array detector and a 2475 fluorescence detector, a C30 column (3.0 μm , 150 x 4.6 mm, YMC, Wilmington, MC), and Empower software. The Waters 2996 programmable photodiode array detector was set at 292 nm for α -tocopherol reading. The HPLC mobile phase was methanol/methyl-tert-butyl ether/water (83:15:2, v/v/v, 15 g/L ammonium acetate in water, solvent A) and methanol/methyl-tertbutyl ether/water (8:90:2, v/v/v, 10 g/L ammonium acetate in water, solvent B). The gradient procedure, at a flow rate of 1 mL/min (16°C), was as follows: 1) 100% solvent A was used for 2 min followed by a 6-min linear gradient to 70% solvent A; 2) a 3-min hold followed by a 10-min linear

gradient to 45% solvent A; 3) a 2-min hold, then a 10-min linear gradient to 5% solvent A; 4) a 4-min hold, then a 2-min linear gradient back to 100%. An interval of 4 minutes between each run was provided to stabilize the column and allow new α -tocopherol determination. Alpha-tocopherol was quantified by determining peaks in the HPLC chromatograms calibrated against known amounts of standard. The amounts were corrected for extraction and handling losses by monitoring the recovery of the internal standards.

Echocardiographic study. One day after the last administration of α -tocoferol, all animals were evaluated *in vivo* by transthoracic Doppler-echocardiogram using a SONOS 2000 (Hewlett- Packard Medical Systems, Andover, MA, USA), equipped with a 7.5 MHz phased array transducer. Imaging was performed with a 60° sector angle and 3 cm imaging depth. Rats were lightly anesthetized by an intramuscular injection mixture of ketamine (50 mg/Kg) and xylazine (1 mg/Kg). The chest was shaved and the rats were placed over a wood “V” shaped basis in left lateral decubitus. Targeted 2-D and M-mode echocardiograms were obtained from short-axis views of the left ventricle (LV) at or just below the tip of the mitral-valve leaflets, and at the level of aortic valve and left atrium (LA). M-mode images of LV, LA and aortic diameter (Ao) were recorded in a black-and-white thermal printer (Sony Up – 890MD) at a sweep speed of 100 mm/s. All exams were performed by the same examiner and obtained according to the leading-edge method recommended by the American Society of Echocardiography (25). Measurements represented the mean of at least five consecutive cardiac cycles. LV end-diastolic dimension (LVD) and posterior wall thickness (PWT) were obtained at maximal diastolic dimension, and the end-systolic dimension (LVS) was taken at maximal anterior motion of the posterior wall. LA was measured at its maximal diameter and the aorta was measured at the end of

diastole. Free wall relative thickness was calculated by the PWT/LVD ratio. The peak velocities of diastolic transmitral flow (E and A velocities) were obtained in the apical four-chamber view and used as indexes of LV diastolic function. The time interval between two consecutive cardiac cycles was measured for heart rate calculation. Global ventricular systolic function was evaluated by the following indexes: fractional shortening (FS, %) = $[(LVD - LVS) / LVD] \times 100$ and ejection fraction (EF) $(LVD^3 - LVS^3) / LVD^3$.

Histological study. Coronal sections of the left ventricle were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were cut from the blocked tissue, and stained with haematoxylin-eosin (H&E). The severity of morphological features identified by H&E was graded blindly by two pathologists on a scale from zero (no alterations) to three (marked abnormality) using semi-quantitative analysis according to the modified Billingham method (26) as follows: zero, normal morphology; 1, few affected cells with early myofibrillar changes (loss) and cytoplasmic vacuolization; 2, group of affected cells with loss of contractile elements (marked myofibrillar loss) and cytoplasmic vacuolization; 3, extensively affected tissue characterized by severe changes.

The following items were evaluated: a) cytoplasmic vacuoles (CV); b) nuclear necrosis (NN); c) myocytic degeneration (MD); d) inflammatory infiltrate (II) and; e) cell organization (CO). The criteria used to identify cytoplasm necrosis were extreme acidophilic appearance and myofibrillar loss, while nuclear necrosis was identified by pyknosis, karyorrhexis and karyolysis, corresponding to the size reduction, fragmentation and disappearance of nuclei, respectively. Myocytic degeneration was recognized by identification of smaller cells, with pale and homogenous cytoplasm. These investigations were performed using equipment, from Carl Zeiss, Germany, consisting of a light

microscope (Axio Imager A1; magnification X400) attached to a digital video camera (Zeiss Vision) and connected to a personal computer equipped with image analyzer software (Axio Vision software rel., version 4.3).

Lipid protein analysis. During the euthanasia procedure, 3 to 5 ml of blood was collected by cardiac puncture for analysis of serum levels of total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL-cholesterol), low-density lipoprotein (LDL-cholesterol) and triglyceride by using the automation system Vitros 950 – Johnson & Johnson (Langhorne, PA, US). Total cholesterol and triglyceride levels were obtained by using the end-point colorimetric method – dry chemistry. HDL serum levels were analyzed by the magnetic colorimetric method – dry chemistry. Finally, the direct LDL levels were determined based on enzymatic colorimetric assay using a specific kit from DiaSys (Diagnostic Systems International) – C LDL Select FS.

Statistical Analysis. Data for transthoracic Doppler echocardiogram, body and cardiac weights were assessed by ANOVA complemented with the Tukey test for multiple comparisons. Results are expressed as mean $\pm$ SD. Histological, lipid protein and, cardiac α -tocopherol levels were assessed by a nonparametric variance analysis complemented with the Dunn test for multiple comparisons (27) and results are expressed as median $\pm$ semi-range. A *p* level of 0.05 was used to determine significance.

Results

General considerations. Animals from C and E groups exhibited healthy conditions throughout the studied period. However, aggressive behaviour, less cooperation during the

supplementation procedure and bleeding located between the mouth and nostrils were observed among E group animals. No death or *in vivo* congestive failure symptoms were detected in either animal group.

Body and cardiac weights. Both groups had similar weight gain profiles up to the 3rd week. After that, through the end of the protocol, animals supplemented with α -tocopherol showed significant weight loss (C vs. E; $p < 0.05$). At the end of the study (7th wk) body weight (g) (mean $\pm$ SD) was lower in E (412.82 ± 23.40) than in C (480.27 ± 27.82) group (Figure 1). Supplementation with α -tocopherol led to global lower cardiac weight (g) (mean $\pm$ SD) in E (0.94 ± 0.07) as compared to the C (1.08 ± 0.09) group at the end of study.

Alpha-tocopherol uptake and absorption. No α -tocopherol was detected in the diets. From the α -tocopherol corn oil mixture, the animals received 250 mg α -tocopherol / (Kg body wt / d). After seven weeks of α -tocopherol supplementation, cardiac α -tocopherol levels (nmol/Kg tissue) (median $\pm$ total semi-range) were higher in E (109.91 ± 18.43) than C (52.09 ± 17.62) group ($p < 0.05$). There was detectable α -tocopherol in cardiac tissue of C group due to its presence in the corn oil.

Histological analysis. Rat myocardium from C group presented no pathological changes (Figure 2A). Mononuclear and polymorphonuclear cells were rare in the E group. Supplementation with α -tocopherol led to damage of the ventricular myocytes. When compared with the C group, the blinded semi-quantitative analysis revealed marked nuclear necrosis ($p < 0.05$), myocyte degeneration ($p < 0.05$), disorganization of myofibrillar

morphology ($p < 0.05$), and cytoplasmic vacuolization of myocytes ($p < 0.05$) (Table 1). The main myocardial histological alterations are shown in Figure 2B.

Lipid protein analysis. Both groups (C; E) presented similar values (mg/dL) (median $\pm$ total semi-range) in total-cholesterol (54.50 ± 14.00 ; 45.50 ± 9.00), HDL-cholesterol (32.50 ± 9.50 ; 27.50 ± 9.00), LDL-cholesterol (11.50 ± 4.00 ; 11.50 ± 10.50) and triglyceride (74.50 ± 39.50 ; 111.00 ± 63.50) serum levels.

Echocardiographic evaluation. Echocardiographic exam allowed the evaluation of cardiac remodelling using morphological and functional variables, which are presented in Tables 2 and 3. Alpha-tocopherol supplementation was associated with significantly decreased left ventricular end-diastolic diameter (LVD) and aortic diameter (Ao), left ventricle fractional shortening (FS), ejection fraction (EF) and transmitral flow early peak velocity (E). There were no echocardiographic changes in the hearts of control group animals.

Discussion

Although epidemiological evidence suggests that increased dietary intake of naturally occurring antioxidants is associated with lower risk of cardiovascular diseases, the prior primary and secondary prevention trials based on antioxidant therapy were not conclusive (28-30). In particular a series of large, negative intervention studies on vitamin E, C, and/or β -carotene supplements and cardiovascular disease have been identified. Recently, the American College of Cardiology and American Heart Association concluded that there is currently no basis for recommending that patients take vitamin C or E supplements or other antioxidants for the express purpose of preventing or treating coronary

artery disease (31). A meta-analysis of clinical trials studying vitamin E suggests that the use of high doses of vitamin E (greater than 400 IU/day) may actually increase mortality in patients with coronary disease (20).

In the current study, synthetic α -tocopherol was administered 5 times per week at 250 mg / (Kg body wt) for 7 weeks resulting in a cumulative dose of 8750 mg/Kg body wt. The daily supplementation dose of α -tocopherol was selected [250 mg/(Kg body wt)/day] based on previous studies that showed protective effect of α -tocopherol against cardiac diseases (32, 33). Our study revealed general and cardiac changes in animals supplemented with that dose of α -tocopherol without prior cardiac disease. In fact, α -tocopherol supplementation was associated with behavioural modification and decreases in cardiac and body weight gain in rats. The lack of experimental studies analyzing body weight in α -tocopherol-induced cardiotoxicity prevents further comparisons. Regarding cardiac weight, a previous study identified an opposite result. Significant heart enlargement was observed in Wistar rats after treatment with 10,000 IU and 25,000 IU of vitamin E/Kg of diet/8 months (34). The global cardiac weight diminution that occurred in the current study can be attributed in part to the weight body loss detected in rats supplemented with α -tocopherol. A decrease in protein-caloric ingestion restrains body weight while left ventricle weight gain (35) might have been provoked by α -tocopherol supplementation, although we did not monitor daily diet consumption.

Effect of α -tocopherol supplementation on α -tocopherol cardiac tissue content. Oral treatment with α -tocopherol [250 mg α -tocopherol /Kg body wt / d)] for 7 weeks led to appearance of α -tocopherol (median, 109.91 nmol/Kg tissue) in the saponified cardiac

tissue, a fact which confirms the uptake of the supplement into that organ. Previous study found greater cardiac α -tocopherol levels (mean, ~ 93,000 nmol/Kg of cardiac tissue) in non-supplemented Sprague-Dawley rats (36). However, the authors did not mention the level of α -tocopherol in the diet composition.

Effect of α -tocopherol supplementation on left ventricle histology. The marked myocytic loss and cell disorganization in rats supplemented with α -tocopherol suggest a destructive effect of this supplement on cardiomyocytes. Interestingly, one previous study showed that α -tocopherol deficiency led to similar changes, including myofilament loss, cytoplasmic vacuolization, cell necrosis and myocyte loss (37). To our knowledge, there are no reports showing cardiomyocyte histological changes in subjects under α -tocopherol supplementation.

Effect of α -tocopherol supplementation on left ventricle remodelling and function. In this study, we observed that α -tocopherol supplementation was associated with significant decrease in ventricular size and systolic (FS and EF indexes) and diastolic dysfunction (E velocity). The necrosis of myocytes found in histological analysis is in accordance with the observation of functional decrease (FS and EF). The left ventricle size decrease may have resulted from at least two factors: myocyte necrosis and delayed growth. However, systolic function damage suggests that the second factor is the more important. Our data lead us to consider the possibility of another interfering factor such as dehydration and/or diastolic dysfunction. Nevertheless, the presence of diastolic dysfunction with systolic dysfunction is common. The effect of α -tocopherol either on systolic and diastolic dysfunction or remodelling damage has not previously been described in rats *in vivo*. Only a non-

significant impaired of contractile function in isolated heart of α -tocopherol-treated rabbits (300 mg/(Kg body wt) / d / 12 wk) was previously described by others (14). Wahab et al. described how vitamin E used in the same dose as in our protocol did not lead to cardiotoxicity in mice (32). However, other target organs have been reported. For instance, a vascular damage (39) and clotting (40) reduction after low doses of α -tocopherol supplementation and the sclerotic thickening of the aorta's intima in α -tocopherol-treated rabbits (300 mg/(Kg body wt) / d / 12 wk) (14).

The protective effect of α -tocopherol on propagation of the lipid peroxidation phase is well known. The reaction occurs in three steps as follows: Step 1. α -tocopherol + lipid peroxy radical $\rightarrow$ α -tocopheroxy radical + lipid hydroperoxide; Step 2. α -tocopherol + radical oxidant $\rightarrow$ inactive oxidant + α -tocopheroxy radical; Step 3. α -tocopheroxy radical + lipid peroxy radical $\rightarrow$ nonradical products. α -tocopheroxy radical generated in the first step should react with another lipid peroxy radical to form a stable adduct. Thus, each molecule of α -tocopherol has the capacity to scavenge two radicals (i.e., stoichiometric value of α -tocopherol = 2), resulting in ≤ 1 mol lipid hydroperoxide formed per mole of α -tocopherol consumed (41). The pathway shown implies that augmented levels of α -tocopherol result in increased quantities of α -tocopherol radicals. The α -tocopherol radical can independently initiate the lipid peroxidation process. When the antioxidant system is balanced, this pro-oxidant action of vitamin E radicals is inhibited by co-antioxidants which can reduce the radical back to vitamin E. However, elevated levels of α -tocopherol only (without lipid peroxy radicals and/or co-antioxidants) may result in increased levels of α -tocopherol radicals which can no longer be efficiently detoxified by the co-antioxidants (42). These statements can partially account for our results. The absence

of previous oxidative stress in the current protocol design (animals without disease) may have resulted in an inappropriate ratio of lipid peroxy radicals / α -tocopherol.

The effect of the imbalance between antioxidant system and free radical magnitude on antioxidant efficacy has been indicated by human and experimental studies. The α -tocopherol pro-oxidative action has been suggested by high susceptibility to hydrogen peroxide-induced peroxidation of erythrocytes found in non-smoking men supplemented with D- α -tocopherol acetate (1050 mg / d / 20 wk) (43). Mortality increase due to hemorrhagic stroke was also identified in smoking male volunteers exposed for 5–8 years to daily Vitamin E supplementation (50 mg / d / 6.1 years) (44). The α -tocopherol-mediated peroxidation process has been demonstrated by experimental studies using lipoprotein (18, 45-47) in which its oxidation was initiated and promoted by α -tocopheroxyl radical. Results from animal studies have also emphasized the imbalance issue. Lipid peroxidation diminution (32, 48) and improvement of glutathione, superoxide-dismutase (32) were shown in heart tissue of α -tocopherol-rodents supplemented under high oxidative stress.

The role of oxidative stress magnitude on other antioxidant efficacy has also been addressed. Recently an interesting hypothesis has been proposed for the switching between antioxidant/pro-oxidant effects of β -carotene. Under conditions of moderate oxidative stress, the antioxidant function of β -carotene predominates. However, under heavy oxidative stress, β -carotene undergoes an oxidative breakdown leading to the formation of aldehydes and epoxides which are responsible for the pro-oxidative effect of β -carotene (49, 50). This mechanism probably explains the results from previous studies where β -carotene supplementation was associated with increased lung cancer in smokers (51, 52). Recently, it was also observed that high doses of another antioxidant, butylated hydroxytoluene,

induced plasma lipid protein and cardiac lipid peroxidation enhancement in rats without prior diseases (53).

The adverse myocardial effects of α -tocopherol supplementation found in our study may have resulted from the dose itself and / or from the oxidative stress absence. Our results may indicate a cardiac harmful role of α -tocopherol under healthy conditions. Dietary vitamin E, however, is readily incorporated into biological membranes and has no toxic effects (54, 55). Thus, an appropriate dietary supplementation with antioxidants, including vitamin E and other co-antioxidants could constitute part of a protective strategy to minimize future oxidative damage. Our results may result from a switching between antioxidant/pro-oxidant effects of α -tocopherol, as presented by β -carotene as well. Although the experimental design using long-term α -tocopherol supplementation mimicked the clinical situation, it would be imprudent to extrapolate the current results to humans. However, the present study contributes to expanding the inquiry regarding the function of α -tocopherol supplementation under healthy cardiac conditions.

Conclusions

Administration of α -tocopherol [250 mg /(Kg body wt) / day / 7wks] to Wistar rats without prior cardiac disease induced body weight loss and cardiotoxicity confirmed by echocardiography and histology. The myocardial remodelling and systolic/diastolic dysfunction may reflect a pro-oxidative effect of vitamin E, which deserves further study.

Acknowledgements

We thank Alexandre L. Loureiro, Corina Correa, Jose A. Souza, Ethel L.B. Novelli, Jose C. Georgete, Mario A. Dallaqua, Mario B. Bruno, Rogerio A. Monteiro, Sandra A. Fábio, Sueli Clara, Vitor M. Souza for their help in this study.

References

- (1) Halliwell B, Gutteridge JMC. Antioxidant protection by low-molecular mass agents: Compounds derived from the diet. In: Halliwell B, Gutteridge JMC, editors. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press; 1999. p. 208-219.
- (2) Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. Antioxidant Nutrients and Adriamycin Toxicity. *Toxicology* 2002;180:79-95.
- (3) Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O, Koller E. Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res* 1987;28:495-509.
- (4) Milei J, Boveris A, Llesuy S, Molina HA, Storino R, Ortega D, et al. Amelioration of adriamycininduced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J* 1986;111:95-102.
- (5) Herman EH, Ferrans VJ. Influence of vitamin E and ICRF-187 on chronic doxorubicin cardiotoxicity in miniature swine. *Lab Invest* 1983;49:69-77.
- (6) Hennig B, Boissonneault G, Wang Y. Protective effects of vitamin E in age-related endothelial cell injury. *Int J Vitamin Nutr Res* 1989;59:273-279.
- (7) Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willet WCV. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med* 1993;328:1444-1449.

- (8) Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge heart antioxidant study (CHAOS). *Lancet* 1996;347:781-786.
- (9) Washio M, Nanishi F, Okuda S, Onoyama K, Fujishima M. Alpha tocopherol improves focal glomerulosclerosis in rats with adriamycin-induced progressive renal failure. *Nephron* 1994;68:347-352.
- (10) Bieri JG, Corash L, Hubbard VS. Medical uses of vitamin E. *N Engl J Med* 1983;308:1063-1071.
- (11) Qin F, Yan C, Liu W, Dong E. Vitamins C and E attenuate apoptosis, β -adrenergic receptor desensitization, and sarcoplasmic reticular Ca^{2+} ATPase downregulation after myocardial infarction. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1827-1842.
- (12) Kushi LH, Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick RM. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996;334:1156-1162.
- (13) Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willett WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993;328:1450-1456.
- (14) Breed JG, Zimmerman AN, Dormans JA, Pinedo HM. Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Res* 1980;40:2033-2038.

- (15) Van Vleet JF, Ferrans VJ, Weirich WE. Cardiac disease induced by chronic adriamycin administration in dogs and an evaluation of vitamin E and selenium as cardioprotectants. *Am J Pathol* 1980;99:13-42.
- (16) Shinozawa S, Gomita Y, Araki Y. Effect of high dose α -tocopherol and α -tocopherol acetate pretreatment on adriamycin (doxorubicin) induced toxicity and tissue distribution. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1988;20:329-335.
- (17) Mitchel REJ, McCann R. Vitamin E is a complete tumor promotor in mouse skin. *Carcinogenesis* 1993;14:659-662.
- (18) Bowry VW, Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. *Journal of American Chemistry Society* 1993;115:6029-6044.
- (19) Marchioli R, Levantesi G, Macchia A, Marfisi R, Nicolosi G, Tavazzi L, et al. Vitamin E increases the risk of developing heart failure after myocardial infarction: results from de GISSI-Prevenzione trial. *Journal of Cardiovascular Medicine* 2006;7:347-350.
- (20) Miller ERr, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: Highdosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 2005;142:142:37-46.
- (21) Rietjens IMCM, Boersma MG, de Haan L, Spenkelink B, Awad HM, Cnubben NHP, et al. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2002;11:321-333.

- (22) Paiva SA, Novo R, Matsubara BB, Matsubara LS, Azevedo PS, Minicucci MF, et al. Beta-carotene attenuates the paradoxical effect of tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. *J Nutr* 2005;135:2109-2113.
- (23) Yeum K-J, Ferland G, Patry J, Russell RM. Relationship of plasma carotenoids, retinol and tocopherols in mothers and newborn infants. *J Am Coll Nutr* 1998;17:442-447.
- (24) Ferreira ALA, Yeum K-J, Liu C, Smith D, Wang X-D, Russell RM. Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. *J Nutr* 2000;130:1256-1260.
- (25) Sahn DJ, de Maria A, Kisslo J, Weyman AE. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Echocardiography. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 1978;58:1072-1083.
- (26) Billingham ME, Mason JW, Bristow MR, Daniels JR. Anthracycline cardiomyopathy monitored by morphologic changes. *Cancer Treat Rep* 1978;62:865-872.
- (27) Zar JH. Biostatistical analysis. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999.
- (28) Shihabi A, Li WG, Miller FJJ, Weintraub NL. Antioxidant therapy for atherosclerotic vascular disease: The promise and the pitfalls. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H797-H802.
- (29) Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: Meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2003;361:2017-2023.

- (30) Frei B. Efficacy of dietary antioxidants to prevent oxidative damage and inhibit chronic disease. *J Nutr* 2004;134:3196S-3198S.
- (31) Gibbons RJ, Abrams J, Chatterjee K, Daley J, Deedwania PC, Douglas JS, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with chronic stable angina—Summary article: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Chronic Stable Angina). *Circulation* 2003;107:149–158.
- (32) Wahab MHA, Akoul EEMS, Abdelaziz AH. Modulatory effects of melatonin and vitamin-E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. *Tumori* 2000;86:157-162.
- (33) Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S, Kontos N, Kostopoulou E, Papachrestou A, et al. Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver from severe ischemia-reperfusion injury. *World J Surg* 2002;26:872-877.
- (34) Yang NYJ, Desai ID. Effect of high levels of dietary vitamin E on hematological indices and biochemical parameters in rats. *J Nutr* 1977;107:1410-1417.
- (35) Cicogna AC, Padovani CR, Georgette JC, Aragon FF, Okoshi MP. Effects of protein-calorie restriction on mechanical function of hypertrophied cardiac muscle. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia* 1999;72:431-435.
- (36) Danelisen I, Palace V, Lou H, Singal PK. Maintenance of myocardial levels of vitamin A in heart failure due to adriamycin. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:789-95.

- (37) Legha SS, Wang YM, Mackay B, Ewer M, Hortobagyi GN, Benjamin RS, et al. Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1982;393:411-418.
- (38) Ganz WI, Sridhar KS, Ganz SS, Gonzalez R, Chakko S, Serafini A. Review of tests for monitoring doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Oncology* 1996;53:461-470.
- (39) Keaney JF, Gaziano JM, Xu A, Frei B, Curran-Celentano J, Shwaery GT, et al. Low-dose alpha-tocopherol improves and high-dose alpha-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest* 1994;93:844-851.
- (40) Schulte I, Bektas H, Klempnauer J, Borlak J. Vitamin E in heart transplantation: effects on cardiac gene expression. *Transplantation* 2006;81:736-745.
- (41) Upston JM, Terentis AC, Stocker R. Tocopherol-mediated peroxidation (TMP) of lipoproteins: implications for vitamin E as a potential antiatherogenic supplement. *FASEB J* 1999;13:977-994.
- (42) Stocker R. The ambivalence of vitamin E in atherogenesis. *TIBS* 1999;24:219.
- (43) Brown KM, Morrice PC, Duthie GG. Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and nonsmokers: dose response to vitamin E supplementation. *Am J Clin Nutr* 1997;65:496-502.
- (44) Anonymous. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:1029-1035.

- (45) Neuzil J, Thomas SR, Stocker R. Requirement for, promotion, or inhibition by α -tocopherol of radical-induced initiation of plasma lipoprotein lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1997;22:57-71.
- (46) Witting PK, Westerlund C, Stocker R. A rapid and simple screening test for potential inhibitors of tocopherol-mediated peroxidation of LDL lipids. *J Lipid Res* 1996;37:853-867.
- (47) Upston JM, Terentis AC, Morris K, Keaney JFJ, Stocker R. Oxidized lipid accumulates in the presence of α -tocopherol in atherosclerosis. *Biochem J* 2002;363:753-760.
- (48) Sonneveld P. Effect of α -tocopherol on the cardiotoxicity of adriamycin in the rat. *Cancer Treat Rep* 1978;62:1033-1035.
- (49) Siems WG, Sommerburg O, Hurst JS, van Kuijk FJGM. Carotenoid oxidative degradation products inhibit Na^+/K^+ -ATPase. *Free Radic Res* 2000;33:427-435.
- (50) Nagao A. Oxidative conversion of carotenoids to retinoids and other products. *J Nutr* 2004;134:S237-S240.
- (51) α -Tocopherol B-CCPSGA. The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The α -Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1994;330:1029-1035.
- (52) Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1996;334:1150-1155.

- (53) Faine LA, Rodrigues HG, Galhardi CM, Ebaid GMX, Diniz YS, Fernandes AAH, et al. Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2006;57:221-226.
- (54) Bendich A, Machlin LJ. Safety of oral intake of vitamin E. *Am J Clin Nutr* 1988;48:612-619.
- (55) Meydani SN, Barklund PM, Liu S, Meydani M, Miller R, Cannon J, et al. Vitamin E supplementation enhances cell-mediated immunity in healthy elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 1990;52:557-563.