



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia



**Chá-mate (*Ilex paraguariensis*) previne a cardiotoxicidade
aguda induzida pela doxorrubicina em ratos**

Lilian Xavier da Silva

Araçatuba – SP
2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia



Chá-mate (*Ilex paraguariensis*) previne a cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina em ratos

Lilian Xavier da Silva

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista - Unesp, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune.

Araçatuba – SP
2017

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586c Silva, Lilian Xavier da.
Chá-mate (*Ilex paraguariensis*) previne a cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorubicina em ratos / Lilian Xavier da Silva. - Araçatuba, 2017
64 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

1. Cardiotoxicidade 2. *Ilex paraguariensis* 3. Estresse oxidativo 4. Superóxido dismutase-1 5. Glutathione I. Título

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 11.04.1985, Barbosa - SP.

Filiação: Luiza Martucelli da Silva
Antônio Xavier da Silva

2007/2011: Curso de Graduação em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Londrina - Londrina - PR.

2015/2017: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia - SBFis - na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista - UNESP.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiza e Antonio, por me darem a vida e me ensinarem a vivê-la com dignidade, por iluminarem meu caminho com afeto, dedicação e amor para que o trilhasse com fé e esperança, por se doarem inteiramente e renunciarem aos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus, pelo apoio, ajuda e compreensão durante estes dois anos e meio e por estarem sempre ao meu lado me motivando a seguir. Amo incondicionalmente vocês, serei eternamente grata por tudo que fizeram por mim.

À minha irmã Cinthia por todo amor, carinho, paciência, por sempre estar ao meu lado nos momentos bons e difíceis, seu apoio e conselhos foram essenciais para que continuasse trilhando meu caminho.

À minha irmã Maria por todo amor e carinho, por estar sempre ao meu lado me motivando a seguir em frente.

Ao Vinícius meu amor, companheiro e amigo, por tanto amor e dedicação, sua energia e apoio sempre me empurra para frente e me dá esperança.

Obrigada a todos por acreditarem em mim e proporcionarem grandes alegrias e experiências em minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho, por me dar forças e sabedoria, por me fazer quem sou e me mostrar que com fé, esperança e determinação podemos alcançar nossos objetivos.

A minha orientadora, professora Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, por toda dedicação, paciência, incentivo, amizade e por me orientar não só para a realização deste trabalho, mas também como pessoa em tantas áreas da minha vida. Obrigada pela confiança depositada em mim e por todos os momentos de ensinamento e aprendizagem. Você é uma inspiração para mim.

A professora Rita Cássia Menegati Dornelles por ser extremamente amável, gentil e por todas as suas contribuições valiosas para a realização deste estudo.

A professora Ana Lucia dos Anjos Ferreira, por acreditar em nosso trabalho, por nos ceder a doxorrubicina, pelo apoio e sugestões que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Antônio Hernandes Chaves Neto por todo apoio, gentileza, dedicação e ensinamento, por todas as suas contribuições valiosas para a realização deste estudo.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica- FOA/UNESP, Carol, Carolina, Gyn, Jefferson, Thaína, Thaís pelo apoio, longos dias de trabalho, dedicação, carinho e acima de tudo amizade. Obrigada por tudo, principalmente pelos momentos alegres que passamos juntos.

A Helena Cordeiro Barroso que gentilmente fez as análises do eletrocardiograma do estudo, obrigada pelo apoio e amizade.

Aos professores da banca examinadora, Prof^a Dr^a Camila Renata Correa Camacho e Prof. Dr. Paulo Cesar Ciarlini pela disposição, presença nesta comissão examinadora e contribuições para este trabalho.

Aos colegas e amigos do departamento de Ciências Básicas-FOA/UNESP, Maria Sara, Nathalia, Murilo, Jéssica, Victor, Camila e demais colegas pelos momentos agradáveis e apoio.

Aos amigos da escola Manoel Bento Neto de Santópolis do aguapei/SP e da escola Terezinha Lot Zin, pela amizade, apoio e compreensão que foram de extrema importância para realização deste trabalho.

A Prof. Renata Campos Capela do Laboratório UNIPEX UNESP/Botucatu pela realização das lâminas histológicas.

Aos professores do departamento de Ciências Básicas- FOA/UNESP, Dóris Hissako Sumida, Sandra Helena Penha de Oliveira, João César Bedran de Castro, João Carlos Callera, Cristina Antoniali, Wilson Garcia e Mário Jefferson Quirino Louzada pela contribuição no meu aprendizado e trabalho.

A todos os funcionários da FOA/UNESP, Arnaldo, Camilo, João, Alan, Eliseide, André, Wilson, Grisalda, Gym, Mauro (*in memória*), Maurício, Pedro, Sandra, e Alexandrina, dentre outros, pela disposição ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A UNESP (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”) pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

A Cristiane, Lilian, Diogo e Valéria, da secretaria de pós-graduação da FOA/UNESP, por sempre auxiliar e socorrer na entrega de documentos, relatórios, pareceres.

Ao Diretor da FOA/UNESP, Prof. Wilson Roberto Poi e ao Vice-Diretor Prof. João Eduardo Gomes Filho pelo apoio.

Ao apoio da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior).

A FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo incentivo.

Durante esses dois anos e meio só tenho a agradecer a todos que fizeram parte desta caminhada e que deixaram um pouco de si nele, serei eternamente grata a vocês, pessoas imprescindíveis para a realização e conclusão deste trabalho.

***“A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria;
O que você sente, você atrai;
O que você acredita
torna-se realidade”***

Buda

SILVA, L.X. Chá-mate (*Ilex paraguariensis*) previne a cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina em ratos. 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista – Unesp.

Resumo

A doxorrubicina (DXO) é eficaz contra diferentes formas de câncer, em adultos e crianças, porém seu uso pode causar cardiotoxicidade aguda e crônica, associada ao aumento do estresse oxidativo. Alguns antioxidantes naturais demonstraram ser eficazes em minimizar esses efeitos da DXO, no entanto, o chá mate (CM), não foi avaliado neste contexto. Nossa hipótese é que o pré-tratamento com CM por 30 dias, reduz o dano oxidativo agudo no coração e assim preserva a função cardíaca. Para testar essa hipótese, foram investigados os efeitos do pré-tratamento diário de ratos Wistar machos com 40 mg/kg m.c. de CM, contra a cardiotoxicidade aguda induzida por DXO. Para a escolha da dose de CM ratos Wistar foram divididos em grupo tratados com doses diferentes de chá (10, 20 e 40 mg/m.c., gavagem) e DXO (grupos CM + DXO). Os grupos controle (C), tratados com DXO (DXO) receberam água (1,0 mL, gavagem). Os grupos receberam CM solúvel diluído em água (8 mg/mL). No 29º do tratamento com CM, administrou-se uma dose de DXO (15 mg/kg m.c. - IP) aos grupos DXO e CM + DXO. No 31º dia, após administração de tiopental (50 mg/kg m.c.) associado à lidocaína (4,0 mg/kg m.c.), foram submetidos ao eletrocardiograma (ECG) antes da punção cardíaca (Autorização CEUA FOA: 416/2015). Creatina quinase total (CK) e a fração MB (CK-MB), foram estimadas no plasma. No homogenato de coração (KCl 1,15% m/v) foram quantificadas as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutathione (GSH), atividade de superóxido dismutase total (SOD) e da isoforma SOD1, e expressões de SOD1, Akt total e p-Akt, por *western blotting*. O pré-tratamento com 40 mg/kg m.c. de CM preveniu o aumento da frequência cardíaca, o prolongamento do intervalo QTc e PR, o aumento de CK e CK-MB e de TBARS. Também preveniu a redução de GSH, SOD e SOD1. Além disso, o aumento da relação p-Akt/Akt. Concluímos que o pré-tratamento com 40 mg/kg m.c. CM previne o dano oxidativo cardíaco agudo induzido pelo DXO, preservando a função cardíaca.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade, *Ilex paraguariensis*, Estresse Oxidativo, Superóxido dismutase-1, Glutathione

SILVA, L.X. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) prevents acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista – Unesp.

Abstract

Doxorubicin (DXO) is effective against different forms of cancer in adults and children, but its use may cause acute and chronic cardiotoxicity associated with increased oxidative stress. Some natural antioxidants have been shown to be effective in minimizing the effects of DXO; however, mate tea (CM), has not been evaluated in this context. Our hypothesis is that CM pretreatment for 30 days, reduces acute oxidative damage in the heart. To test this hypothesis, the effects of daily pretreatment of male Wistar rats at 40 mg / kg m.c. of CM, against acute cardiotoxicity induced by DXO were investigated. For the choice of CM dose, Wistar rats were divided into groups treated with different doses of tea (10, 20 and 40 mg / mc, gavage) (CM + DXO groups). Groups control (C), treated with DXO (DXO) received water (1.0 mL, gavage). The CM + DXO groups received soluble CM diluted in water (8 mg / mL) during the same period. At 29 ° of CM treatment, DXO and CM + DXO groups were given a dose of DXO (15 mg / m.c.-IP). On the 31st day, after administration of lidocaine (4.0 mg / kg mc) thiopental (50 mg / kg mc), all rats were submitted to electrocardiogram (ECG) prior to cardiac puncture (CEUA FOA Authorization: 416 / 2015). Total creatine kinase (CK) and MB fraction (CK-MB) were estimated in plasma. The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), glutathione (GSH), total superoxide dismutase (SOD) activity and the cytoplasmic isoform SOD1, in addition to SOD1 expression, were quantified in the heart homogenate (KCl 1.15% m / v) , Total Akt and p-Akt, by western blotting. Pretreatment with 40 mg / kg m.c. of CM prevented a increased heart rate, prolongation of the QTc and PR interval, increase in plasma CK and CK-MB, and TBARS in the tissue. It also prevented the reduction of GSH, SOD and SOD1. In addition, the increase in the p-Akt / Akt ratio observed after DXO was not observed in rats pretreated at 40 mg / kg m.c. of CM. We conclude that pretreatment with 40 mg / kg m.c. CM prevents acute cardiac oxidative damage induced by DXO, preserving cardiac function.

Key words: Cardiotoxicity, *Ilex paraguariensis*, Oxidative stress, Superoxide dismutase-1, Glutathione

ABREVIATURAS

Akt = proteína quinase B
CAT= catalase
CM = chá mate
CD95 = antígeno de apoptose
CK = creatina quinase
CK-MB = creatina quinase, fração cardíaca
Cu-Zn-SOD = superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
DNA = ácido desoxirribonucleico
DTNB = ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
DXO = doxorubicina
EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético
EO = estresse oxidativo
ERO = espécies reativas de oxigênio
FasL = receptor de morte Fas/ligante
FC = frequência cardíaca
 Fe^{2+} = íon ferroso
 Fe^{3+} = íon férrico
FRAP = *Ferric Reducing Antioxidant Power*
GPx = glutationa peroxidase
GSH = glutationa reduzida
GSSG = glutationa oxidada
 H_2O_2 = peróxido de hidrogênio
HCl = ácido clorídrico
HE = hematoxilina heosina
KCl = cloreto de potássio
KCN = cianeto de potássio
m.c. = massa corpórea
 $MgSO_4$ = sulfato de magnésio
Mn-SOD = superóxido dismutase dependente de magnésio
 N_2 = nitrogênio líquido
 Na_2CO_3 = carbonato de sódio
NaCl = cloreto de sódio
NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
 O_2 = oxigênio molecular
 $O_2^{\cdot-}$ = ânion superóxido
 OH^{\cdot} = radical Hidroxila
SOD = superóxido dismutase
SOD1 = superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
SOD2 = superóxido dismutase dependente de manganês
TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Tris = tris-hidroximetilaminometano
TOP II = topoisomerase II
p53 = proteína supressora de tumor

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismo antitumoral da doxorubicina (SANCHIS, 2010, adaptado).
..... 166
- Figura 2. Mecanismos de apoptose induzida por doxorubicina (ANGSUTARARUX, et al., 2015, adaptado)..... 1717
- Figura 3. Formação de ERO na conversão de DXO-semiquinona a DXO (adaptado de SIMUNEK et al., 2009). SOD – superóxido dismutase; GSH – glutathiona reduzida; GSSG – glutathiona oxidada; NAD(P) – fosfato de nicotinamida; H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; OH· – radical hidroxila; O₂⁻ – ânion superóxido..... 1717
- Figura 4. Visão geral do cronograma de tratamento dos ratos com CM e DXO, fase 1 para escolha da dose de CM..... 233
- Figura 5. Visão geral do cronograma de tratamento dos ratos com CM e DXO, fase 2 para análise dos efeitos da dose de 40 mg/kg m.c. de CM. 244
- Figura 6. Efeito da doxorubicina (DXO) e do chá mate (CM – 40 mg/kg m.c.) na peroxidação lipídica (TBARS) (A) e na glutathiona reduzida (GSH) (B) no homogenato de coração de ratos. Cada coluna representa a média±DP, n=7. a p < 0,05 vs. C; b p < 0,05 vs. DXO..... 322
- Figura 7. Efeito da doxorubicina (DXO) e do chá mate (CM – 40 mg/kg m.c.) sobre a atividade de SOD (A), SOD1 (B), expressão de proteína SOD1 (C) e densidade relativa SOD1 / actina (D) em homogenato de coração de ratos. Cada coluna representa a média ± DP, n=7. a p < 0,05 vs. C; b p < 0,05 vs. DXO. 333
- Figura 8. Alterações histológicas induzidas por DXO em cardiomiócitos (x400). Fotomicrografias dos cortes do ventrículo esquerdo cardíaco coradas com hematoxilina e eosina, representando o grupo controle (A), grupo DXO (B), grupo CM 40 (C) e grupo CM 40 + DXO (D). Núcleos irregulares (flechas grossas). Núcleos apoptóticos (ponta da seta). Áreas de hemorragia (*). (E) representa o número médio de núcleos apoptóticos nos diferentes grupos. As análises foram realizadas em 3 campos diferentes de cada amostra, sendo 10 amostras de cada grupo. Núcleo vesicular normal (seta fina). Cada coluna representa a média ± DP, n=30. a p < 0,05. C; b p < 0,05 vs. DXO.. 344
- Figura 9. Efeito da doxorubicina (DXO) e do chá mate (CM – 40 mg/kg m.c.) sobre a ativação do fator anti-apoptótico Akt total e Akt fosforilada (Akt-p) em homogenato de coração de ratos. Cada coluna representa a média ± DP, n = 8 a p < 0,05 vs. C; b p < 0,05 vs. DXO..... 355

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros do ECG de ratos pré-tratados ou não com diferentes doses de CM	30
Tabela 2 - Atividade plasmática de CK e CK-MB de ratos pré-tratados ou não com diferentes doses de CM	31

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Objetivos.....	21
3	Material e métodos	22
3.1	Produtos químicos.....	22
3.2	Desenho experimental.....	22
3.3	Eletrocardiograma (ECG).....	25
3.4	Avaliação dos indicadores plasmáticos de cardiotoxicidade	25
3.5	Determinação de parâmetros de estresse oxidativo	25
3.5.1	Preparo do homogenato das amostras de coração para os ensaios de SOD e TBARS.....	25
3.5.2	Peroxidação Lipídica pelo método TBARS.....	26
3.5.3	Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).	26
3.5.4	Determinação da glutathiona reduzida (GSH).....	27
3.6	Avaliação do grau de fosforilação da Akt (Ser473) e da síntese de SOD1.....	27
3.7	Análise histopatológica.....	28
3.8	Análise estatística	29
4	Resultados.....	30
4.1	Confirmação da cardiotoxicidade da DXO e determinação da dose de CM com maior efeito cardioprotetor.....	30
4.1.1	ECG.....	30
4.2	Efeitos cardioprotetores do CM em ratos tratados com DXO.....	31
4.3	Antioxidantes enzimáticos	32
4.4	O CM minimiza o efeito cardiotoxíco da DXO	33
4.5	Análise da expressão e ativação de Akt-p/Akt	35
5	Discussão	36
6	Resumo dos principais resultados	40
7	Conclusão.....	41
8	Referências.....	42
9	Anexos.....	50

1 Introdução

O câncer é um importante problema de saúde pública no mundo. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (GLOBOCAN, 2012) foram estimados 14,1 milhões de casos dessa doença em todo o mundo em 2012, destes 7,4 milhões de casos em homens e 6,7 milhões em mulheres. Este número deverá aumentar para 24 milhões até 2035.

No Brasil, para 2016, estimou-se 420.310 casos novos de câncer, excluindo-se os tumores de pele não melanoma, sendo que deste total 12.600 afetariam crianças e adolescentes até os 19 anos (INCA, 2015).

Esses dados tornam-se ainda mais preocupantes, pois a doxorubicina (DXO), fármaco de escolha para o tratamento de muitos tumores, pode induzir cardiotoxicidade aguda em até 40% dos pacientes (OCTAVIA *et al.*, 2012). Quando administrado em crianças e adolescentes pode-se observar o desenvolvimento de cardiomiopatia sintomática em 10% dos tratados, até 15 anos após o término do tratamento (OCTAVIA *et al.*, 2012).

DXO é uma antraciclina produzida por *Streptomyces peucetius var. Caesius*, utilizada como agente quimioterápico no tratamento de diversas formas de câncer, em crianças e adultos, como leucemia, linfomas e tumores de mama (OCTAVIA *et al.*, 2012). Seu mecanismo antitumoral está relacionado principalmente à inibição da replicação, que resulta de sua intercalação na molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA) e consequente inibição da enzima topoisomerase II (TOP II), por meio da formação de um complexo DXO-DNA-TOP II (figura 1). Esse complexo resulta em estresse de torção levando, consequentemente, às várias quebras do DNA (NASCIMENTO & MARTINS, 2005; OZBEN, 2007).

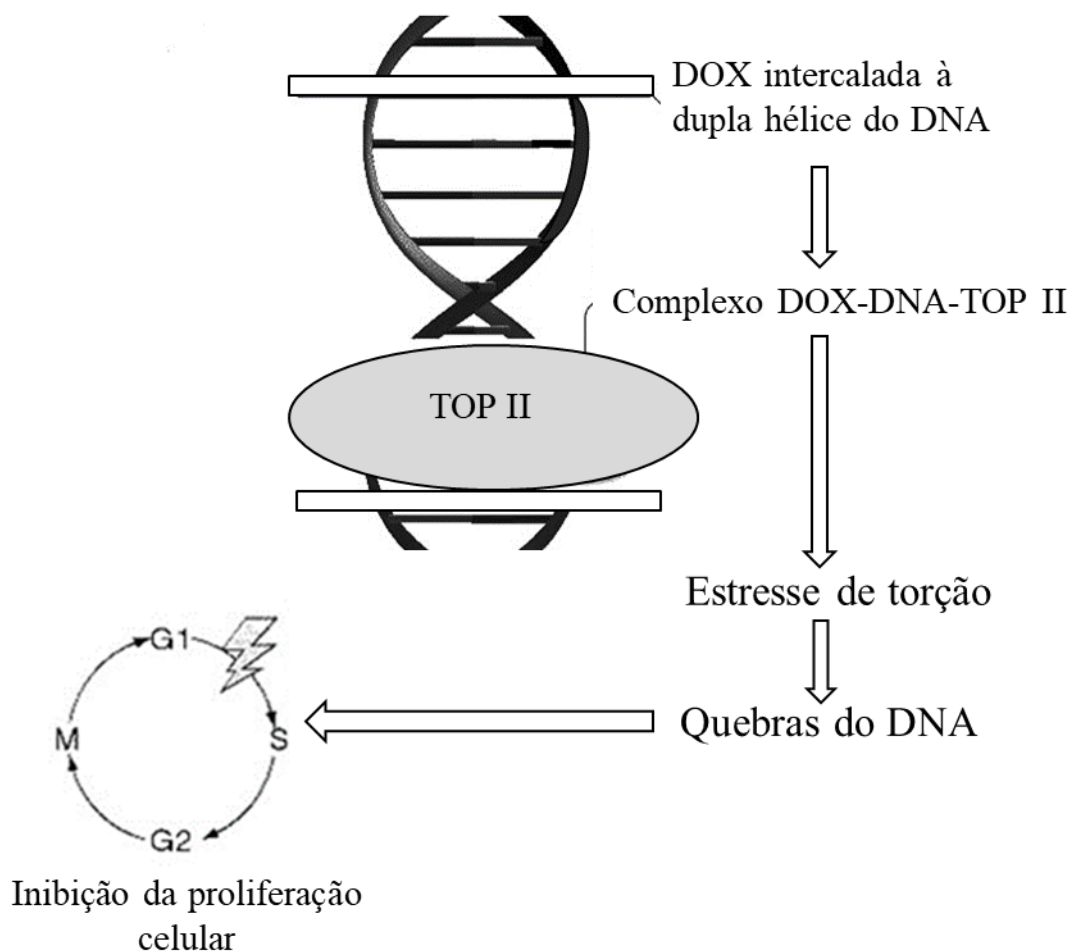


Figura 1. Mecanismo antitumoral da doxorubicina (SANCHIS, 2010, adaptado).

Outros mecanismos também estão relacionados à ação do quimioterápico, dentre eles a indução de apoptose (figura 2) por meio da ativação da proteína supressora de tumor (p53) por ceramida (GRANADOS-PRINCIPAL, *et al.*, 2010; MINOTTI *et al.*, 2004; QUILES *et al.*, 2002; TAKEMURA; FUJIWARA, 2007), da degradação da Akt por proteases de serina e treonina, da liberação de citocromo C mitocondrial, aumento de FasL (receptor de morte Fas/ligante) e síntese de CD95 (antígeno de apoptose 1) (MINOTTI *et al.*, 2004, OZBEN *et al.*, 2007, QUILES *et al.*, 2002 e QUILES *et al.*, 2006).

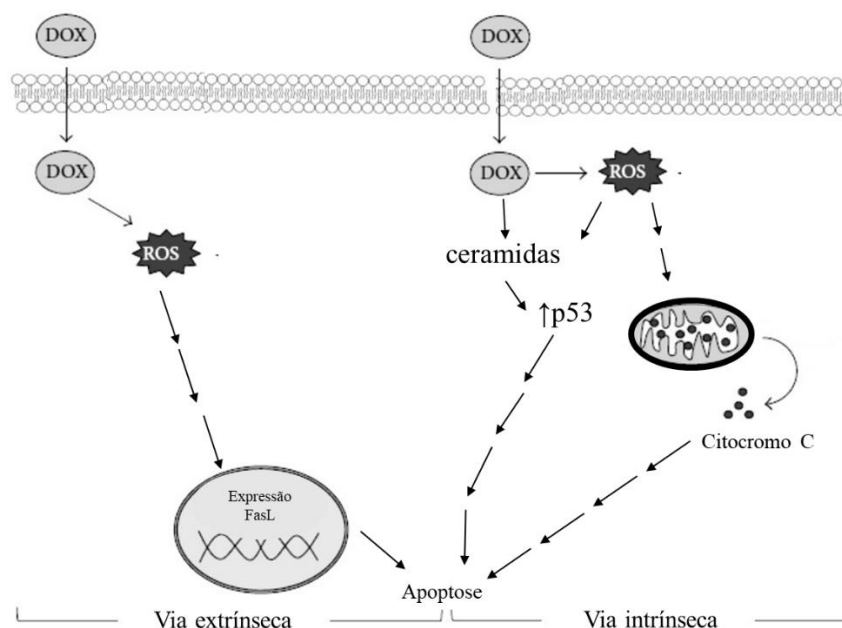


Figura 2. Mecanismos de apoptose induzida por doxorubicina (ANGSUTARARUX, et al., 2015, adaptado)

Além dos mecanismos citados, a DXO leva a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), durante um ciclo redox (figura 3), pela citocromo P-450 redutase, que ativa a NADPH oxidase. Esse processo também é acompanhado pela liberação de ferro intracelular formando complexos DXO- Fe^{3+} (GRANADOS-PRINCIPAL, 2010; MINOTTI *et al.*, 2004).

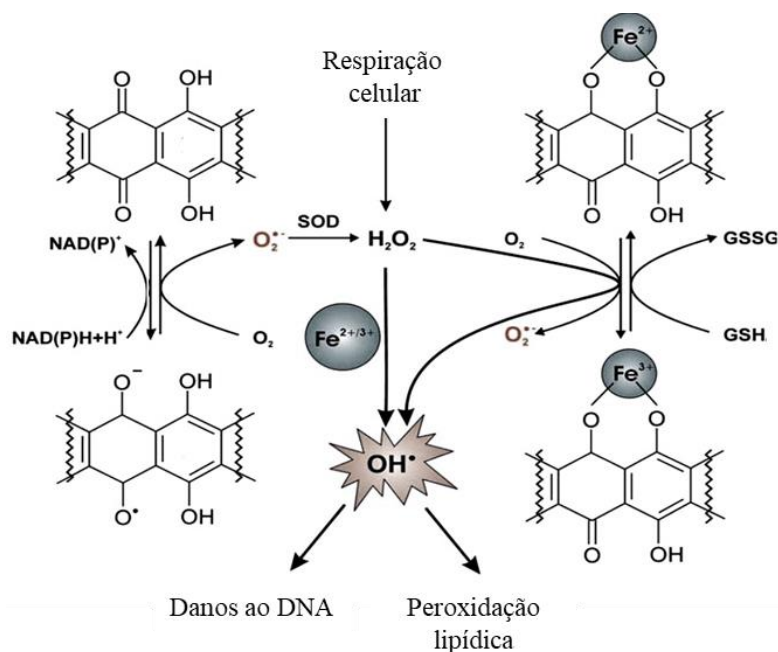


Figura 3. Formação de ERO na conversão de DXO-semiquinona a DXO (adaptado de SIMUNEK et al., 2009). SOD – superóxido dismutase; GSH – glutatona reduzida; GSSG – glutatona oxidada; NAD(P) – fosfato de nicotinamida; H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; OH^\cdot – radical hidroxila; O_2^- – ânion superóxido.

A cardiotoxicidade aguda induzida pela DXO inicia-se dentro das 24 h após sua aplicação (MANTAWY *et al.*, 2014; OCTAVIA *et al.*, 2012) podendo ser observados no eletrocardiograma (ECG) sinais como taquicardia, prolongamento do intervalo QT, arritmia atrial e ventricular (MANTAWY *et al.*, 2014; OCTAVIA *et al.*, 2012). Uma toxicidade crônica induzida por DXO também pode acometer o coração, de forma cumulativa e dose-dependente, podendo resultar em insuficiência cardíaca congestiva (SAEED *et al.*, 2015).

As alterações cardíacas induzidas pela DXO resultam, no aumento do estresse oxidativo (EO). Este aumento de EO é decorrente de maior formação de ERO (SIMUNEK *et al.*, 2009) no ciclo redox (GRANADOS-PRINCIPAL, *et al.*, 2010; MINOTTI, *et al.*, 2004), com a participação de citocromo P₄₅₀ redutase, NADPH desidrogenase mitocondrial ou pela isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (MENNA *et al.*, 2007; MINOTTI *et al.*, 2004). Além disso, a diminuição da defesa antioxidante endógena contribui para o aumento do EO e conseqüentemente para o surgimento de alterações patológicas (MANTAWY *et al.*, 2014; SAEED *et al.*, 2015; OCTAVIA *et al.*, 2012), num tecido já mais propenso à formação de ERO em função do elevado número de mitocôndrias, e conseqüentemente, maior metabolismo aeróbico (MINOTTI *et al.*, 2004).

A defesa antioxidante endógena é constituída por sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático constitui a primeira defesa endógena contra ERO, doando elétrons e estabilizando a reação, para que estas não possam interagir com alvos celulares (ROVER *et al.*, 2001). As enzimas antioxidantes celulares tentam manter dentro da normalidade as quantidades de O₂⁻ (ânion superóxido) e de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), evitando assim a formação excessiva de OH^{*} (radical Hidroxila) altamente reativo e deletério (FERREIRA, MATSUBARA, 1996; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). A DXO leva a uma redução da ação de enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx) (DANZ *et al.*, 2009; NASCIMENTO & MARTINS, 2005) nos cardiomiócitos, o que contribui para o aumento do dano oxidativo e para a cardiotoxicidade (MINOTTI *et al.*, 2004).

SOD compreende uma família de enzimas encontradas em diferentes tecidos e compartimentos celulares, que requerem diferentes íons metálicos

como grupamentos prostéticos, sendo identificadas como isoformas diferentes segundo esses grupamentos. A Cu-Zn-SOD (SOD1) está presente no citoplasma e no espaço entre as membranas da mitocôndria. A Mn-SOD (SOD2) requer manganês e exerce sua ação catalítica na matriz mitocondrial. Essa família de enzimas tem papel fundamental na defesa antioxidante do organismo, onde o $O_2^{\cdot-}$ é dismutado a H_2O_2 (SERRA *et al.*, 2003), que pode reagir com metais de transição, como cobre ou ferro, resultando na formação de OH^{\cdot} . Reduções nas atividades destas isoenzimas vêm sendo associadas aos danos cardíacos (LI *et al.*, 1995). Hipertrofia, fibrose e necrose do miocárdio decorrentes da DXO foram associadas a redução, mesmo que pouco pronunciada, dessas isoenzimas (LOCH *et al.*, 2009).

O uso da DXO também está relacionado à diminuição da glutathiona reduzida (GSH) o sangue e tecidos, com conseqüente aumento da injúria tecidual (KHAN, *et al.*, 2014). A GSH é um antioxidante não enzimático que possui em sua estrutura um grupamento sulfidril, que participa do processo da detoxificação de ERO, principalmente do H_2O_2 (PARVEZ *et al.*, 2006).

A cardiomiopatia induzida por DXO é um importante problema de saúde pública (OCTAVIA *et al.*, 2012), portanto, compostos que possam reduzir os efeitos tóxicos enquanto mantêm e/ou aumentam sua atividade antitumoral, irão beneficiar o sucesso do seu uso na clínica (WANG *et al.*, 2012). Frente ao envolvimento do EO na cardiotoxicidade induzida pela DXO, trabalhos têm sido conduzidos com antioxidantes naturais como estratégias capazes de prevenir ou reduzir os danos oxidativos dessa droga. O chá verde (*Camelia sinensis*) e seu principal bioativo antioxidante, a epigalocatequina-3-galato, foram eficazes em reduzir os danos cardíacos associados à DXO, por suprimirem o EO, reduzirem a apoptose e ativarem vias de sinalização que aumentam a sobrevivência das células (SAEED, *et al.*, 2015). A sesamina, uma lignina extraída das sementes de gergelim (*Sesamum indicum*), também foi capaz de reduzir o dano oxidativo cardíaco promovido pela DXO, por restaurar a expressão da SOD2 (SU, *et al.*, 2014). Resultados semelhantes foram observados após o tratamento com resveratrol, um polifenol presente nas sementes de uva e amplamente utilizado para reduzir o EO (MENG *et al.*, 2014; YUN *et al.*, 2012).

Os antioxidantes naturais do chá mate (CM), têm capacidade de neutralizar ERO *in vivo* e *in vitro* (MATSUMOTO *et al.*, 2009) e podem aumentar

a defesa antioxidante enzimática em diferentes condições (MATSUMOTO *et al.*, 2009; PEREIRA, *et al.*, 2017; TIRAPELI, 2014), porém não há relatos, até o momento, dos efeitos do CM sobre a cardiotoxicidade aguda induzida por DXO.

Essa bebida é preparada por infusão das folhas de *Ilex paraguariensis*, também conhecida como Erva Mate, uma espécie nativa de países da América do Sul como Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai, onde é amplamente consumida. Com elevado poder antioxidante atribuído ao ácido clorogênico e seus derivados (HECK; MEJLA, 2007), o CM apresenta capacidade antioxidante equivalente ou superior às das vitaminas C e E, consideradas padrões para essa propriedade (CHANDRA; MEJIA, 2004; GUGLIUCCI; MENINI, 2002; SCHINELLA *et al.*, 2000; VINSON; DABBAGH, 1998).

O CM também demonstra capacidade antioxidante *in vitro* superior à do chá verde, obtido de *Camellia sinensis* (BASTOS *et al.*, 2007). Além disso, esse chá aumenta a atividade e/ou expressão das enzimas antioxidantes SOD e GPx (ARÇARI *et al.*, 2009; MATSUMOTO *et al.*, 2009; SCOLARO *et al.*, 2012; YEN, *et al.*, 1996), porém não há relatos na literatura sobre sua ação na isoenzima SOD1.

Além de reduzir o EO resultante de uma série de condições, como envelhecimento e perimenopausa (PEREIRA, *et al.*, 2017; TIRAPELI, 2014), o CM tem ação anti-inflamatória (DE MENESES FUJII, T.M. *et al.*, 2014, PUANGPRAPHANT & MEJIA, 2009), hipocolesterolêmica (BOAVENTURA *et al.*, 2012; MOSIMANN *et al.*, 2006), vasodilatadora (LUNCEFORD; GUGLIUCCI, 2005; STEIN *et al.*, 2005) e cardioprotetora (SCHINELA *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2008). Também inibe a topoisomerase II e conseqüentemente induz à apoptose em células de carcinoma oral, do cólon humano e de mama, (MEJIA, *et al.*, 2010; ZAPATERINI, *et al.*, 2010).

Com base na comprovada capacidade do CM em melhorar a defesa antioxidante enzimática, reduzir o dano oxidativo tecidual, e na possibilidade de utilização de antioxidantes para reduzir a toxicidade da DXO sem interferir na atividade antineoplásica (MINOTTI *et al.*, 2004; SAEED *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2014), o presente estudo teve como hipótese que o pré-tratamento de ratos com CM previne a cardiotoxicidade aguda induzida por DXO.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar um possível efeito protetor do CM contra a cardiotoxicidade aguda induzida por DXO em ratos.

2.2. Objetivos específicos

a. Determinar a dose para o pré-tratamento com CM (10, 20 ou 40 mg/kg m.c.) que previne as alterações do ECG e dois marcadores plasmáticos de dano cardíaco, creatina quinase total (CK) e fração cardíaca (CK-MB), em ratos que receberam dose única de DXO (15 mg/kg m.c.).

b. Verificar se o pré-tratamento com CM na dose escolhida previne as alterações histopatológicas no tecido cardíaco, resultantes da DXO.

c. Investigar se o pré-tratamento com CM reduz os danos oxidativos lipídicos no tecido cardíaco, resultantes da DXO.

d. Avaliar a defesa antioxidante enzimática (SOD total e SOD1) e a expressão proteica de SOD1 de ratos tratados com DXO, pré-tratados ou não CM.

e. Quantificar a concentração de GSH no homogenato do coração, para avaliar o efeito do pré-tratamento com CM na defesa antioxidante não enzimática.

f. Verificar a proporção de Akt expressa pela sua forma ativa (p-Akt) no homogenato do coração de ratos tratados com DXO, com ou sem o pré-tratamento com CM.

3 Material e métodos

3.1 Produtos químicos

Mate na forma de pó solúvel da marca Leão Jr. ® (Curitiba, PR, Brasil), lote número 7891098000088, foi utilizado para o tratamento dos ratos. A DXO foi utilizada na forma de cloridrato, nome comercial Rubidox, laboratório Bergamo Ltda (Taboão da Serra-SP, Brasil). Nos ensaios para a determinação da expressão de proteínas, foram usados anticorpo de coelho para SOD-1 (sc 11407), Akt e p-Akt (Ser 473) na diluição 1:1000, obtidos da Santa Cruz (Aachen, Alemanha). Para β -actina anticorpo primário na diluição 1:1000 foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, Cruz Biotechnology, Dallas, EUA). Os outros produtos químicos utilizados neste estudo foram de grau analítico.

3.2 Desenho experimental

Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista-UNESP (Permissão CEUA FOA: 416/2015). Foram obtidos do biotério central da Unidade *Rattus norvegicus albinus* Wistar machos, adultos, com média de massa corpórea (m.c.) de 250 ± 20 g. Durante o período de aclimação e experimental os ratos permaneceram em caixas plásticas (n = 4/caixa) em sala com temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C, ciclo claro/escuro 12/12 h e umidade relativa de $55 \pm 10\%$. O acesso à água e à ração foi livre, e os consumos acompanhados semanalmente, bem como a m.c. Para evitar variações na ingestão de antioxidantes, utilizou-se o mesmo lote de ração padrão para roedores, marca Purina-Labina®, Brasil, desde o período de aclimação (sete dias) até o final do experimento.

Inicialmente, para a determinação da dose de CM com maior efeito cardioprotetor, após o período de aclimatação, os ratos foram separados sem adoção de nenhum critério em cinco grupos: controle (C), doxorubicina (DXO), pré-tratados com CM mais dose única de DXO (CM + DXO). Os grupos C e DXO receberam 1,0 mL de água por gavagem durante 30 dias consecutivos. Os grupos CM + DXO receberam por gavagem, durante os mesmos 30 dias consecutivos, CM em pó solúvel diluído em água nas doses de 10 mg/kg m.c. (CM10 + DXO), 20 mg/kg m.c. (CM20 + DXO) ou 40 mg/kg m.c. (CM 40+ DXO) em volume máximo de 1,0 mL. No 29º dia de tratamento, como descrito por SAEED *et al.* (2015), os grupos DXO e CM + DXO receberam por via intraperitoneal única dose do quimioterápico diluído em água (15 mg/kg m.c.). O desenho experimental pode ser observado na figura 4.

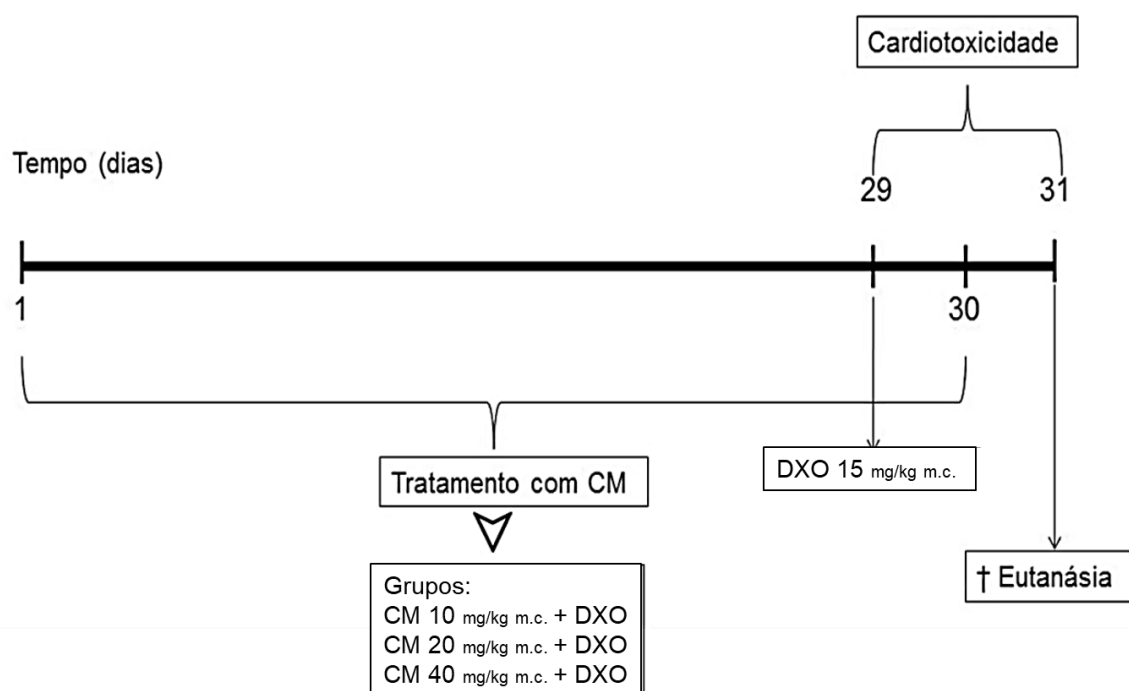


Figura 4. Visão geral do cronograma de tratamento dos ratos com CM e DXO, fase 1 para escolha da dose de CM.

Vinte e quatro horas após o último tratamento com CM (31º dia) e após jejum de 12 horas, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50

mg/kg m.c.) e lidocaína (4,0 mg/kg m.c.) antes da realização do ECG. Após o exame o sangue foi coletado por punção cardíaca e 5,0 mL foram transferidos para tubos heparinizados, centrifugados a 1.000 x g a 4° C, durante 15 min. O plasma foi removido e congelado a -80° C até à análise. Após a exsanguinação foi aplicado no animal NaCl 0,9 % (m/v) gelado, para a eliminação de restos de sangue, antes da remoção do coração e obtenção das amostras do ventrículo esquerdo, que foram transferidas rapidamente para o nitrogênio líquido e posteriormente para -80° C.

A melhor dose de CM para a proteção cardíaca (40 mg/kg m.c.) determinada na fase 1 foi utilizada na 2ª fase do estudo. Sendo assim, 40 ratos Wistar machos, na mesma faixa de m.c., foram divididos, sem adoção de nenhum critério em quatro grupos: controle (C), doxorrubicina (DXO), CM 40 e CM 40 + DXO. Exceto para o grupo CM 40, que recebeu 40 mg/kg m.c./dia de CM em água por gavagem, o tratamento dos grupos C, DXO e CM 40 + DXO foi o mesmo descrito anteriormente (figura 5).

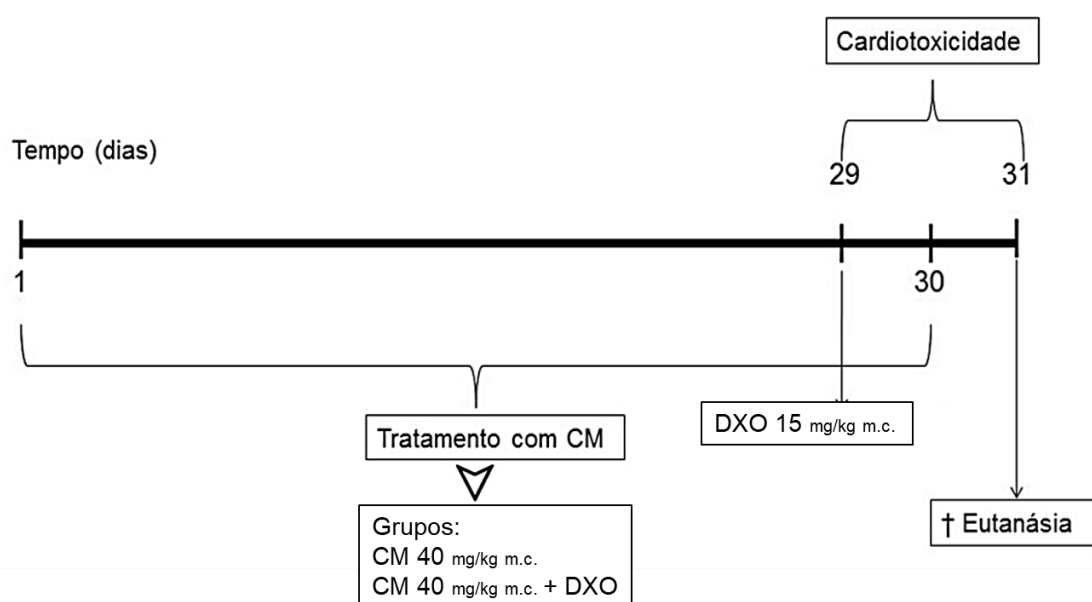


Figura 5. Visão geral do cronograma de tratamento dos ratos com CM e DXO, fase 2 para análise dos efeitos da dose de 40 mg/kg m.c. de CM.

3.3 Eletrocardiograma (ECG)

O ECG foi realizado com equipamento Biopac Student Lab (BIOPAC Systems, Inc.). Os eletrodos de agulha foram inseridos sob a pele nos membros superiores e inferiores na posição II (membro anterior direito para o membro traseiro esquerdo). Cada gravação durou cinco minutos, com velocidade de 50 mm/s e tensão de 1 mv/cm. O ruído foi minimizado por um filtro digital. A análise das ondas do ECG foi feita para calcular o intervalo QT (ms), que foi corrigido para a frequência cardíaca usando a fórmula de Bazett [$QT_c = \frac{1}{4} \frac{QT}{\sqrt{RR}}$], e PR intervalo (ms) (MANTAWY *et al.*, 2014). Para a realização do ECG, determinação e análise dos parâmetros contou-se com uma cardiologista habilitada e com vasta experiência na área.

3.4 Avaliação dos indicadores plasmáticos de cardiotoxicidade

A atividade plasmática de CK foi determinada por método cinético (Kit Labtest, CK-NA Liquiform, MG, Brasil). O procedimento realizado em duplicata, foi o descrito pelo fabricante e as análises foram realizadas com o auxílio de analisador bioquímico semiautomático modelo BIO-2000 (Bioplus, SP, Brasil), após calibração prévia com o controle. Para a determinação da fração MB, foi utilizado Kit comercial do mesmo fabricante (CK-MB Liquiform, Labtest, MG, Brasil) baseado na mesma técnica, porém contendo anticorpos que inibiram totalmente a fração muscular (CK-MM) da enzima.

3.5 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

3.5.1 Preparo do homogenato das amostras de coração para os ensaios de SOD e TBARS.

Imediatamente antes das análises amostras do tecido cardíaco foram descongeladas e homogeneizadas com KCl 1,15 (m/v), na proporção 1:5 (m/v), com auxílio de homogeneizador de vidro tipo *Potter-Elvehjem* (378 x g durante 40 s), como descrito em Kumral, *et al.* (2015). Posteriormente foi realizada centrifugação (1.000 x g, a 4° C, 10 min.) e o sobrenadante, denominado de homogenato, coletado para as análises. A proteína foi quantificada com base no método descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina bovina 0,1% (m/v) como padrão.

3.5.2 Peroxidação Lipídica pelo método TBARS

No homogenato a peroxidação lipídica foi avaliada por meio da determinação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (BUEGE, AUST, 1978). O método consiste em adicionar ácido tricloroacético 10% (m/v) à amostra, para promover acidificação e precipitação das proteínas. Após centrifugação (1.000 x g, 3 min) o sobrenadante é coletado e recebe ácido tiobarbitúrico 0,67% (m/v), ficando incubado por 15 minutos a 100° C, para então a reação ser resfriada, antes da verificação absorvância. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar apropriado ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As absorvâncias foram determinadas em 660 nm, em leitora Power Wave 340-Biotek.

3.5.3 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).

A atividade de SOD total foi avaliada com base na inibição da reação do $\text{O}_2^{\cdot -}$ com pirogalol (MARKLUND, 1985, adaptado por SONI *et al.*, 2014). A oxidação do pirogalol foi determinada espectrofotometricamente em 420 nm,

utilizando-se 20 μL de amostra. O meio de reação continha tampão Tris 50 mmol/L (pH 8,2) e 24 mmol/L de pirogalol. A quantidade de enzima necessária para promover 50% de inibição de auto oxidação do pirogalol foi considerada como uma unidade de atividade enzimática. Os resultados foram expressos em unidades de SOD/min/mg proteína. A atividade de SOD1 foi estimada após a sua inibição por KCN (150 mmol/L). Segundo Fridovich (1975) e como descrito em Soni (2014), 2 mmol/L de KCN inibem a SOD1, mantendo a atividade de SOD2 inalterada. Sendo assim, ao calcularmos a % de inibição na presença do KCN estaremos determinando a SOD2, sendo a diferença numérica equivalente a atividade de SOD1.

3.5.4 Determinação da glutathiona reduzida (GSH).

Para a determinação de GSH, o homogenato de coração foi preparado com HCl (2 mol/L) e EDTA (2 mmol/L), na proporção de 1:5 (m/v), com homogeneizador de vidro tipo *Potter-Elvehjem* (378 x g durante 40 s, em banho de gelo), e centrifugado durante 20 minutos a 1.000 x g. O sobrenadante foi incubado com 2 mL de tampão de fosfato a 300 mmol/L (pH 7,4) e 200 μL de DTNB (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico). A variação na absorvância foi monitorada a 412 nm e a concentração de GSH calculada utilizando um coeficiente e extinção de $13,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (BEUTLER *et al.*, 1963).

3.6 Avaliação do grau de fosforilação da Akt (Ser473) e da síntese de SOD1.

As amostras do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas com Polytron (32.000 x g durante 10 s) em 2 mL de tampão de extração e mantidas em banho-

maria (100°C) durante 10 min, e então centrifugadas a 16.000 x g por 40 min, a 4°C. Foi determinada a concentração proteica no sobrenadante pelo método de Lowry *et al.* (1951) do sobrenadante, 185 µg de proteína foram fervidas por 4 min em tampão de Laemmli e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), na concentração de 8% m/v para Akt, p-Akt e 10% para SOD1 e B-actina (LAEMMLI, 1970, modificado por GARFIN, 1990) (Bio Rad Mini-Protean, Bio Rad Laboratories, Richmond, CA. EUA), voltagem de 30 mV para empacotamento, e 100 V para corrida, por 2 horas. Um padrão de proteínas de pesos moleculares conhecidos foi utilizado. Após a corrida foi feita a transferência (KRUGER; HAMMOND, 1988) para uma membrana de nitrocelulose Hybond-C Super (GE Healthcare Buckinghamshire, Germany) e bloqueio com solução basal (SB) e 5% m/v de leite em pó desnatado e incubação em SB com 3% (m/v) de leite em pó desnatado durante uma noite e com o anticorpo primário de coelho para Akt, ou p-Akt ou SOD1 ou B-actina (1: 1000) a 4° C, e em seguida incubação com anticorpo secundário de coelho (1:10000) por 1 hora, e com substratos imunorreativos por 1 min (“kit” de quimioluminescência – ECL – GE Healthcare Buckinghamshire, Alemanha), revelados e fixados com GBX (Kodak Brasileira, São Paulo, Brasil). A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria óptica, como auxílio do programa Scion Image (Scion Image-Release Beta 3b, NIH, Frederick, MD, EUA).

3.7 Análise histopatológica

Para averiguar a existência de desarranjos estruturais no miocárdio, resultantes da ação da DXO, foi realizada secção coronal do ventrículo esquerdo dos animais (SAEED *et al.*, 2015). Os cortes foram fixados em 10% (m/v) de

formalina tamponada durante 48 h e embebidos em parafina. Seções de 5 μm de espessura foram cortadas e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Nas alterações patológicas identificadas por HE foram considerados o desarranjo miofibrilar, núcleos apoptóticos, estrutura do miocárdio e as mudanças infiltrativas (SEGREDO *et al.*, 2014). Para captação e análise das imagens foi utilizado microscópio de luz (AxioImager A1; ampliação 400 x) ligado a uma câmara de vídeo digital (Zeiss Vision) e a um computador equipado com software analisador de imagem (Axio VisãoRel versão 4.3, Carl Zeiss).

3.8 Análise estatística

Todos os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão da média (DP) e mostraram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov). As comparações entre os grupos foram feitas usando *one way* ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 Resultados

4.1 Confirmação da cardiotoxicidade da DXO e determinação da dose de CM com maior efeito cardioprotetor

4.1.1 ECG

A frequência cardíaca (FC) do grupo DXO foi 22,7% maior ($p < 0,0001$) quando comparada ao grupo controle (Tab. 1) e aproximadamente 13% ($p < 0,0001$) menor nos grupos pré-tratados com 20 e 40 mg/kg m.c. de CM, em comparação ao grupo DXO. Em comparação ao controle foi observado um prolongamento ($p < 0,0001$) dos intervalos QTc e PR no grupo DXO, resultado que foi prevenido com o pré-tratamento com CM na dose de 40 mg/kg m.c.

Tabela 1. Parâmetros do ECG de ratos pré-tratados ou não com diferentes doses de CM

Tratamento	FC (bat/min)	PR interval (ms)	QTc interval (ms)
Controle	247,7±15,39	61.57±1.90	196.6±20.70
DXO (15 mg/kg m.c.)	304,9±26,01 ^a	81.75±2.25 ^a	234.4±15.38 ^a
CM (10 mg/kg m.c.) + DXO	302,3±11,70 ^a	80.40±2.99 ^a	230.5±12.20 ^a
CM (20 mg/kg m.c.) + DXO	265,0±17,18 ^{b, c}	66.25±5.69 ^{b,c}	217.60±13.92 ^a
CM (40 mg/kg m.c.) + DXO	264,5±19,16 ^{b, c}	64.0±3.94 ^{b,c}	204.3±19.59 ^{b,c}

Média±DP, n=7; grupo: a $p < 0,05$ vs. C; b $p < 0,05$ vs. DXO; c $p < 0,05$ vs. CM10 + DXO.

4.1.2 Marcadores bioquímicos de cardiotoxicidade

As atividades de CK e CK-MB foram significativamente maiores ($p < 0,05$) no plasma do grupo DXO, em comparação com o controle (Tab. 2). O CM na dose de 40 mg/kg m.c. exerceu o efeito cardioprotetor mais adequado, sendo essa dose a adotada nos estudos adicionais (fase 2).

Tabela 2. Atividade plasmática de CK e CK-MB de ratos pré-tratados ou não com diferentes doses de CM

Tratamento	CK (U/L)	CK-MB (U/L)
Controle	95,6±11,0	60,9±9,8
DXO (15 mg/kg m.c.)	147,2±3,9 ^a	139,6±8,0 ^a
CM (10 mg/kg m.c.) + DXO	143,9±16,0 ^a	132,8±1,8 ^a
CM (20 mg/kg m.c.) + DXO	117,8±6,6 ^{a,b,c}	114,7±16,2 ^{a,b,c}
CM (40 mg/kg m.c.) + DXO	99,67±9,4 ^{b,c,d}	86,7±4,2 ^{a,b,c,d}

Média±DP, n=7. a p < 0,05 vs. C; b p < 0,05 vs. DXO; c p < 0,05 vs. CM 10 + DXO e d p < 0,05 vs. CM 20 + DXO.

4.2 Efeitos cardioprotetores do CM em ratos tratados com DXO

O pré-tratamento com CM previne o aumento EO induzido por DXO. Após a determinação da dose cardioprotetora de CM (40 mg/kg m.c), foram avaliados os marcadores de estresse oxidativo TBARS e GSH (Fig. 6) percebida por valores de TBARS 83,5% maiores no grupo DXO, comparado ao controle. Menores concentrações de TBARS (56%, p < 0,0001) foram observadas no grupo pré-tratado com CM, em relação ao DXO. Quando comparados os valores de TBARS dos grupos CM e C, concentrações inferiores desse parâmetro (20%, p < 0,0001) foram observadas no primeiro grupo.

A DXO levou a uma depleção de 34% (p < 0,0001) de GSH cardíaco quando comparado ao grupo C. No grupo CM + DXO a concentração da GSH foi 38,2% (p < 0,0001) maior em relação ao DXO. Com o tratamento apenas com o CM a concentração de GSH foi 26% (p < 0,05) maior quando comparado ao grupo C.

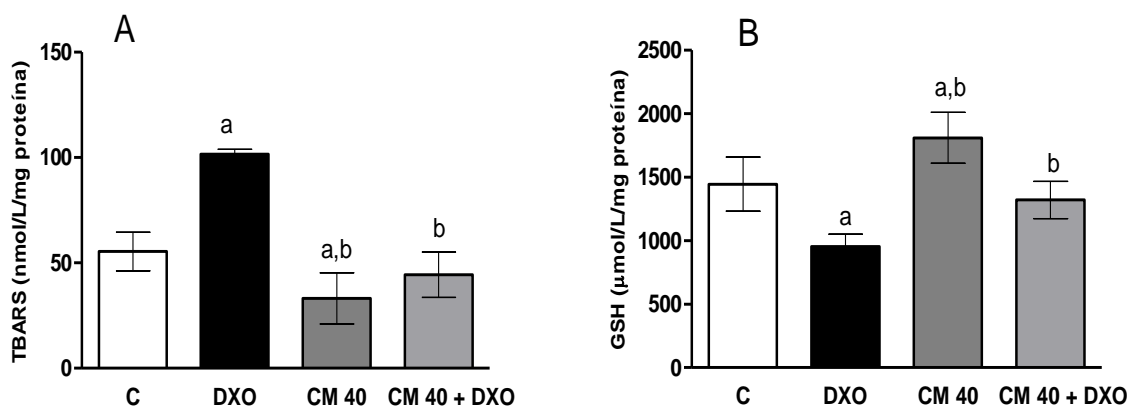


Figura 6. Efeito da doxorubicina (DXO) e do chá mate (CM – 40 mg/kg m.c.) na peroxidação lipídica (TBARS) (A) e na glutatona reduzida (GSH) (B) no homogenato de coração de ratos. Cada coluna representa a média±DP, n=7. a $p < 0,05$ vs. C; b $p < 0,05$ vs. DXO.

4.3 Antioxidantes enzimáticos

Foram avaliados no homogenato do coração a atividade total de SOD e a atividade de SOD1 (Fig. 7). A atividade de SOD total foi 48,5% ($p < 0,0001$) menor em DXO, em relação ao grupo C. Já SOD1 foi 45,3% ($p < 0,0001$) no DXO, comparado ao Controle. No grupo CM as atividades de SOD e SOD1 foram respectivamente 72,4% ($p < 0,05$) e 40,0% ($p < 0,0001$) maior do que observado no Controle. Após o pré-tratamento com CM a atividade de SOD total e SOD1 foi de 80,7% e de 13% ($p < 0,0001$), respectivamente, maior que o grupo DXO.

Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre o controle e o grupo DXO, a expressão da proteína SOD1 foi 42% ($p < 0,0001$) maior no grupo CM quando comparada ao grupo controle (Fig. 7 C), porém 25,4% ($p < 0,05$) menor após a aplicação de DXO (CM vs. CM 40 + DXO).

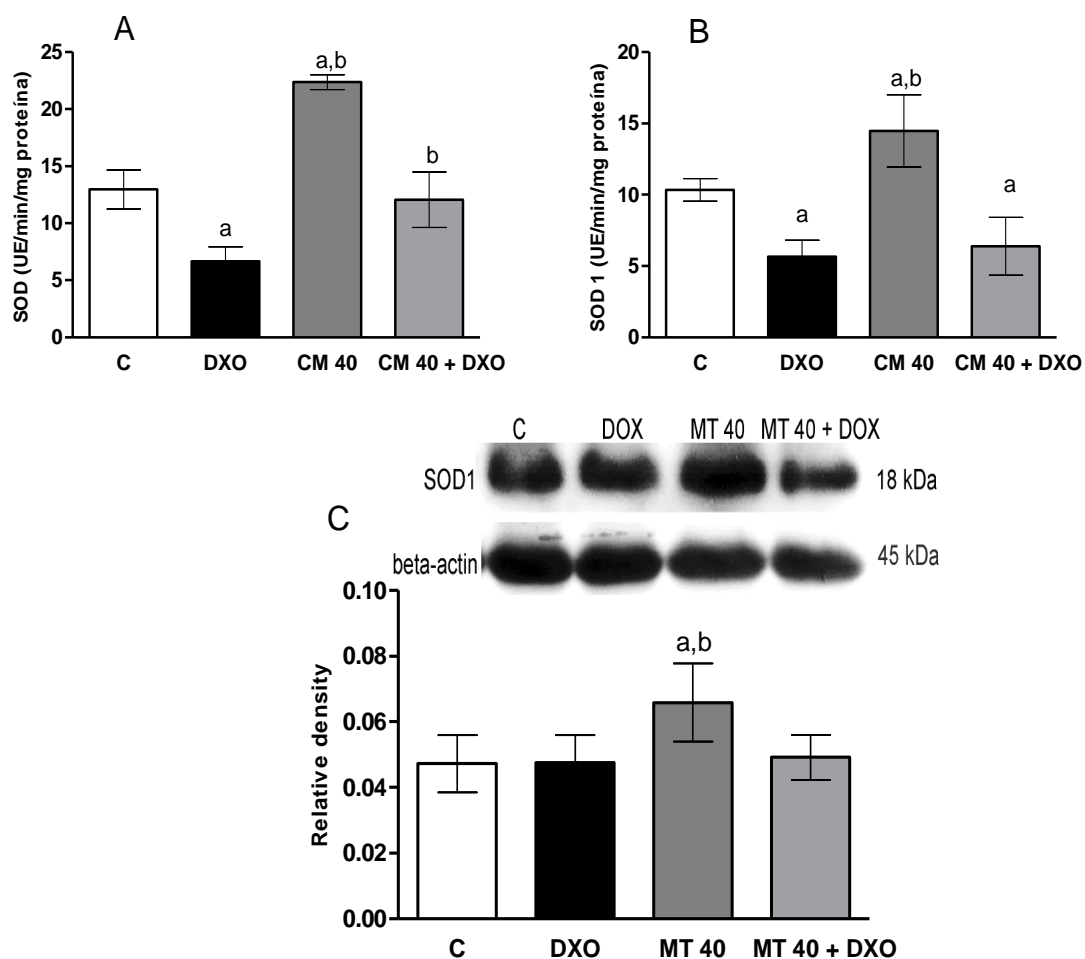


Figura 7. Efeito da doxorrubicina (DXO) e do chá mate (CM – 40 mg/kg m.c.) sobre a atividade de SOD (A), SOD1 (B), expressão de proteína SOD1 (C) e densidade relativa SOD1 / actina (D) em homogenato de coração de ratos. Cada coluna representa a média \pm DP, n=7. a $p < 0,05$ vs. C; b $p < 0,05$ vs. DXO.

4.4 O CM minimiza o efeito cardiotoxico da DXO

Uma arquitetura normal dos feixes de músculo cardíaco foi observada nos grupo C e tratados com CM (Fig. 8 A e C), não sendo observadas alterações histopatológicas. Danos extensos no miocárdio com hialinização, infiltrado inflamatório associado ao sangramento entre os feixes miocárdicos foram constatados no grupo DXO (Fig. 8 B). Em contraste, o pré-tratamento com CM protegeu a estrutura do tecido contra alterações patológicas induzidas pelo

quimioterápico (Fig. 8 D). A contagem de núcleos apoptóticos no grupo DXO foi 72 % maior quando comparado aos grupos C e tratados com CM (Fig. 8 E).

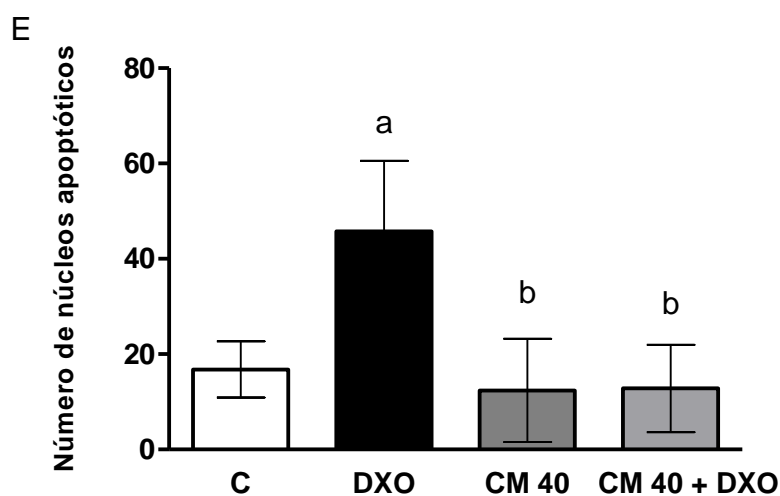
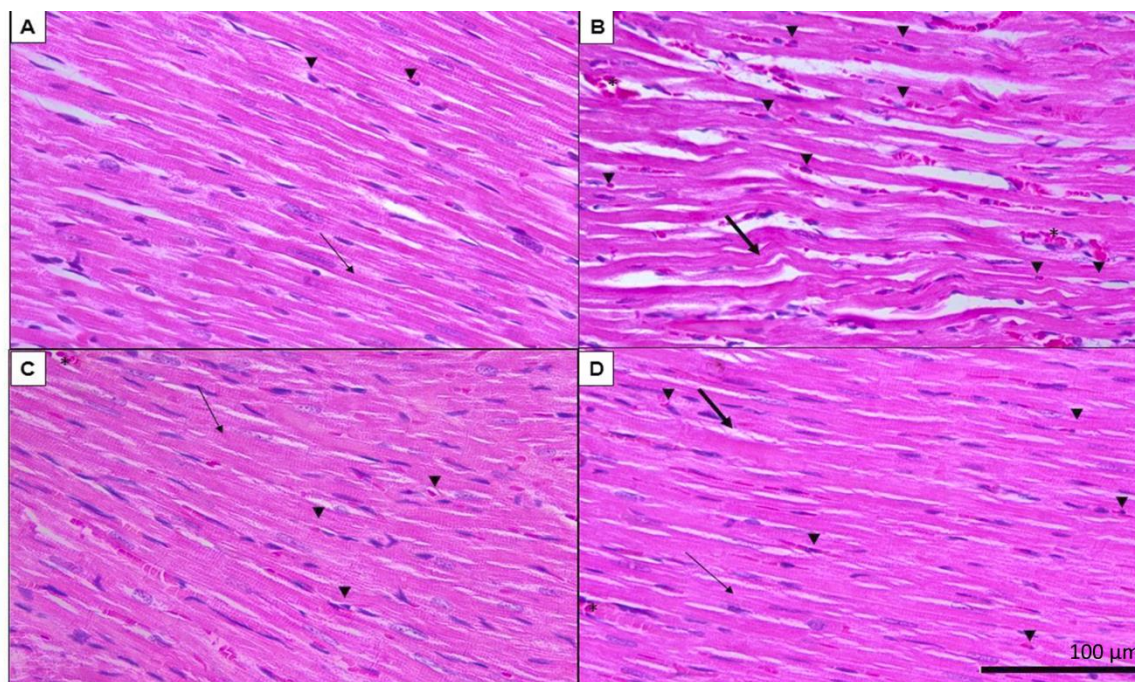


Figura 8. Alterações histológicas induzidas por DXO em cardiomiócitos (x400). Fotomicrografias dos cortes do ventrículo esquerdo cardíaco coradas com hematoxilina e eosina, representando o grupo controle (A), grupo DXO (B), grupo CM 40 (C) e grupo CM 40 + DXO (D). Núcleos irregulares (flechas grossas). Núcleos apoptóticos (ponta da seta). Áreas de hemorragia (*). (E) representa o número médio de núcleos apoptóticos nos diferentes grupos. As análises foram realizadas em 3 campos diferentes de cada amostra, sendo 10 amostras de cada grupo. Núcleo vesicular normal (seta fina). Cada coluna representa a média \pm DP, n=30. a $p < 0,05$. C; b $p < 0,05$ vs. DXO.

4.5 Análise da expressão e ativação de Akt-p/Akt

A DXO causa uma maior fosforilação da Akt (48,6%, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo C (Fig. 9), em contraste, o pré-tratamento com CM ativa 25,24% ($p < 0,05$) menos a Akt, em comparação ao grupo DXO. Não houve diferença significativa entre o grupo C e os grupos tratados com CM.

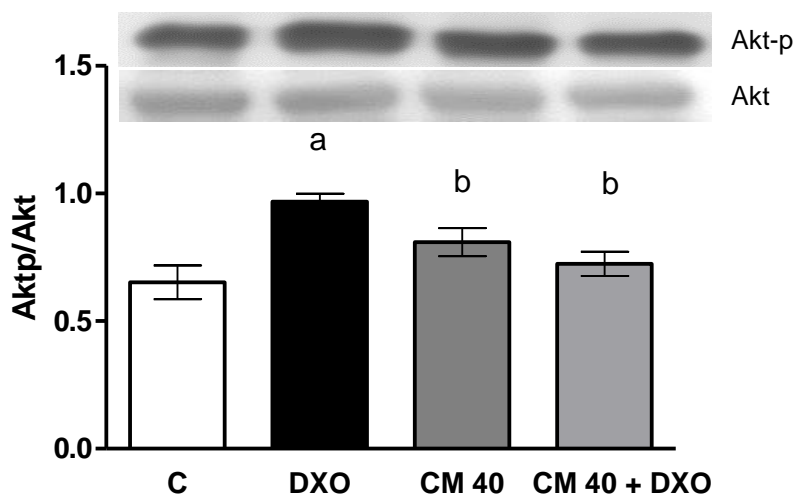


Figura 9. Efeito da doxorubicina (DXO) e do chá mate (CM – 40 mg/kg m.c.) sobre a ativação do fator anti-apoptótico Akt total e Akt fosforilada (Akt-p) em homogenato de coração de ratos. Cada coluna representa a média \pm DP, $n = 8$ a $p < 0,05$ vs. C; b $p < 0,05$ vs. DXO.

5 Discussão

O presente estudo avaliou o efeito potencial de proteção do CM sobre a cardiotoxicidade aguda induzida por DXO em ratos. A cardiotoxicidade foi avaliada por ECG, análise bioquímica sérica dos indicadores de lesão cardíaca CK e CK-MB, e análise histopatológica do miocárdio. O aumento do estresse oxidativo decorrente da maior geração de ERO durante a reoxidação da DXO-semiquinona à DXO (MINOTTI *et al.*, 2004) é considerado como a principal causa de cardiotoxicidade induzida pelo quimioterápico (SAEED *et al.*, 2015), e sendo assim, foram também avaliados o dano oxidativo lipídico, componentes das defesas antioxidantes enzimática e não enzimática. Verificou-se que o pré-tratamento com CM pode ser utilizado para prevenir os efeitos agudos da DXO no coração de ratos.

Neste estudo, inicialmente, as alterações do ECG confirmaram a cardiotoxicidade induzida por DXO (JIANG *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2016; SAEED *et al.*, 2015). A dose única de 15 mg/kg m.c. do fármaco induziu a várias alterações no ECG incluindo taquicardia, prolongamento dos intervalos QTc e PR, já descritas (MANTAWAY *et al.*, 2014; SAEED *et al.*, 2015; SU *et al.*, 2014).

A presença do dano cardíaco foi reforçada pelo aumento nas concentrações plasmáticas de CK e CK-MB. Essas enzimas atuam como moduladoras do reservatório de energia em células musculares, convertendo a creatina em fosfocreatina, utilizando ATP como substrato. São utilizadas como indicadores da atividade muscular e da integridade de membrana, sendo a isoforma MB a mais expressa no músculo cardíaco (ABU-ELSAADA *et al.*, 2015). A maior concentração dessas enzimas no plasma após a dose única de DXO também foi descrita por outros autores (JIANG *et al.*, 2008, SAEED *et al.*, 2015)

e associada à vulnerabilidade cardíaca ao estresse oxidativo subjacente à cardiomiopatia induzida pelo quimioterápico (ABU-ELSAADA *et al.*, 2015). O pré-tratamento com 40 mg/kg m.c. de CM foi o mais eficaz na prevenção do dano ao miocárdico, promovendo menor grau de lesão (CK e CK-MB normal no plasma) e a normalização de todos os parâmetros do ECG avaliados. Essa é provavelmente a primeira evidencia do efeito cardioprotetor do CM em ratos tratados com DXO. Outros antioxidantes naturais, tais como epigallocatequina-3-galato (SAEED *et al.*, 2015), ácido salvanólico (JIANG *et al.*, 2008), chá verde (KHAN *et al.*, 2014), *ginseng* (WANG *et al.*, 2012) e sesamina (SU *et al.*, 2014) promovem efeitos semelhantes ao do CM.

Na segunda fase deste trabalho foi investigado o efeito cardioprotetor do pré-tratamento com 40 mg/kg m.c. de CM no tecido cardíaco de ratos, que receberam dose única de DXO. Optou-se por utilizar o ventrículo esquerdo por ser o mais afetado pela DXO, devido à maior densidade muscular e mitocondrial e, portanto, mais suscetível ao aumento do EO (LI *et al.*, 1995). Um aumento do EO pode ser indiretamente demonstrado por maior dano oxidativo lipídico (ABU-ALSAADA *et al.*, 2015). Corroborando com outros estudos (SAEED *et al.*, 2015, SU *et al.*, 2014), houve maior dano oxidativo lipídico, confirmado por meio da reação de substâncias formadas na peroxidação lipídica reativas ao TBARS no miocárdio de ratos tratados com DXO. A menor reação do TBARS após pré-tratamento de CM sinaliza um menor dano oxidativo lipídico, que provavelmente contribuiu positivamente para a função cardíaca, evidenciado pela normalização do ECG, e menor concentração de CK e CK-MB. Efeitos similares foram obtidos com o antioxidante epigallocatequina-3-galato do chá verde (SAEED *et al.*, 2015).

Um aumento do EO, que sinaliza para a existência de um desequilíbrio redox induzido por DXO no coração também pode ser evidenciado pela

diminuição nos níveis de GSH (ABU-ELSAADA *et al.*, 2015, MANTAWAY *et al.*, 2014), um antioxidante endógeno não enzimático (MINOTTI *et al.*, 2004, MIYAMOTO *et al.*, 2003). A diminuição da concentração de GSH no tecido cardíaco induzida por DXO deste estudo já havia sido descrita por Danz *et al.* (2009), e foi prevenida pelo pré-tratamento com CM, demonstrando a capacidade desse chá em aumentar a atividade de antioxidantes endógenos não enzimáticos. Resultados semelhantes foram observados após o tratamento com chá verde e associados à conversão do aminoácido L-tiamina em GSH (SUGIYAMA, SADZUKA, 2004).

A manutenção do equilíbrio redox no coração também depende de enzimas antioxidantes, tais como a SOD e suas isoformas 1, 2 e 3. Essas enzimas dismutam o $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , sendo a SOD1 a responsável por essa reação no citosol das células. A redução observada no presente estudo nas atividades de SOD e SOD1 no miocárdio dos ratos que receberam DXO, corrobora com os estudos de outros autores (SAEED *et al.*, 2015, XIN *et al.*, 2011). Embora o tratamento com CM aumente a atividade destas enzimas a níveis superiores ao do grupo controle, como já demonstrado por Gao *et al.* (2013) e Pereira *et al.* (2017), e aumente a expressão da proteína SOD1 (MATSUMOTO, BASTOS; 2009), esse efeito não foi observado após a administração de DXO, indicando uma provável interação DXO-CM, não investigada no presente estudo.

Outros fatores avaliados foram a expressão proteica e a ativação do sinalizador celular Akt, relacionado às vias de sobrevivência celular, impedindo a fragmentação da molécula de DNA por fatores pró-apoptóticos. Neste estudo, observou-se que a DXO aumenta a forma ativa dessa proteína, uma vez que houve aumento da forma fosforilada, mas não ocorreu alteração na expressão de Akt total. Este aumento de Akt-p pela DXO também foi encontrado por Cao *et*

al. (2014). Essa ativação de Akt sinaliza para a ativação de algum mecanismo de sobrevivência celular, por alguma via intrínseca ou extrínseca, na tentativa de reduzir a morte celular e conseqüentemente a cardiotoxicidade causada pela DXO. Novos estudos serão necessários para elucidar as vias envolvidas nesse processo. Os dados da Akt corroboram com a análise histopatológica do tecido cardíaco, onde um grande número de núcleos apoptóticos são vistos devido à ação da DXO. No grupo pré-tratado com CM houve a conservação do arranjo estrutural cardíaco e dos cardiomiócitos, e menor fosforilação da Akt.

A dose utilizada neste estudo (40 mg/kg m.c.) é o equivalente ao consumo humano de duas xícaras de chá, preparado segundo a recomendação do fabricante para o CM solúvel (1g para cada 240 mL). Trata-se de volume facilmente consumido no dia a dia, o que faz este chá viável como alternativa para prevenir os danos do quimioterápico. Desta forma, a relevância do estudo fica evidente, devido aos benefícios evidenciados com essa dose na prevenção da cardiotoxicidade aguda induzida por DXO.

6 Resumo dos principais resultados

- A DXO induz ao dano cardíaco, comprovado por alterações no ECG, nos marcadores plasmáticos de lesão cardíaca, no desarranjo das fibras cardíacas e pelo aumento de núcleos apoptóticos;
- A DXO aumenta o EO, o dano oxidativo lipídico nos cardiomiócitos e diminui a defesa antioxidante enzimática e não enzimática;
- O pré-tratamento com CM mantém dentro da normalidade os parâmetros do ECG, os marcadores plasmáticos da lesão cardíaca e preserva a arquitetura do tecido cardíaco;
- CM previne o aumento do EO, reduz a peroxidação lipídica e previne a redução da defesa antioxidante;
- O CM normaliza os níveis da Akt-p

7 Conclusão

A hipótese foi comprovada, uma vez que o pré-tratamento por 30 dias com CM preveniu o aumento do EO e o dano cardíaco induzidos pela DXO, podendo assim ser uma alternativa na prevenção da cardiotoxicidade aguda causada pela utilização desse quimioterápico. O efeito cardioprotetor do CM contribui para a menor oxidação lipídica, por meio do aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e SOD1 e da concentração de antioxidantes não enzimáticos como o GSH.

Estudos acerca da via de sinalização em que atua o CM e da interação entre CM e a DXO são necessários para melhor compreensão dos resultados benéficos deste chá. As ações do CM em outros tecidos, após a administração de DXO, já estão sendo investigadas, na busca de uma melhor compreensão da ação protetora desse chá.

8 Referências

- Abu-Elsaad NM, Abd Elhameed AG, El-Karef A, Ibrahim TM. Yogurt containing the probacteria *Lactobacillus acidophilus* combined with natural antioxidants mitigates doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. *Journal of medicinal food*. 2015;18(9):950-9.
- Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation research*. 2007;100(10):1512-21.
- Angsutararux P, Luanpitpong S, Issaragrisil S. Chemotherapy-induced cardiotoxicity: overview of the roles of oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2015;2015:13.
- Anjos Ferreira AL, Russell RM, Rocha N, Ladeira P, Sady M, Favero Salvadori DM, et al. Effect of Lycopene on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Echocardiographic, Histological and Morphometrical Assessment. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2007;101(1):16-24.
- Arçari DP, Bartchewsky W, Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, et al. Antiobesity Effects of yerba maté Extract (*Ilex paraguariensis*) in High-fat Diet-induced Obese Mice. *Obesity*. 2009;17(12):2127-33.
- Bastos DH, Saldanha LA, Catharino RR, Sawaya A, Cunha IB, Carvalho PO, et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. *Molecules*. 2007;12(3):423-32.
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
- Beutler E. Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61(5):882-8.
- Boaventura BCB, Di Pietro PF, Stefanuto A, Klein GA, de Moraes EC, de Andrade F, et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition*. 2012;28(6):657-64.
- Boros K, Jedlinszki N, Csupor D. Theanine and caffeine content of infusions prepared from commercial tea samples. *Pharmacognosy magazine*. 2016;12(45):75.
- Bracesco N, Sanchez A, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *Journal of ethnopharmacology*. 2011;136(3):378-84.
- Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *science*. 2004;303(5666):2011-5.

Buege JA, Aust SD. [30] Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 1978;52:302-10.

Estimativa 2016. Incidência de câncer no Brasil [Internet]. 2016 [cited 05/06/2017]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>.

Cao Y, Ruan Y, Shen T, Huang X, Li M, Yu W, et al. Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2014;2014.

Çelik H, Arinç E. Bioreduction of idarubicin and formation of ROS responsible for DNA cleavage by NADPH-cytochrome P450 reductase and its potential role in the antitumor effect. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 2009;11(4):68-82.

Chandra S, Gonzalez de Mejia E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(11):3583-9.

Chen R, Sun G, Yang L, Wang J, Sun X. Salvianolic acid B protects against doxorubicin induced cardiac dysfunction via inhibition of ER stress mediated cardiomyocyte apoptosis. *Toxicology Research*. 2016;5(5):1335-45.

Da Silva EL, Neiva TJ, Shirai M, Terao J, Abdalla DS. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Research International*. 2008;41(10):973-9.

Da Silva EL, Neiva TJ, Shirai M, Terao J, Abdalla DS. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. *Food Research International*. 2008;41(10):973-9.

Danz EDB, Skramsted J, Henry N, Bennett JA, Keller RS. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;46(12):1589-97.

Dirks-Naylor AJ, Tran NT, Yang S, Mabololo R, Kouzi SA. The effects of acute doxorubicin treatment on proteome lysine acetylation status and apical caspases in skeletal muscle of fasted animals. *Journal of cachexia, sarcopenia and muscle*. 2013;4(3):239-43.

El-Refaei M, El-Naa M. Antioxidant and apoptotic effects of caffeic acid phenethyl ester induced marked inhibition on human breast cancer cell line. *Asian J of Biochem*. 2011;6:82-9.

Ferreira A, Matsubara L. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Revista da Associação Médica Brasileira* (1992). 1996;43(1):61-8.

Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*. 1975;44(1):147-59.

Fujii TM, Jacob PS, Yamada M, Borges MC, Norde MM, Pantaleao LC, et al. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) modulates NF-kappaB pathway and AKT expression in the liver of rats fed on a high-fat diet. *International journal of food sciences and nutrition*. 2014;65(8):967-76.

Worldwide data [Internet]. 2016 [cited 05/05/2017]. Available from: <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data>.

Gao H, Long Y, Jiang X, Liu Z, Wang D, Zhao Y, et al. Beneficial effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. *Experimental gerontology*. 2013;48(6):572-8.

Garfin DE. [33] One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in enzymology*. 1990;182:425-41.

Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2014. [Internet]. 2012 [cited 05/06/2017]. Available from: Available from: <http://globocan.iarc.fr>.

Gonzalez de Mejia E, Song YS, Ramirez-Mares MV, Kobayashi H. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(6):1966-73.

Granados-Principal S, Quiles JL, Ramirez-Tortosa CL, Sanchez-Rovira P, Ramirez-Tortosa M. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(6):1425-38.

Gugliucci A, Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. *Life Sciences*. 2002;71(6):693-705.

Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA; 2015.

Heck CI, De Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of food science*. 2007;72(9).

Hershko C, editor *Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage*. *Seminars in hematology*; 1989: Elsevier.

Ivanová M, Dovinová I, Okruhlicová L, Tribulová N, Šimončíková P, Barte-Kova M, et al. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012;33(4):459.

Ivanová M, Dovinová I, Okruhlicová L, Tribulová N, Šimončíková P, Barte-Kova M, et al. Chronic cardiotoxicity of doxorubicin involves activation of myocardial and circulating matrix metalloproteinases in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012;33(4):459.

Jang YM, Kendaiah S, Drew B, Phillips T, Selman C, Julian D, et al. Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats. *FEBS letters*. 2004;577(3):483-90.

Jiang B, Zhang L, Li M, Wu W, Yang M, Wang J, et al. Salvianolic acids prevent acute doxorubicin cardiotoxicity in mice through suppression of oxidative stress. *Food and chemical toxicology*. 2008;46(5):1510-5.

Khan G, Haque SE, Anwer T, Ahsan MN, Safhi MM, Alam M. Cardioprotective effect of green tea extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Acta Pol Pharm*. 2014;71(5):861-8.

Kojima S, Ona S, Iizuka I, Arai T, Mori H, Kubota K. Antioxidative activity of 5, 6, 7, 8-tetrahydrobiopterin and its inhibitory effect on paraquat-induced cell toxicity in cultured rat hepatocytes. *Free radical research*. 1995;23(5):419-30.

Kruger NJ, Hammond JB. Molecular comparison of pyrophosphate- and ATP-dependent fructose 6-phosphate 1-phosphotransferases from potato tuber. *Plant physiology*. 1988;86(3):645-8.

Kumral A, Soluk-Tekkeşin M, Olgaç V, Doğru-Abbasoğlu S, Türkoğlu Ü, Uysal M. Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. *Pathophysiology*. 2015;22(2):117-23.

Laemmli U. SDS-page Laemmli method. *Nature*. 1970;227:680-5.

Li Y, Huang T-T, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature genetics*. 1995;11(4):376-81.

Liu G, Liu, Y., Wang, R., Hou, T., Chen, C., Zheng, S., Dong, Z. Spironolactone Attenuates Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats. *Cardiovasc Therapeutics*. 2016;34(4):216–24.

Loch T, Vakhrusheva, O., Piotrowska, I., Ziolkowski, W., Ebel, H., Braun, T., Bober, E. Different extent of cardiac malfunction and resistance to oxidative stress in heterozygous and homozygous manganese-dependent superoxide dismutase-mutant mice. *Cardiovascular research*. 2009;82(3):448–57.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.

Lunceford N, Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*. 2005;76(5):419-27.

Mantawy EM, El-Bakly WM, Esmat A, Badr AM, El-Demerdash E. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *European journal of pharmacology*. 2014;728:107-18.

Marklund SL. Pyrogallol autoxidation. *Handbook of methods for oxygen radical research*. 1985;1985:243-7.

Matsubara LS, Machado P. Age-related changes of glutathione content, glutathione reductase and glutathione peroxidase activity of human erythrocytes. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica[et al]*. 1990;24(5):449-54.

Matsumoto RL, Bastos DH, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky Jr W, Ribeiro ML, et al. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(5):1775-80.

Mejia A, Schulz S, Hyslop T, Weinberg DS, Waldman SA. Molecular staging estimates occult tumor burden in colorectal cancer. *Advances in clinical chemistry*. 2010;52:19-39.

Mello Filho A, Hoffmann M, Meneghini R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. *Biochemical Journal*. 1984;218(1):273-5.

Meng C, Liu J-L, Du A-L. Cardioprotective effect of resveratrol on atherogenic diet-fed rats. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(11):7899.

Menna P, Salvatorelli E, Minotti G. Doxorubicin degradation in cardiomyocytes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007;322(1):408-19.

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

Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, et al. Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biological chemistry*. 2003;384(4):567-74.

Mosimann ALP, Wilhelm-Filho D, Da Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors*. 2006;26(1):59-70.

Nascimento M, Martins AS. Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arquivos de Ciências e Saúde, São José do Rio Preto*. 2005;12(2):111-5.

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2012;52(6):1213-25.

Opala T, Rzymiski P, Pischel I, Wilczak M, Wozniak J. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects-a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. *European journal of medical research*. 2006;11(8):343.

Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2007;96(9):2181-96.

Papadopoulou LC, Theophilidis G, Thomopoulos GN, Tsiftoglou AS. Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. *Biochemical pharmacology*. 1999;57(5):481-9.

Parvez S, Tabassum H, Rehman H, Banerjee BD, Athar M, Raisuddin S. Catechin prevents tamoxifen-induced oxidative stress and biochemical perturbations in mice. *Toxicology*. 2006;225(2):109-18.

Patel AG, Kaufmann SH. Cancer: How does doxorubicin work? *Elife*. 2012;1:e00387.

Pereira AAF, Tirapeli KG, Chaves-Neto AH, da Silva Brasilino M, da Rocha CQ, Belló-Klein A, et al. Ilex paraguariensis supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause. *Experimental gerontology*. 2017;90:14-8.

Puangpraphant S, Berhow MA, Vermillion K, Potts G, Gonzalez de Mejia E. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and-3 in human colon cancer cells. *Molecular nutrition & food research*. 2011;55(10):1509-22.

Puangpraphant S, de Mejia EG. Saponins in yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NF κ B pathways. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009;57(19):8873-83.

Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramírez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*. 2002;180(1):79-95.

Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, Hachet O, Zeller M, Cottin Y, et al. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends in pharmacological sciences*. 2015;36(6):326-48.

Rover L Jr KL, Höehr NF. Development of an amperometric biosensor based on glutathione peroxidase immobilized in a carbodiimide matrix for the analysis of reduced glutathione from serum. *Clinica chimica acta*. 2001;308(1):55-67.

Saeed NM, El-Naga RN, El-Bakly WM, Abdel-Rahman HM, EIDin RAS, El-Demerdash E. Epigallocatechin-3-gallate pretreatment attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: a mechanistic study. *Biochemical pharmacology*. 2015;95(3):145-55.

Sanchis J, Canal, F., Lucas, R., Vicent, M. J. Polymer–drug conjugates for novel molecular targets. *Nanomedicine*. 2010;5(6):915-35.

Sarvazyan N, Askari A, Huang W. Effects of doxorubicin on cardiomyocytes with reduced level of superoxide dismutase. *Life sciences*. 1995;57(10):1003-10.

Schinella G, Troiani G, Dávila V, De Buschiazzo P, Tournier H. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;269(2):357-60.

Scolaro B, Delwing-de Lima D, da Cruz JGP, Magro D-D. Mate tea prevents oxidative stress in the blood and hippocampus of rats with acute or chronic ethanol administration. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2012;2012.

Segredo MPdF, Salvadori DF, Rocha NS, Moretto FF, Correa C, Camargo E, et al. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Human & experimental toxicology*. 2014;33(7):748-60.

Serra V, von Zglinicki T, Lorenz M, Saretzki G. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(9):6824-30.

Šimůnek T, Štěřba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Geršl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*. 2009;61(1):154-71.

Singal P, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: mechanisms and modulation. *Molecular and cellular biochemistry*. 2000;207(1):77-86.

Soni NO. 'Antioxidant assay in vivo and vitro. *International Journal of Phytopharmacology*. 2014;5(1).

Stein FLP, Schmidt B, Furlong EB, Soares LAS, Soares MCF, Vaz MRC, et al. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. *Biological Research for Nursing*. 2005;7(2):146-56.

Su S, Li Q, Xiong C, Li J, Zhang R, Niu Y, et al. Sesamin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity: involvement of Sirt1 and Mn-SOD pathway. *Toxicology letters*. 2014;224(2):257-63.

Sugiyama T, Sadzuka Y. Theanine, a specific glutamate derivative in green tea, reduces the adverse reactions of doxorubicin by changing the glutathione level. *Cancer letters*. 2004;212(2):177-84.

Suwei W, Kotamraju S, Konorev E, Kalivendi S, Joseph J, Kalyanaraman B. Activation of nuclear factor- κ B during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochemical Journal*. 2002;367(3):729-40.

Takemura GF, Hisayoshi. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in cardiovascular diseases*. 2007;49(5):330-52.

TIRAPELI KG. Alterações em marcadores do estresse oxidativo ocasionadas por diferentes tempos de tratamento com chá mate (*Ilex paraguariensis*) no processo

de envelhecimento. . In: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho FdOdA, editor. Dissertação (mestrado)2014. p. 97.

Troiano J, Potje S, Graton M, Cavalari P, Pereira A, Vale G, et al. Decreased reactive oxygen species production and NOX1, NOX2, NOX4 expressions contribute to hyporeactivity to phenylephrine in aortas of pregnant SHR. *Life sciences*. 2016;144:178-84.

Vinson JA, Dabbagh YA. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. *Nutrition Research*. 1998;18(6):1067-75.

Wang H, Yu P, Gou H, Zhang J, Zhu M, Wang Z-h, et al. Cardioprotective effects of 20 (S)-ginsenoside Rh2 against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vitro and in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012.

Wang T, Gu J, Wu P-F, Wang F, Xiong Z, Yang Y-J, et al. Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against cerebral ischemia: involvement of JNK, SIRT1, and NF- κ B pathways and inhibition of intracellular ROS/RNS generation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;47(3):229-40.

Xin YF, Wan, L. L., Peng, J. L., Guo, C. . Alleviation of the acute doxorubicin-induced cardiotoxicity by *Lycium barbarum* polysaccharides through the suppression of oxidative stress. *Food and chemical toxicology*. 2011;49(1):259-64.

Xu MF, Tang PL, Qian ZM, Ashraf M. Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. *Life sciences*. 2001;68(8):889-901.

Yen H-C, Oberley TD, Vichitbandha S, Ho Y-S, St Clair D. The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;98(5):1253.

Yun J-M, Chien A, Jialal I, Devaraj S. Resveratrol up-regulates SIRT1 and inhibits cellular oxidative stress in the diabetic milieu: mechanistic insights. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(7):699-705.

Zapaterini JR, Bidinotto LT, Rodrigues MA, Barbisan LF. Chemopreventive effects of mate against mouse mammary and colon carcinogenesis. *Human & experimental toxicology*. 2010.

9 Anexos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Avaliação do efeito do chá mate (*Ilex paraguariensis*) na toxicidade induzida por doxorubicina em coração, fígado e rim**", Processo FOA nº 00416-2015, sob responsabilidade de Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 09 de Dezembro de 2015.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 09 de Fevereiro de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 09 de Março de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Examination effect of the mate tea (*Ilex paraguariensis*) toxicity induced by doxorubicin in heart, liver and kidney**", Protocol FOA nº 00416-2015, under the supervision of Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 09, 2015.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 09, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 09, 2017.

Profa. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende
Vice-Coordenadora da CEUA
CEUA Vice-Coordinator

Mate tea (*Ilex paraguariensis*) prevents acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats

Lilian Xavier da Silva^a, Helena Cordeiro Barroso^a, Carol Cristina Vágula de Almeida Silva^b, Maria Sara de Lima Coutinho^a, Fernanda Fernandes^a, Ângelo Luiz Baiocchi^c, Antonio Hernandez Chaves Neto^{a,c}, Rita Cássia Menegati Dornelles^{a,c}, Dóris Hissako Sumida^{a,c}, Cristina Antoniali^{a,c}, Ana Lúcia dos Anjos Ferreira^d, Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune^{a,c*}

^aPrograma de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – SBFis/Unesp - São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^bCentro Universitário Católica Salesiano Auxilium – Unisalesiano, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^cSão Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, Department of Basic Sciences, Laboratory of Biochemistry, Araçatuba, São Paulo, Brazil

^dSão Paulo State University (Unesp), Medical School, Botucatu, Department of Pathophysiology in Clinical Medicine, Botucatu, São Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Professor Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, Department of Basic Sciences, Building 31 - UNESP

Marechal Rondon Highway, Km 527 -16018-805 – Araçatuba, SP, Brazil

Phone: +55 18 36362788

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

Highlights:

- MT prevents acute cardiotoxicity DXO-induced;
- MT prevents DXO-induced increase in cardiac oxidative damage;
- MT preserves heart function after a single DXO dose.

Abstract

Doxorubicin (DXO) chemotherapeutic agent may cause acute cardiotoxicity, associated with increased oxidative stress. We hypothesize that mate tea (MT) pretreatment can minimize acute DXO-induced cardiotoxicity and preserve heart function. Wistar male rats (250 g) were divided into control (C), doxorubicin (DXO), MT group and MT + DXO. Groups C and DXO received 1.0 mL of water by gavage for 30 days, within MT + DXO and MT groups received 40 mg/kg BW/day of MT powder diluted in water. DXO, DXO + MT groups received a single dose of DXO (15 mg/kg, i.p.) on 29th day of MT treatment. On 31th, all animals were submitted to electrocardiogram (ECG) before cardiac puncture. Creatine kinase (CK) and CK-MB fraction, were estimated in the plasma. Oxidative stress parameters, as malonaldehyde (TBARS) and glutathione (GSH), total superoxide dismutase (SOD) and isoform1 (SOD1) were quantified in the heart homogenate. SOD1 and Akt were analyzed by western blotting. DXO group had tachycardia, QTc and PR interval prolongation, increase on CK and CK-MB. MT pretreatment prevents these alterations. On heart homogenate decreases on TBARS, increases on GSH, SOD, SOD1 and Akt activity. We

conclude that MT prevents acute cardiac oxidative damage induced by DXO, as preserved heart function.

Key words: Mate tea; Doxorubicin; Oxidative stress; Cardiotoxicity; SOD; GSH.

1. Introduction

Doxorubicin (DXO) is an anthracycline, used by chemotherapeutic agent, for treatment of several cancer, such solid tumors, leukemia, lymphomas and breast cancer (Octavia et al., 2012). However, a severe complication of DXO chemotherapy is an acute cardiotoxicity that starts within 24 h of the drug application (MANTAWY et al., 2014; OCTAVIA et al., 2012) and affects 40% of the treated patients (Octavia et al., 2012), such abnormalities on the electrocardiogram (ECG). Tachycardia and QT interval prolongation are very commons in this situation (MANTAWY et al., 2014; OCTAVIA et al., 2012). DOX-induced cardiac chronic toxicity can be occurring, a cumulative dose dependent manner, which may lead to congestive heart failure (Saeed et al., 2015). Multiple mechanisms are involved in pathogenesis of DXO-induced cardiotoxicity, but increase in oxidative stress remains the cornerstone (MANTAWY et al., 2014; OCTAVIA et al., 2012; Saeed et al., 2015).

DXO-induced cardiomyopathy is an important public health concern (Octavia et al., 2012), thus, compounds that can reduce the severe side effect while maintaining and/or enhancing its antitumor activity, will benefit the success of its use in clinic (Wang et al., 2012). In the contest, efforts have been made to identify natural antioxidant products that can minimize DXO-induced increase in oxidative stress. Sesamin (Su, et al., 2014), epigallocatequina-3-gallate of green tea (Saeed et al., 2015.), resveratrol (Yun et al., 2012), salvianolic acid (Chen et al., 2016) and ginsenoside (Wang et al., 2012) are some of the natural antioxidants that have proven effective in this context.

The mate tea (*Ilex paraguariensis*) (MT) is a natural antioxidant product that have capacity to neutralize reactive oxygen species (ROS) in vivo e in vitro (Matsumoto et al., 2009), it can increase enzymatic antioxidant defense in different conditions thereby decreasing oxidative stress (Matsumoto et al., 2009; Pereira et al., 2017;). However, there are no reports, so far, about MT effects on acute DXO-induced cardiotoxicity. Based on the capacity offered by other antioxidant products in reduced DXO-induced cardiac injury, our hypothesis is that MT pretreatment can reduced acute oxidative damage in heart and so preserves heart function. To test this hypothesis, the present study investigated the effect of pretreatment of rats, for four weeks, with MT against acute DXO-induced cardiotoxicity.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Soluble MT powder (Leão Jr. ®, Curitiba, PR, Brazil), batch 7891098000088 was used by animal's treatment. Rubidox (doxorubicin chloridrate) were purchased from Bergamo Ltda (Taboão da Serra-SP, Brazil). Antibodies against SOD-1, Akt, phosphor-AKT Ser⁴⁷³ were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Antibody against β -actin was

purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The other chemicals used in this study were of analytical grade.

2.2 Animals and experimental design

The local Ethics Committee on Research Involving Animals of the São Paulo State University – Unesp approved all procedures performed in this study (Permission CEUA FOA: 416/2015). Adult male Wistar rats (250 ± 20 g) were housed in a sanitary and controlled room ($22 \pm 2^\circ$ C; 12/12 h light/dark cycle; lights on at 7:00 h; 55 ± 10 % of relative humidity) with free access to feed and water. Body weight (BW) was followed-up weekly, and water and feed consumption, daily. To avoid variation in antioxidant intake, the same batch of standard rodent chow (Purina-Labina®, Brazil) was used right from the acclimation period (seven days) through to the end of the experiment.

To screening of the potential cardio protective of MT, after the acclimation period rats were randomly subdivided into five groups: control (C), doxorubicin (DXO), MT10 + DXO, MT20 + DXO and MT40 + DXO. Groups C and DXO received 1.0 mL of water by gavage during 30 consecutive days. MT + DXO groups received 10 mg/kg BW/day of MT powder diluted in water by gavage (MT10 + DXO) or 20 mg/kg BW/day (MT20 + DXO) or 40 of MT mg/kg BW/day (MT40 + DXO) in maximum volume of 1.0 mL, during the same period. DXO and DXO + MT groups received a single dose of DXO diluted in water (15 mg/kg, i.p.) on 29th day of treatment (Saeed et al., 2015). On twenty-four hours after the last MT treatment (31th day) and after an overnight fast, the rats were anesthetised with sodium pentobarbital (50 mg/kg BW; i.p.) and lidocain (4.0 mg/kg BW; i.p.) and subjected to ECG recording. At the end of ECG, blood was obtained by means of cardiac puncture and 5.0 mL were transferred to heparinized tubes, centrifuged at $1,000 \times g$ at 4° C for 15 min. Plasma was removed and frozen at -80° C until analyses. The heart was removed immediately after the animals were sacrificed, washed in ice-cold isotonic saline. Specimens of the left ventricle was transferred to liquid nitrogen and frozen at -80° C.

Based on data obtained from the previous step, the optimal cardio protective dose of MT for furthers assessment was found to be 40 mg/kg BW/day. Then, the procedures were repeat and a new group, which received 40 mg/kg BW/day of MT in water by gavage, was added.

2.3 Electrocardiography (ECG)

ECG was recording using a Biopac ECG recorder (Biopac Student Lab, BIOPAC Systems, Inc.). Needle electrodes were inserted under the skin for the limb lead at position II (right forelimb to left hind limb). Every recording lasted for at least five minutes. ECG recording speed was 50 mm/s and the voltage was 1 mv/cm. Noise was minimized by a digital filter. Analysis of ECG waves was done to calculate QT interval (ms), which was corrected for heart rate using the Bazett formula [$QTc = QT / (\text{square root of RR interval})$], and PR interval (ms) (Mantawy et al., 2014).

2.4 Assessment of the cardiotoxicity indices

Plasma Creatine kinase (CK) and creatine kinase isoenzyme-MB (CK-MB) activities were determined by enzymatic kinetics by means of UV using commercially kits (Labtest, MG, Brazil).

2.5 Oxidative stress parameters

Immediately before the analysis, specimens of heart tissue were homogenized on ice (1.15 % KCl w/v, in the ratio of 1:5 w/v tissue/KCl) using a Potter-Elvehjem glass homogenizer (2,600 rpm for 40 seconds) and centrifuged (1,000 x g, at 4°C, 10 min.) to obtain the supernatant, named homogenato (Kumral, et. al. 2015).

Lipid peroxidation was measuring in homogenates and plasma, by analyzing the amount of TBARS, a thiobarbituric acid reactive substance, as previously described (Buege, Aust, 1978), using an extinction of coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Protein was quantified based on Lowry's method (Lowry et al., 1951), using bovine serum albumin as standard.

To GSH determination, the heart tissue was homogenised with HCl (2 mol/L) and EDTA (2 mmol/L) at a 1: 5 for 40 second on ice and centrifuged at 1,000 x g for 20 minutes. The supernatant was incubated in 2 mL of 300 mmol/L phosphate buffer (pH 7.4) and 200 μL DTNB (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid). The change in absorbance was monitored at 412 nm and GSH concentration calculated using an extinction of coefficient of $13.6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Beutler et. al., 1963).

Antioxidant enzymes total SOD and isoform SOD1 were measured in tissue homogenates. Total SOD activity was evaluated based on superoxide radical reaction inhibition with pyrogallol (Marklund, 1985 adapted by Soni et al., 2014). SOD1 activity was estimated after its inhibition by KCN (150 mmol/L).

2.6 Western blotting analysis

Heart tissue samples (10%, w/v) were homogenized in extraction buffer (100 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol NaF/L, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 0.25% sodium deoxycholate and 0.1 mg/mL Aprotinin) and centrifuged (4°C, 4000 rpm for 15 minutes). Protein extracts were centrifuged and the protein concentrations of the supernatants were determined as described by Lowry et al. (1951). An equal volume of 2x sodium dodecyl sulfate (SDS) loading buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 20% glycerol) was added to the samples that were subsequently boiled for 10 min. Aliquots of sample (100 μg of total protein) were separated by SDS- PAGE in 12% gels and transferred to a nitrocellulose membrane. The membranes were subsequently blocked in 1% fat-free dried milk in Tris-buffered saline-0.05% Tween 20 (TBS-T) and incubated overnight at 4°C with appropriate primary antibody diluted 1:1000. After washing in TBS-T, the membranes were incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies diluted 1:10000 in blocking buffer (the same dilution for all western blots). Immunoreactive bands were detected using enhanced chemiluminescence (ECL). Western blot signals were quantified by densitometric analysis using ScionImage software (Scion Corporation; available from <http://www.scioncorp.com>). Protein levels were expressed relative to β -actin.

2.7 Histopathological analysis

To investigate the existence of structural dislocations in the myocardium, resulting from the action of DXO, a coronal section of each tissue with a thickness of 4µm was performed (Saeed et al, 2015). The cuts were fixed in 10% buffered formalin for 48 h and embedded in paraffin. Sections 5 mm thick were cut from the blocked tissue, and stained with hematoxylin and eosin (HE). In the pathological alterations identified by HE, myofibrillar disorder, apoptotic nuclei, myocardial structure, and infiltrative changes were considered (Segredo et al., 2014). A light microscope (Axiolmager A1, 400x magnification) connected to a digital video camera (DFC 450, Leica, Wetzlar, Germany) and a personal computer equipped with an image analyzer Leica Qwin Color/RGB software was used (Segredo, et al., 2014).

2.8 Statistical analysis

All data, presented as the mean ± standard deviation of the mean (SD), showed normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test). Comparisons between groups were made using ANOVA one-way followed by Tukey test. All analysis was performed using GraphPad Prism 6 program (La Jolla, CA, USA). A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 Cardiotoxicity indices

3.1.1 ECG

The influence of treatment with DXO and different doses of MT on ECG parameters is shown in Table 1. DXO group has 22.7 % of increase ($p < 0.05$) in the cardiac frequency (FC), compare to control group. Doses of the 20 and 40 mg/BW of MT reduces in 13 % ($p < 0.05$, vs. DXO group), normalizing this parameter. Rats in DOX group showed prolongation ($p < 0.05$) of both QTc and PR intervals compared to the control group. MT pretreatment with 20 and 40 mg/kg BW prevents PR interval decrease, however only pretreatment with 40 mg/kg BW normalizes QTc. Measurement of plasma CK and CK-MB further confirm the choice of cardioprotective dose.

Table 1. Effect of the DXO on ECG parameters of the rats pretreated or not with different doses of the MT

Treatment	FC (bat/min)	PR interval (ms)	QTc interval (ms)
Control	247,7±15,39	61.57±1.90	196.6±20.70
DXO (15 mg/BW)	304,9±26,01 ^a	81.75±2.25 ^a	234.4±15.38 ^a
MT (10 mg/BW) + DXO	302,3±11,70 ^a	80.40±2.99 ^a	230.5±12.20 ^a
MT (20 mg/BW) + DXO	265,0±17,18 ^{b,c}	66.25±5.69 ^{b,c}	217.60±13.92 ^a
MT (40 mg/BW) + DXO	264,5±19,16 ^{b,c}	64.0±3.94 ^{b,c}	204.3±19.59 ^{b,c}

Mean±SD, n=7. a $p < 0.05$ vs. C; b $p < 0.05$ vs. DXO; c $p < 0.05$ vs. MT10 + DXO.

3.1.2 Biochemical cardiotoxicity markers

The plasma markers indicating myocardial injury, CK and CK-MB, were assessed in table 2. Activities of these parameters were significantly elevated ($p < 0.05$) in plasma of DXO group,

as compare to control. According to results MT at dose of 40 mg/kg BW was the most appropriate cardioprotective effect, corroborant ECG, and this dose was used in further study.

Table 2. Effect of the DXO on plasmatic CK and CK-MB of the rats pretreated or not witch different doses of the MT

Treatment	CK (U/L)	CK-MB (U/L)
Control	95.6±11.0	60.9±9.8
DXO (15 mg/kg BW)	147.2±3.9 ^a	139.6±8.0 ^a
MT (10 mg/kg BW) + DXO	143.9±16.0 ^a	132.8±1.8 ^a
MT (20 mg/kg BW) + DXO	117,8±6,6 ^{a,b,c}	114.7±16.2 ^{a,b,c}
MT (40 mg/kg BW) + DXO	99,67±9,4 ^{b,c,d}	86.7±4,2 ^{a,b,c,d}

Mean±SD, n=7. a p<0.05 vs. C; b p<0.05 vs. DXO; c p<0.05 vs. MT 10 + DXO and d p<0.05 vs. CM 20 + DXO.

3.2 Oxidative stress markers

MT pretreatment prevents DXO-induced changes in oxidative stress markers in heart tissue. After determining the cardioprotective dose of MT, were evaluated in the heart homogenate oxidative stress markers TBARS and GSH (Figure 1), TBARS was also analyzed in plasma but there was no significant difference between treatments, evidencing that in plasma this marker is not sufficient to demonstrate oxidative damage (data not show). The DXO-treated group showed a significant increase in TBARS (83.5%, p <0.05) and depletion (33.9%, p <0.05) of GSH compared to group C. Pretreatment with MT increased the GSH activity (50%, p <0.05) when compared to the DXO group and when compared to group C (23%, p <0.05). MT also decreases TBARS (56%, p <0.05) when compared to the DXO group and a reduction of was observed (40%, p <0.05) compare to the control group.

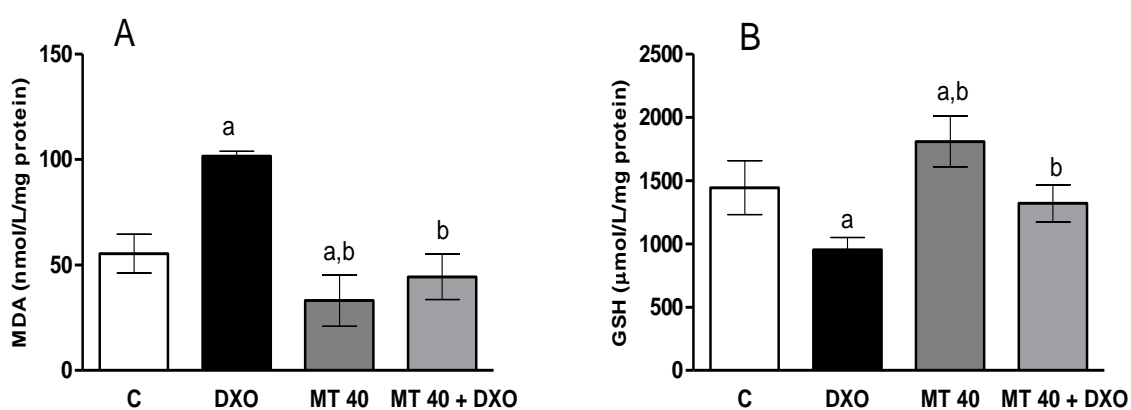


Figure 1. Effect of the DXO and MT on TBARS (A) and GSH (B) in heart homogenate. Mean±SD, n=7. a p < 0.05 vs. C; b p <0.05 vs. DXO; c p<0.05 vs. MT 40.

3.3 Superoxide dismutase

Were evaluated in the heart homogenate total SOD and SOD1 activity (Figure 2A and B). In Dox group there were significant reduction (p < 0.05) in total SOD and SOD1 activities by 48.5 and 45.3 % respectively, when compare to C group. The MT pretreatment with 40 mg/kg BW increases (p < 0.05) SOD (72.4 %) and SOD1 (40.0 %) activities compare to control group.

However, pretreatment show significant changes in only on SOD activity (80.7 %, $p < 0.05$) compare to DXO group. In Western blot analysis (Figure 2 C and D) any difference between control and DXO group was observed. SOD1 protein expression increases (40 %, $p < 0.05$) in MT group compare to control group, however a 25.4 % of reduction was observed after DXO application (MT vs. MT40 + DXO).

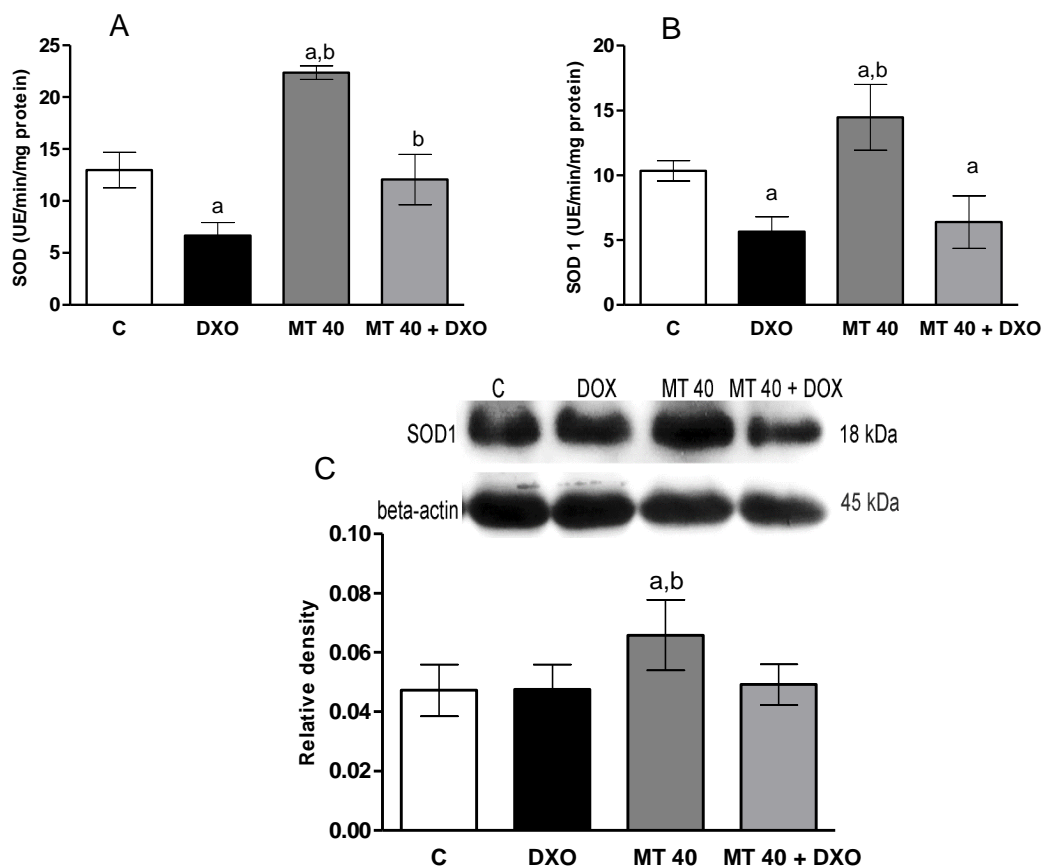


Figure 2. Effect of the DXO and MT on SOD activity (A), SOD1 activity (B), SOD1 protein expression (C) and relative density SOD1/actin (D) in heart homogenate. Mean \pm SD, n=7. a $p < 0.05$ vs. C; b $p < 0.05$ vs. DXO; c $p < 0.05$ vs. MT 40.

3.4 Histopathological analysis

Control groups (Fig. 3A) and MT (Fig. 3C) showed normal architecture of the cardiac muscle bundles and no histopathological changes were observed. The DXO group observed extensive damage in the myocardium with hyalinization, inflammatory infiltrate associated bleeding between the myocardial bundles (Fig. 3B). In contrast, pretreatment with MT protected the tissue structure against pathological changes induced by DXO (Fig. 3D). The mean number of apoptotic nuclei can be seen in Fig. 3E. DXO group presented a significant increase when compared to the control and TM groups. MT pretreatment reduced the mean number of apoptotic nuclei by 72% when compared to the DXO group. There was no significant difference between the Control, MT 40 and MT 40 + DXO groups regarding this parameter.

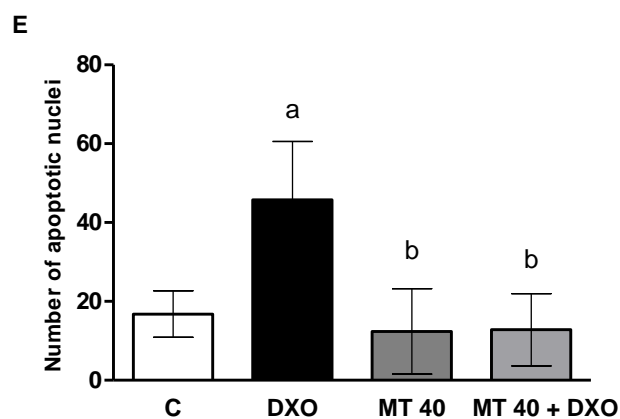
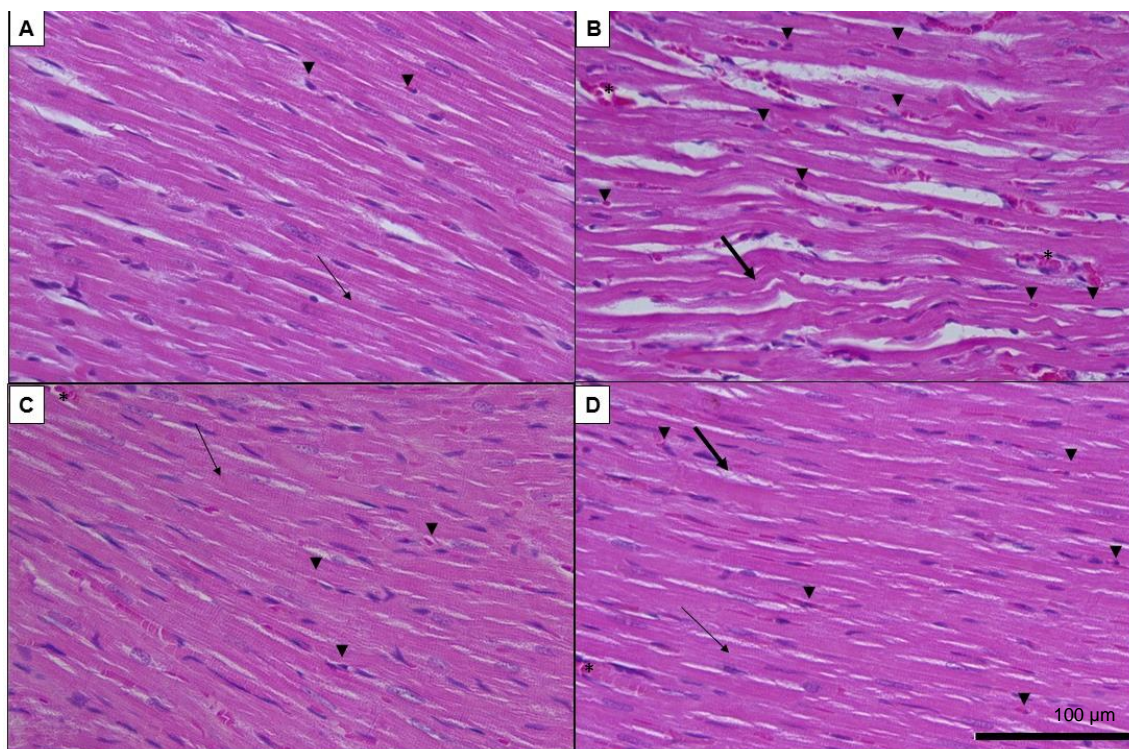


Figure 3. Effect of pretreatment with 40 mg / kg MT on DXO-induced histological changes in cardiomyocytes (x400). Photomicrographs of longitudinal sections of hematoxylin and cardiac left ventricle eosin representing the control group (A), DXO group (B), MT 40 (C) group and MT 40 + DXO group. (A) Normal vesicular nucleus with normal ramifications and normal cardiac muscle fibers (thin arrow). (B) Irregular apoptotic nuclei (arrowhead) and myofibrillar derangement (thick arrows) with areas of hemorrhage (*). (C) show the normal vesicular nucleus and normal cardiac muscle fibers with few irregularities and (D) show the normal nucleus with few irregularities. (E) represents the mean number of apoptotic nuclei in the different treated groups. The analyzes were performed in 3 different fields of each section taken from 10 animals of each group (total of 30 readings). Bar= 100 μ m. a $p < 0.05$. Vs C; b $p < 0.05$ vs. DXO.

3.5 Western blot analysis phospho-Akt/Akt

To obtain more insight into the possible molecular mechanism mediating MT effects against acute DXO-induced cardiotoxicity, the phosphorylation/expression state of Akt in response to MT was examined. As shown in Fig. 4, DOX treatment causes a significant increase of phosphor-Akt Ser⁴⁷³ of 32.71% compared to the control group. Although there were no significant differences

between control and MT40 groups, MT40 plus DOX treatment led to a 25.24% loss of Akt activity compared to DOX group.

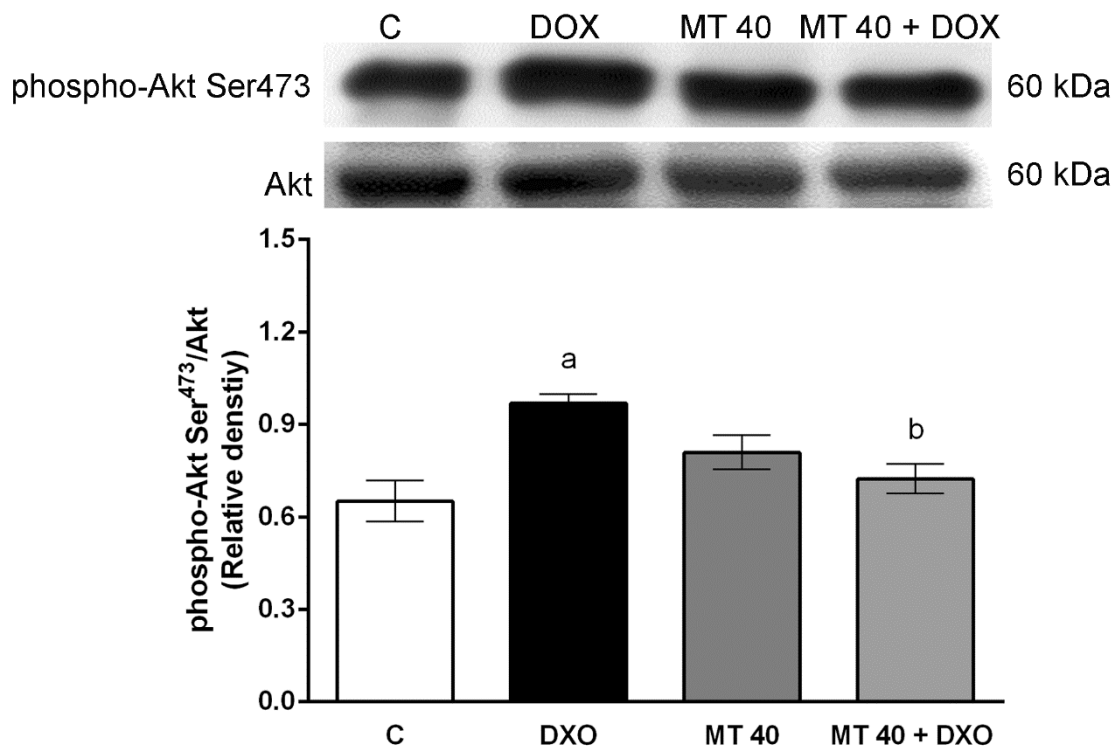


Figure 4. Effect of DXO and MT on expression and phosphorylation of Akt Ser⁴⁷³. Expression of the total Akt and Akt protein (A) and relative Akt- $\dot{\text{I}}^2$ / total Akt (B) relative density in heart homogenate. Each column represents the mean \pm SD, n = 8. a p < 0.05 vs. C; b p < 0.05 vs. DXO; c p < 0.05 vs. MT 40; d p < 0.05 vs. MT 40 + DXO.

4. Discussion

The present study evaluated the potential cardioprotective effect of MT on DOX-induced acute cardiotoxicity in rats. Cardiotoxicity was assessed by ECG, biochemical analysis of serum cardiotoxicity indices. MT pretreatment may be direct cardioprotective effect against acute DXO-induced cardiotoxicity.

In this paper, initially DOX-induced cardiotoxicity was assessed by ECG. Corroborant (Saeed et al., 2015; Jiang et. al., 2008), a single DXO dose (15 mg/kg BW) induced several ECG changes including tachycardia, prolongation of QTc and PR intervals (Saeed et. al., 2015; Mantawy et al., 2014; Su et. al., 2014). Despite the pretreatment with 20 mg/kg/BW of MT reduce PR change and normalizes heart beats, only the dose of 40 mg/kg/BW prevent changes also in QTc.

Prevention of acute DXO-induced cardiac injure by MT was also demonstrated by CK and CK-MB in plasma. CK enzymes act as modulators of the energy reservoir in muscle cells, by converting creatine to phosphocreatine, using ATP as substrate. CK-MB isoenzyme is more expressed in cardiac muscle, and as so as CK is used to verify muscle activity and membrane integrity (Abu-Elsaad et al., 2015). The upregulation and released of both enzymes in plasma observed by us in DXO group, have been described by other authors, using the same DXO-

treatment (Jiang et al., 2008; Saeed et al., 2015), and associated with heart vulnerability to oxidative stress underlying DXO-induced cardiomyopathy (Abu-Elsaad et al., 2015). MT pretreatment with 40 mg/kg BW was the most effective in minimizing myocardial damage, demonstrated by CK and CK-MB plasma decrease. Although there is no study showing the MT effect on DXO-induced cardiomyopathy, other natural antioxidants such as epigallocatechin-3-gallate (Saeed et al., 2015), salvianolic acid (Jiang et al., 2008), green tea (Khan et al., 2014), ginseng (Wang et al., 2012) and sesamin (Su et al., 2014) have shown similar effects.

In the next step, we investigated the cardioprotective effect of MT pretreatment (40 mg/kg BW/day) in heart tissue of rats that received unique DOX dose. We used the left ventricle, the most affected by DXO, due to their greater muscle and mitochondrial density, and thus more susceptible to redox imbalance, that results in increase in oxidative stress (Li et al., 1995). Since redox imbalance, associated with ROS generation during re-oxidation of semiquinone-DXO to DXO (Minotti et al., 1988) is considered as the main cause of DXO-induced cardiotoxicity (Saeed et al., 2015), and ROS can be indirectly detected by measuring of lipid oxidative damage (Abu-Elsaad et al., 2015), TBARS levels were investigated in heart homogenate. The increase of TBARS after single DXO administration observed in this study, had already been observed by other authors (Saeed et al., 2015; Su et al., 2014). The reduction of TBARS after MT pretreatment signals to lower oxidative damage and decrease of ROS production. This effect had a positive impact on cardiac function, evidenced by the improvement in ECG, CK and CK-MB. Similar effects have been demonstrated by other natural antioxidants, like EGCG of green tea (Saeed et al., 2015).

The existence of a DOX-induced redox imbalance in the heart can be also demonstrated by decrease in GSH levels (Abu-Elsaad et al., 2015; Mantaway et al., 2014), a non-enzymatic antioxidant endogenous (Minotti et al., 2004; Miyamoto et al., 2003). The DOX-induced reduction of GSH on cardiac tissue have been seen by DANZ et al. (2009). MT pretreatment keep the level of this antioxidant as the control group, demonstrating that MT increases the activity of endogenous antioxidant. Similar results were observed after green tea treatment and associated to conversion of amino acid L-thiamine in GSH (Sugiyama; Sadzuka, 2004). The presence of this amino acid was demonstrated in all kinds of *Camelia sinensis* (Boros et al., 2016), but there is yet evidence of its presence in MT.

The redox balance maintenance in the heart also depends on antioxidant enzymes, such as superoxide dismutases, enzymes that dismutates the ROS superoxide anion (O_2^-) in hydrogen peroxide (H_2O_2). There are three SOD isoforms, and isoform 1 (SOD1) being found in the cytoplasm (Minotti et al., 2004; Miyamoto et al., 2003). The DXO-induced reduction on SOD and SOD1 activities observed by us, have been described in heart tissue by other authors (Saeed et al., 2015). Exclusive treatment with MT increases the activity of these enzymes at levels higher than the baseline, corroborant Gao et al. (2013), Pereira et al. (2017), Matsubara et al. (1997), and increases SOD1 protein expression, effect observed by Matsubara et al. (1997). However, this effect was not observed after DOX administration, when we evaluated the activities of total SOD, SOD1 neither in protein expression of this isoform. DXO

reduces the activity of these enzymes even with the pretreatment with MT, probably due to an interaction of DXO and MT.

DXO increases Akt phosphorylation, its active form, since there was no change in total Akt expression between the groups, probably because it triggered in the cardiac cell an intrinsic or extrinsic survival mechanism to reduce the cardiotoxicity caused by the drug, corroborated by histopathological analysis where many apoptotic nuclei can be seen in the cardiac tissue due to the action of DXO. This increase of Akt-p by DXO was also found by Cao et al., 2014.

MT did not change the phosphorylation level of Akt Ser⁴⁷³ in rats not treated with chemotherapy, whereas in rats treated with DOX, MT partially suppressed the increase of phospho-Akt Ser⁴⁷³. According to our results, DOX treatment activates and triggers Akt phosphorylation as a protective mechanism against oxidant stress, which has been corroborated by the suppression of DOX-induced cardiomyocyte death and cardiac dysfunction (Taniyama et al., 2002; An et al., 2013; Kimatura et al., 2014). On MT treatment, the doxorubicin-triggered Akt phosphorylation was markedly reduced. Like our results, experimental antioxidant compound also demonstrates a significant reduction in Akt Ser⁴⁷³ phosphorylation. The manipulation of Akt activity by antioxidant was effective in attenuates doxorubicin-induced acute cardiotoxicity without interfering with its anticancer effects (Deres et al., 2005). In our research, this was confirmed by histopathological and biochemistry analyses.

We confirm the hypothesis, and conclude that pretreatment with MT prevents acute cardiac oxidative damage induced by DXO, so the preserved heart function. As a limitation of this study we point out the fact that we did not investigate the signaling pathways involved in the modification of Akt activity, but we will start it.

5. References

- ABU-ELSAAD, N. M.; ABD ELHAMEED, A. G.; EL-KAREF, A.; IBRAHIM, T. M. Yogurt Containing the Probiotic Lactobacillus acidophilus Combined with Natural Antioxidants Mitigates Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy in Rats. *J Med Food*. 2015.
- AN T, ZHANG Y, HUANG Y, ZHANG R, YIN S, GUO X, WANG Y, ZOU C, WEI B, LV R, ZHOU Q, ZHANG J. Neuregulin-1 protects against doxorubicin-induced apoptosis in cardiomyocytes through an Akt-dependent pathway. *Physiol Res*. 2013. 62(4):379-85.
- BEUTLER E, DURON O, KELLY BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 1963;61:882–890.
- BOROS, K., JEDLINSZKI, N. C., SUPOR, D. Theanine and caffeine content of infusions prepared from commercial tea samples. **Pharmacognosy magazine**, v. 12, n. 45, p. 75, 2016.
- BUEGE, J. A.; AUST S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978. v. 52, p. 302-310.
- CAO, Y.; RUAN, Y.; SHEN, T.; HUANG, X.; LI, M.; YU, W.; ZHU, Y.; MAN, Y.; WANG, S.; LI, J. Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways. *Oxid Med Cell Longev*. 2014. 674219.
- CHEN, R.; SUN, G.; YANG, L.; WANG, J.; SUN, X. Salvianolic acid B protects against doxorubicin induced cardiac dysfunction via inhibition of ER stress mediated cardiomyocyte apoptosis. *Toxicol. Res.*, 2016,5, 1335-1345

DANZ, E. D. B., SKRAMSTED, J., HENRY, N., BENNETT, J. A., KELLER, R. S. Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial 66 stabilization and the Sirt1 pathway. *Free radical biology & medicine* 2009. 46(12), 1589-97.

DERES P, HALMOSI R, TOTH A, KOVACS K, PALFI A, HABON T, CZOPF L, KALAI T, HIDEG K, SUMEGI B, TOTH K. Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2005. 45(1):36-43.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev Assoc Med Bras*. 1997. 43(1):61-8.

GAO, H.; LONG, Y.; JIANG, X.; LIU, Z.; WANG, D.; ZHAO, Y.; LI, D.; SUN, B.L. Beneficial effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on hyperlipidemia in high-fat-fed hamsters. . 2013. 48(6):572-8.

JIANG, B.; ZHANG, L.; LI, M.; WU, W.; YANG, M.; WANG, J.; GUO, D. A . Ácidos Salvianolic evitar aguda doxorubicina cardiotoxicidade em ratos através da supressão do estresse oxidativo. *Food Chem Toxicol*. 2008. 46 (5): 1510-5.

KHAN, G.; HAQUE, S.E.; ANWER, T.; AHSAN, M.N.; SAFHI, M.M.; ALAM, M.F. Cardioprotective effect of green tea extract on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Acta Pol Pharm*. 2014. 71(5):861-8.

KITAMURA Y, KOIDE M, AKAKABE Y, MATSUO K, SHIMODA Y, SOMA Y, OGATA T, UEYAMA T, MATOBA S, YAMADA H, IKEDA K. Manipulation of cardiac phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling by apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) regulates cardiomyocyte death during doxorubicin-induced cardiomyopathy. *J Biol Chem*. 2014. 31;289(5):2788-800.

KUMRAL A, GIRIŞ M, SOLUK-TEKKEŞİN M, OLGAÇ V, DOĞRU-ABBASOĞLU S, TÜRKÖĞLÜ Ü, UYSAL M. Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. *Pathophysiology*. 2015. 22(2):117-23

LI, Y.; HUANG, T.; CARLSON, E. J.; MELOV, S.; URSELL, P. C.; OLSON, J. L.; NOBLE, L. J.; YOSHIMURA, M. P.; BERGER, C.; CHAN, P. H.; WALLACE, D. C.; EPSTEIN, C. J. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nature Genetics*. 1995. 11, 376-381.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951. 193(1): 265-275.

MANTAWY, E. M.; EL-BAKLY, W. M.; ESMAT, A.; BADR, A. M.; EL-DEMERDASH, E. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 728 (2014)107–118.

MARKLUND, S. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. Boca Raton. 1985. CRC Press. 243-247

MATSUMOTO, R. L.; BASTOS, D. H.; MENDONÇA, S.; NUNES, V.S.; BARTCHEWSKY, W.; RIBEIRO, M. L.; OLIVEIRA, P. C. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and total antioxidant status in healthy young women. *J Agric Food Chem*. 2009. 57(5):1775-80.

MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CAIRO, G., GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol*. 2004. 56: 185–229.

MIYAMOTO, Y.; KOH, Y. H.; PARQUE, Y. S.; FUJIWARA, N.; SAKIYAMA, H.; MISONOU, Y.; OOKAWARA, T.; SUZUKI, K.; HONKE, K.; TANIGUCHI, N. Oxidative Stress Caused by

Inactivation of Glutathione Peroxidase and Adaptive Responses. *Biol. Chem.* 2003; 384 (4): 56774.

OCTAVIA, Y.; TOCCHETTI, C. G.; GABRIELSON, K. L.; JANSSENS, J.; CRIJNS, H. J.; MOENS, A. L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2012. 52, 1213–1225.

PEREIRA, A.A.; TIRAPELI, K.G.; CHAVES-NETO, A.H.; DA SILVA BRASILINO, M.; DA ROCHA, C.Q.; BELLÓ-KLEIN, A.; LLESUY, S.F.; DORNELLES, R.C.; NAKAMUNE, A.C. *Ilex paraguariensis* supplementation may be an effective nutritional approach to modulate oxidative stress during perimenopause. *Exp Gerontol.* 2017. 90:14-18.

SAEED, N. M.; EL-NAGA, R. N.; EL-BAKLY, W. M.; ABDEL-RAHMAN, H. M.; EL-DEMERDASH, E. Epigallocatechin-3-gallate pretreatment attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: A mechanistic study. *Biochemical Pharmacology.* 2015. 95(3):145-55.

SEGREDO, M. P.; SALVADORI, D. M.; ROCHA, N. S.; MORETTO, F. C.; CORREA, C. R.; CAMARGO, E. A.; DE ALMEIDA, D. C.; REIS, R. A.; FREIRE, C. M.; BRAZ, M. G.; TANG, G.; MATSUBARA, L. S.; MATSUBARA, B. B.; YEUM, K. J.; FERREIRA, A. L. [1]. *Hum. Exp. Toxicol.* 2014. 33(7):748-60.

SONI, N.O. Antioxidant assay in vivo and vitro. *International journal of Phytopharmacology.* 2014 5(1):51-58.

SU, S.; LI, Q.; LIU, Y.; XIONG, C.; ZHANG, R.; NIU, Y.; ZHAO, L.; WANG, Y.; GUO, H. Sesamin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity: Involvement of Sirt1 and Mn-SOD pathway. *Toxicology Letters.* 2014:224, 257– 263.

SUGIYAMA, T.; SADZUKA, Y. Theanine, a specific glutamate derivative in green tea, reduces the adverse reactions of doxorubicin by changing the glutathione level. *Cancer Letters.* 2004. 212:177–184

WANG, H.; YU, P.; GOU, H.; ZHANG, J.; ZHU, M.; WANG, Z. Cardioprotective Effects of 20(S)-Ginsenoside Rh2 against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:506214

, J. M.; CHIEN, A.; JIALAL, I.; DEVARAJ, S. Resveratrol up-regulates Sirt1 and inhibits cellular oxidative stress in the diabetic milieu: mechanistic insights. *J.Nutr. Biochem.* 2012. 23, 699–705. Taniyama Y, Walsh K. Elevated myocardial Akt signaling ameliorates doxorubicin-induced congestive heart failure and promotes heart growth. *J Mol Cell Cardiol.* 2002. 34(10):1241-7.