



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



**MECANISMOS DE CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM RATOS WISTAR E POTENCIAL
CARDIOPROTETOR DA ALDA-1**

LEONARDO DA CUNHA MENEZES SOUZA

**BOTUCATU – SP
JANEIRO/2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**MECANISMOS DE CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM RATOS WISTAR E POTENCIAL
CARDIOPROTETOR DA ALDA-1**

Doutorando: Leonardo da Cunha Menezes Souza

Orientadora: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientadora: Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

**BOTUCATU – SP
JANEIRO/2019**

S729m

Souza, Leonardo da Cunha Menezes
MECANISMOS DE CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA EM RATOS WISTAR E
POTENCIAL CARDIOPROTETOR DA ALDA-1 /
Leonardo da Cunha Menezes Souza. -- Botucatu, 2019
100 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientadora: Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

1. Alda-1, 2. Alterações Mitocondriais. 3. Cardioproteção.
4. Cardiotoxicidade. 5. Doxorubicina

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do
Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Aos meus pais com carinho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori pela inspiradora orientação, disponibilidade incondicional e pelo carinho durante todos estes anos. Foi uma grande honra trabalhar neste Projeto sob sua orientação, e seus ensinamentos levarei comigo para sempre como uma valiosa referência.

À professora Dra. Ana Lúcia dos Anjos Ferreira, fundamental para existência deste Projeto de Pesquisa, e cuja coorientação, contínua disponibilidade e contribuição foram essenciais para este trabalho.

To Dr. Yidong Bai for the valuable teachings, supervision and structure during the sandwich doctorate performed in his laboratory at the University of Texas Health Science Center at San Antonio (UTHSCSA).

Aos colegas André Luiz Ventura Sávio, Carla Munari, Corina Tomasetti, João Paulo de Castro Marcondes e, especialmente, Fábio Henrique Fernandes e Paulinha Torres Presti, pela grande contribuição nas etapas *in vivo* no biotério.

Ao Sr. Paulo César Georgete pelo suporte técnico, fundamental nas etapas no Biotério do Departamento de Patologia – FMB/UNESP.

To Janice Deng for the important technical support during the experiments in Dr. Yidong Bai's Lab.

Aos integrantes do Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica (OMICS) Amanda Tanamachi, Bruno César Ottoboni Luperini, Carla Munari, Elaine Aparecida Camargo, Gabriela Nogueira Bittencourt, Helenice de Fatima de Lego Marcello, João Paulo de Castro Marcondes, Joara de Paula Campos, Kamila Sauer Veiga Leme, Luciana Maria Feliciano, Maruhen Amir Datsch Silveira, Pablo Felipe Bertolini Andrade, Raphael Toledo, Renato Paschoal Prado, Tathiana Silveira Dorini, Tamara Gomes, Vanessa Lorenço Perese.

To the colleagues from Dr. Yidong Bai's lab at the UTHSCSA, Bi Zhu, Min Zhu, Peiqing Hu and Yusheng Qian.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Genética) pela atenção e suporte durante todo o curso.

To my friends from San Antonio who made this experience in the United States even more special and, in difficult situations, easier to keep going: Adriana Valera Reyes, Alan Vag, Alberto Rodrigues, Andulai Ahmadu, Alvaro Padron, Bhi Zu, Bruno Itaquy, Caroline Gusson Shimoura, Christina Stengl, Danielle Santana Coelho, Fábio Antônio Borges Vigil, Jacqui Mendes, Leila Aguiar, Livia Ferreira, Mitzli Velasco, Pragya Singh, Renata Ciossani, Ryan Chun and Sandeep Kr Malla.

Agradeço ainda mais aqueles integrantes do OMICS que tornaram essa empreitada muito mais agradável e cuja especial amizade se estenderá para além dos portões da UNESP: André Luiz Ventura Sávio, Fábio Henrique Fernandes, Jhennifer Rebecca Cal, Juliana Lara, Mário Otávio Botasso Nasciutti e Phillippe Franklin Coelho Magalhães. Sou muito grato e feliz por ter tido a oportunidade de estar com vocês em tantos momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (2014/09740-0) e auxílio à pesquisa (2012/17280-3) bem como a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus familiares, especialmente meu pai, Genival Corrêa de Souza, minha mãe, Marineuza da Cunha Menezes Souza, e meus irmãos Daniela Menezes Souza e Thiago Menezes Souza, meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio incondicional, que foi ainda mais ampliado pela distância. Vocês representaram nesse caminho um alicerce fundamental. Amo vocês!

Por fim gostaria de agradecer a Deus pela serenidade e coragem em momentos adversos

*“Face á realidade, o que julgamos saber
claramente ofusca o que deveríamos saber.”*

Gaston Bachelard

RESUMO

A cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (DOX), antraciclina isolada da actinobacteria *Streptomyces peucetius* e amplamente utilizada na terapia antineoplásica, corresponde a um dos mais importantes eventos patofisiológicos que limitam sua aplicação clínica. No entanto, não são completamente conhecidos todos os mecanismos envolvidos nessa toxicidade, o que diminui as possibilidades de intervenção e a redução dos efeitos colaterais para os pacientes sob tratamento. Uma das hipóteses é que os aldeídos gerados pela ação da DOX atuam sobre membranas mitocondriais, alterando o estado redox e formando adutos com proteínas, os quais prejudicam o correto funcionamento da organela. Atividades deletérias da DOX sobre outros componentes celulares, como, por exemplo, os ácidos ribonucleicos, são, também, possíveis mecanismos de toxicidade do antineoplásico. Várias estratégias têm sido utilizadas para minimizar os efeitos adversos da DOX. Uma delas, é a busca por compostos que possam proteger as células da ação citotóxica. Nesse sentido, a Alda-1, pertencente ao grupo das chaperonas e agonista da enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2), vem sendo testada com o objetivo de reduzir os efeitos adversos dos metabólitos e radicais gerados pelo antineoplásico. Para investigar outros possíveis mecanismos de ação da DOX e o efeito cardioprotetor da Alda-1, este estudo foi delineado utilizando duas abordagens distintas: experimentos *in vivo*, com ratos Wistar machos submetidos a tratamentos agudos e crônicos com o antineoplásico, e, *in vitro*, em fibroblastos de camundongos e híbridos com heteroplasmia mitocondrial para o gene *ND5* (codifica subunidade ND5 do Complexo I mitocondrial). Foram avaliados perfis de expressão gênica (genes das vias de beta oxidação de ácidos graxos; *Bax*, *Bcl-2*, *CIQBP* e *ALDH2*) e do microRNA miR-34a (regulador da expressão da *ALDH2*), e o processo de lipoperoxidação em cardiomiócitos de ratos tratados com a DOX isoladamente ou em combinação com a Alda-1. *In vitro*, foram investigados os efeitos dos dois compostos sobre a viabilidade celular, sobre a estrutura mitocondrial e sobre o perfil das espécies moleculares da cardiolipina. Além disso, foi avaliado se os níveis de heteroplasmia podiam interferir na ação da DOX. Os resultados confirmaram a ação da DOX sobre o perfil lipídico, aumentando os níveis de triglicerídeos e do VLDL. O tratamento simultâneo com a Alda-1 reverteu tal efeito. As análises de expressão gênica revelaram a hiperexpressão de *Fabp4*, *Slc27a2*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos cardiomiócitos dos animais tratados com a DOX (tratamento agudo). Novamente, a administração associada da Alda-1 foi capaz de reverter as alterações na expressão dos genes afetados. *In vitro*, a DOX promoveu alterações na heteroplasmia mitocondrial em favor do tipo mutante, a diminuição na viabilidade celular e alterações morfológicas nas mitocondriais. Esses eventos foram reduzidos pela ação da Alda-1. Diante de todos esses achados, pode-se concluir que, além dos mecanismos de ação já conhecidos, a DOX também atua modulando genes envolvidos no transporte de ácidos graxos e estresse oxidativo mitocondrial, bem como alterando a heteroplasmia do mtDNA. Por outro lado, os resultados confirmaram o efeito protetor da Alda-1 contra os efeitos tóxicos da DOX, mostrando sua ação redutora da hiperlipidemia e expressão gênica.

Palavras-chave: alda-1; alterações mitocondriais; cardioproteção; cardiotoxicidade; doxorubicina; transcriptoma.

ABSTRACT

The cardiotoxicity induced by doxorubicin (DOX), anthracycline isolated from the actinobacteria *Streptomyces peucetius*, and widely used as an antineoplastic drug, is one of the most important pathophysiological events that limit its clinical application. However, all the mechanisms involved in this toxicity are not fully understood. One hypothesis is that the aldehydes generated by DOX act on mitochondrial membranes, modifying the redox state and forming adducts with proteins. DOX activities on other cellular components, such as ribonucleic acids, are also possible mechanisms of toxicity. Several strategies have been used to reduce the DOX adverse effects. One of them is the identification of compounds that can protect cells against cytotoxicity. Alda-1, which belongs to a group of chaperones and is an agonist of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2), has been tested to reduce the adverse effects of metabolites and radicals generated by DOX. To investigate other possible DOX mechanisms of action, and the cardioprotective activity of Alda-1, this study was designed using two different approaches: *in vivo*, with male Wistar rats submitted to acute and chronic treatments; and, *in vitro*, in mice fibroblasts and cybrids with *ND5* (gene that encodes the mitochondrial Complex I subunit) mitochondrial gene heteroplasmy. The expression profiling of genes related to beta oxidation pathways, *Bax*, *Bcl-2*, *CIQBP*, *ALDH2* and miR-34a microRNA (*ALDH2* expression regulator), and the lipoperoxidation process were investigated in cardiomyocytes of rats treated with DOX, or with DOX plus Alda-1. *In vitro*, the effects of the two compounds on cell viability, mitochondrial structure and cardiolipin molecular species profile, were investigated. In addition, it was assessed whether heteroplasmy levels could interfere on DOX toxic activity. The results confirmed the DOX effect on lipid profile, increasing triglycerides and VLDL concentration. Simultaneous treatment with Alda-1 decreased such effect. Gene expression analyses revealed the overexpression of *Fabp4*, *Slc27a2*, *Bcl-2* and *CIQBP* in cardiomyocytes of rats treated with DOX (acute treatment). Again, the Alda-1 simultaneous administration was able to modulate the changes on gene expressions. *In vitro*, DOX promoted changes in mitochondrial heteroplasmy towards a mutant genotype, decreased cell viability and morphological changes in the mitochondria. These events were reduced by the action of Alda-1. In conclusion, besides the known mechanisms of action, DOX was able to modulate genes involved in the fatty acids transportation and in oxidative stress pathways. Furthermore, DOX promoted changes in mitochondrial heteroplasmy. On the other hand, the results confirmed the protective effect of Alda-1 against the DOX toxic activity through its ability to reduce hyperlipidemia and gene expression.

Keywords: alda-1; mitochondrial alterations; cardioprotection; cardiotoxicity; doxorubicin; transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura química da doxorubicina (Adriamycin®; 10-[(3-amino-2,3,6 trideoxya-L-lyxohexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8 (hydroxyacetyl)-1 methoxy-5,12-naphthacenedione). Modificado de (Zagotto et al. 2001)..... 19
- Figura 2:** Estrutura do complexo doxorubicina-DNA. (a) A doxorubicina forma ligação covalente (vermelho) com a guanina em uma das fitas do DNA e pontes de hidrogênio com a guanina na fita oposta; (b) estrutura da intercalação da doxorubicina no DNA. Modificado de Yang et al. (2014). 22
- Figura 3:** Via metabólica ilustrando a redução univalente da doxorubicina para seu radical livre intermediário semiquinona. Na presença de O₂ a doxorubicina pode se auto-oxidar gerando ânions superóxidos, revertendo a estrutura química inicial. Modificado de Wallace et al. (2003) e Carvalho et al. (2014). 23
- Figura 4:** Mecanismo proposto para o efeito cardiotoxíco da doxorubicina (DOX) em longo prazo. Em cinza, efeitos na presença da DOX; em preto, efeitos em longo prazo sem contato com a droga. Modificado de Lebrecht et al. (2003)..... 28
- Figura 5:** Estrutura da ligação da ALDH2 com a Alda-1. (a) Estrutura do tetrâmero da ALDH2 com diferentes cores mostrando as subunidades individuais e as 4 ligações com as moléculas de Alda-1, representandas em cinza. (b) Estrutura da Alda-1 no túnel catalítico da ALDH2. Em destaque estão os aminoácidos críticos para esta interação. Modificado de Perez-Miller et al. (2010) e Chen et al. (2014)..... 35
- Figura 6:** Delineamento experimental do protocolo de tratamento agudo. DOX: doxorubicina; Alda-1: ativador 1 da aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2); Controle negativo: sem nenhum tratamento; Controle: tratado com: SF (soro fisiológico)/dimetilsulfóxido (DMSO); I.P.: injeção intraperitoneal..... 38
- Figura 7:** Delineamento experimental do protocolo de tratamento crônico. DOX: doxorubicina; Alda-1: ativador 1 da aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2); Controle negativo: sem nenhum tratamento; Controle: tratado com: dimetilsulfóxido (DMSO)/SF (soro fisiológico); I.P.: injeção intraperitoneal; M0-M4: momentos das eutanásias; ▼ : número de animais. 39
- Figura 8:** Fotografia de gel de agarose 2% mostrando a integridade das amostras de RNAs extraídas do tecido cardíaco de ratos do estudo agudo (A) e do estudo crônico (B), e aleatoriamente selecionadas. Padrão de bandas associadas às subunidades ribossomais 28S e 18S; *ladder*: marcador de peso molecular. 42

Figura 9: Diagrama ilustrando a geração dos híbridos utilizados no estudo <i>in vitro</i> e seus respectivos percentuais de heteroplasmia para mutação em <i>ND5</i>	47
Figura 10: Protocolo de tratamento de quatro semanas com as drogas doxorubicina (DOX), Alda-1, SS-31 e rapamicina em células da linhagem A9 e híbridos 3A6. M1 e M2: coleta das células, respectivamente, 24h e uma semana após o 1º tratamento; M3, M4 e M5: uma semana após, respectivamente, dois, três e quatro tratamentos com as drogas.	48
Figura 11: Gráficos gerados pela leitura automatizada do teste de exclusão de azul de tripan para tamanho, viabilidade e total de células para o híbrido 3A6.	49
Figura 12: Protocolo de tratamento para avaliação da heteroplasmia mitocondrial por RFLP.	52
Figura 13: Padrão de digestão da <i>Cl</i> I para mutação no gene mitocondrial <i>ND5</i> . A quantificação foi realizada pela análise dos produtos da reação de digestão enzimática após eletroforese em gel de agarose. Mutação homoplásmica: todos os mtDNA das mitocôndrias nas células apresentam a mutação no gene <i>ND5</i>	53
Figura 14: Pesos corpóreo (A), do coração (B), fígado (C) e rins (D) de ratos Wistar após tratamento de 4 semanas com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e a Alda-1 (8 mg/kg/semana). Os resultados são apresentados como média ± SE; M1, M2, M3 e M4 - momentos da amostragem: respectivamente, uma semana após o 1º, 2º, 3º e 4º tratamentos com as drogas. * p<0,05 com relação ao grupo controle.	56
Figura 15: Níveis lipídicos (média ± SE) de ratos Wistar após tratamento crônico com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e Alda-1 (8 mg/kg/semana). M1, M2, M3 e M4, momentos da amostragem: respectivamente, uma semana após o 1º, 2º, 3º e 4º tratamento com as drogas. ; # p<0,05 com relação ao Grupo Controle; * p < 0,05 com relação à DOX. ANOVA de duas vias.	58
Figura 16: Níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) cardíaco após tratamento múltiplo com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e a Alda-1 (8 mg/kg/semana). Os resultados são apresentados como média ± SE; M1, M2, M3 e M4, respectivamente, uma semana após a 1ª, 2ª, 3ª e 4ª, injeções com as drogas; ANOVA de duas vias: para comparar os grupos.	59
Figura 17: Análise de agrupamento mostrando a relação entre os níveis de expressão gênica nos grupos de ratos tratados com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1 (tratamento agudo).....	61
Figura 18: <i>Volcano plot</i> apresentando a significância estatística <i>versus</i> o <i>fold change</i> , respectivamente nos eixos y e x, da expressão normalizada de cada gene após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1. Genes hiperexpressos em vermelho e hipoexpressos em verde. A linha central indica os genes que não tiveram alterações nos níveis	

de expressão; a linha tracejada representa o limite de *fold change* = 2, limiar considerado para definir os genes diferencialmente expressos; a linha contínua representa o limite de significância estatística ($p=0,05$). Genes *Fabp4* e *Slc27a2* foram os únicos com diferença significativa nos níveis de expressão com *fold change* ≥ 2 62

Figura 19: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos grupos experimentais após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *fold change* ≥ 2 63

Figura 20: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos grupos com múltiplos tratamentos com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1. M1, M2 e M4, respectivamente, uma semana após as 1^a, 2^a e 4^a injeções. * $p < 0,001$ 64

Figura 21: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão do miR34a-5p após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$ e *fold change* < 2). 65

Figura 22: Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripano para as linhagens A9 e 3A6. Os dados são apresentados como média \pm SD; * $p < 0,05$ em comparação ao controle; # $p < 0,05$ em comparação a DOX 65

Figura 23: Número de mitocôndrias por célula para as linhagens celulares A9 e 3A6. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão ($n \geq 10$ imagens). 66

Figura 24: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura mitocondrial das células da linhagem A9 24 horas após o tratamento com a DOX e a Alda-1. A: cultura controle; B: células tratadas com a DOX. C: células e mitocôndrias tratadas com DOX + Alda-1. M: mitocôndria; Nuc: núcleo. 67

Figura 25: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura mitocondrial das células da linhagem 3A6 24 horas após o tratamento com a DOX e a Alda-1. A: cultura controle; B: células tratadas com a DOX. C: células e mitocôndrias tratadas com DOX + Alda-1. M: mitocôndria; Nuc: núcleo. 68

Figura 26: Quantificação da heteroplasmia mitocondrial para o gene *ND5* induzida pela doxorubicina (DOX). A: Gráfico da heteroplasmia de *ND5* obtido com dados do protocolo de 70 dias. B: Eletroforese em gel de agarose mostrando mitocôndrias com DNA selvagem (297 e 168 bp) e mutantes para o *ND5* (465 bp), e os respectivos gráficos com a porcentagem de DNAs mutantes nas linhagens 3A13, 3A6 e 3A20-30. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações e razões indicativas de pureza do RNA extraído do tecido cardíaco dos ratos dos estudos agudo e crônico	43
Tabela 2. Média (\pm SE) dos pesos corpóreo, do coração, rim e fígado de ratos Wistar após tratamento agudo com a doxorubicina e a Alda-1	55
Tabela 3. Perfil lipídico de ratos Wistar tratados com uma única dose de doxorubicina (DOX) e Alda-1	57
Tabela 4. Níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) cardíaco em ratos Wistar após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX - 4 mg/kg) e a Alda-1	59
Tabela 5. Genes relacionados às vias de β -oxidação de ácidos graxos diferencialmente expressos em tecido cardíaco de ratos Wistar após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX)	61
Tabela 6. Espécies moleculares de cardiolipina e suas respectivas concentrações para os diferentes tratamentos com as drogas.	69

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	Considerações Gerais	17
2.2	Mecanismos de Ação Antineoplásicos da Doxorubicina.....	21
2.2.1	<i>Interação com o DNA nuclear.....</i>	<i>21</i>
2.2.2	<i>Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....</i>	<i>22</i>
2.2.3	<i>Interação com Topoisomerases.....</i>	<i>23</i>
2.3	Efeitos Adversos do Tratamento com Doxorubicina.....	24
2.4	Mecanismos moleculares da cardiotoxicidade da Doxorubicina.....	25
2.5	Lipoperoxidação.....	30
2.6	Aldeído Desidrogenase Mitocondrial – ALDH2.....	32
2.7	Alda-1 [N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida].....	33
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Geral.....	36
3.2	Específicos.....	36
3.2.1	<i>Estudo in vivo - ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com a DOX.....</i>	<i>36</i>
3.2.2	<i>Estudo in vitro - fibroblastos e cíbridos submetidos ao tratamento com a DOX..</i>	<i>36</i>
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Estudo in vivo	37
4.1.1	<i>Animais e compostos químicos.....</i>	<i>37</i>
4.1.2	<i>Delineamento experimental.....</i>	<i>37</i>
4.1.3	<i>Análise de colesterol e frações.....</i>	<i>40</i>
4.1.4	<i>Lipoperoxidação - determinação do 4-hidroxinonenal (4-HNE).....</i>	<i>40</i>
4.1.5	<i>Coleta e armazenamento das amostras para os estudos de expressão gênica.....</i>	<i>41</i>
4.1.6	<i>Extração, quantificação e avaliação da integridade do RNA.....</i>	<i>41</i>
4.1.7	<i>Transcrição reversa - síntese do cDNA</i>	<i>43</i>
4.7.1.1	<i>Ensaio de expressão gênica por PCR – array.....</i>	<i>43</i>
4.7.1.2	<i>Ensaio de expressão dos genes ALDH2, Bax, Bcl-2 e CIQBP.....</i>	<i>43</i>
4.7.1.3	<i>Ensaio de expressão de microRNAs.....</i>	<i>44</i>
4.1.8	<i>Análise de expressão gênica por RT-qPCR</i>	<i>44</i>
4.1.8.1	<i>Expressão gênica por PCR - array.....</i>	<i>44</i>

4.1.8.2	<i>Expressão dos genes ALDH2, Bax, Bcl-2 e C1QBP</i>	45
4.1.8.3	<i>Expressão de microRNAs</i>	45
4.2	Estudo <i>in vitro</i>	46
4.2.1	<i>Linhagens celulares</i>	46
4.2.2	<i>Protocolo de tratamento das drogas</i>	47
4.2.3	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	49
4.2.4	Microscopia eletrônica de transmissão	50
4.2.5	<i>Shotgun lipidômico – determinação das espécies moleculares de cardiolipina</i>	50
4.2.6	<i>Extração de DNA</i>	51
4.2.7	<i>Análise de polimorfismos (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	52
4.3	Análise Estatística	53
5	RESULTADOS	43
5.1	Estudo <i>in vivo</i>	55
5.1.1	<i>Peso corpóreo e de órgãos isolados (coração, rim e fígado)</i>	55
5.1.2	<i>Perfil lipídico</i>	57
5.1.3	<i>Lipoperoxidação - determinação do 4-hidroxinonenal (4-HNE)</i>	58
5.1.4	<i>Expressão gênica</i>	60
5.1.4.1	<i>Genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos</i>	60
5.1.4.2	<i>Expressão dos genes ALDH2, Bax, Bcl-2 e C1QBP</i>	62
5.1.4.3	<i>Expressão do miR-34a-5p</i>	64
5.2	Estudo <i>in vitro</i>	65
5.2.1	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	65
5.2.2	<i>Microscopia eletrônica de transmissão – número de mitocôndrias e análise estrutural</i>	66
5.2.3	<i>Shotgun lipidômico – determinação das espécies moleculares de cardiolipina</i> ..	69
5.2.4	<i>Análise de polimorfismos (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	70
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÕES	85
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1. INTRODUÇÃO

A doxorubicina (DOX) é uma antraciclina isolada da actinobactéria *Streptomyces peucetius var. caesius*. Atualmente, sua forma sintética é rotineiramente utilizada como agente antineoplásico no tratamento de vários tipos de cânceres, incluindo o de mama, pulmão, tireóide, ovário, linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin e neoplasias pediátricas (Ewer & Ewer 2010; Thorn et al. 2011). Apesar da atividade quimioterápica, muitos estudos têm demonstrado o efeito cardiotoxíco dose-dependente e cumulativo da DOX, com amplo espectro de sintomas clínicos, que incluem desde arritmias até insuficiência cardíaca congestiva (ICC), condição, esta, com alta taxa de mortalidade. A incidência de ICC em pacientes sob tratamento com a DOX na dose cumulativa de 300 mg/m² é de aproximadamente 2%, aumentando para 20% em doses cumulativas de 550 mg/m² (Swain et al., 2003; Chatterjee et al., 2010; Rochette et al., 2015; Mitry & Edwards, 2016).

Diferentes mecanismos são apontados como responsáveis pela cardiotoxicidade promovida pela DOX. Entretanto, o mais aceito é aquele por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). A estrutura química da DOX é particularmente susceptível à redução reversível para o radical semiquinona altamente reativo, processo, este, que ocorre predominantemente no complexo I mitocondrial, integrante da cadeia transportadora de elétrons e que promove a geração de EROs (Simunek et al. 2009; Ghigo et al. 2016). Associado à evidência da alta afinidade da DOX à cardiolipina (fosfolípido que ocorre quase que exclusivamente na membrana interna mitocondrial), a mitocôndria tem sido identificada como o principal alvo subcelular ao dano induzido pela DOX no coração. A especificidade para o tecido cardíaco talvez seja resultado da alta densidade mitocondrial e contínua atividade metabólica, inerentes à função cardíaca (Octavia et al. 2012; Carvalho et al. 2014). Portanto, não é surpresa que alterações mitocondriais, como a diminuição do potencial de

membrana (Zhang et al. 2016; Pillai et al. 2016); o aumento da indução do poro de transição de permeabilidade (Carvalho et al. 2014); alterações mitocondriais estruturais (Peng et al., 2018); alterações na quantidade de cálcio (Ascensão et al. 2011; Mitry & Edwards 2016); danos no DNA mitocondrial (Ashley & Poulton 2009; Nitiss & Nitiss 2014; Pillai et al. 2016); diminuição das taxas de respiração (Montaigne et al. 2011; Kuznetsov et al. 2011); diminuição da atividade dos complexo da cadeia respiratória e supressão de ATP (Kuznetsov et al. 2011; Zhang et al. 2016) e a consequente falha bioenergética (Gratia et al. 2012; Carvalho et al. 2014) sejam identificados na insuficiência cardíaca induzida pela DOX. No entanto, além dessas alterações foi sugerido que a DOX exerce atividade cardiotoxicidade por meio da inibição da oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, com grande impacto, tendo em vista que estes representam importante substrato para a produção de energia no miocárdio adulto (Hong et al. 2002). Previamente, nosso Grupo de Pesquisa identificou aumento de danos no DNA, de desarranjo miofibrilar e necrose e diminuição da capacidade antioxidante total (TAP) no ventrículo esquerdo de ratos Wistar submetidos ao tratamento com a DOX, eventos que sugerem o envolvimento de diferentes mecanismos na cardiotoxicidade aguda e crônica (Segredo et al. 2014).

Normalmente, um dos principais alvos das EROs é a bicamada lipídica das membranas biológicas, especialmente os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs). A peroxidação dos PUFAs produz um arranjo de produtos primários de oxidação lipídica e eletrófilos, dentre os quais o 4-hidroxinonenal (4-HNE) tem sido um dos mais estudados (Ayala et al. 2014; Zhong & Yin 2015). O 4-HNE é considerado altamente reativo e citotóxico, com potencial para alterar grande variedade de macromoléculas. Foi estimado que 1% a 8% do 4-HNE formado nas células irão modificar proteínas, as quais, cerca de 30%, atuam no nível mitocondrial (Siems & Grune 2003; Zhao et al. 2014). Alguns estudos têm mostrado que o tratamento com a DOX aumenta os níveis do 4-HNE e seus adutos com

proteínas em mitocôndrias de cardiomiócitos, com significativa redução das atividades enzimáticas (Zhao et al. 2014; Hlaváčová et al. 2015). Como consequência, as alterações promovidas pelo 4-HNE modulam grande número de processos e podem potencializar a formação de EROs, alterar vias de sinalização celular, diminuir a função contrátil cardíaca e contribuir para a progressão de várias doenças cardiovasculares, incluindo a insuficiência cardíaca (Carvalho et al. 2014; Mali & Palaniyandi 2014).

A família aldeído desidrogenase NAD(P)⁺-dependente (ALDH) é uma classe de enzimas detoxificadoras que catalisa a remoção de aldeídos do organismo. Dentre estas, a ALDH mitocondrial (ALDH2) foi identificada como enzima fundamental para a proteção do coração contra o estresse oxidativo (Yoval-Sánchez & Rodríguez-Zavala 2012; Chen et al. 2014). Presente em órgãos que demandam alta capacidade mitocondrial para produção de ATP oxidativo, a ALDH2 tem habilidade de metabolizar produtos aldeídos endógenos derivados da peroxidação lipídica, como o 4-HNE (Chen et al. 2010). Diversos estudos em modelos animais mostram que a hiperexpressão da ALDH2 confere múltiplos benefícios ao tecido cardíaco e suas funções, enquanto seu silenciamento aumenta a susceptibilidade para o desenvolvimento de cardiomiopatias, incluindo a insuficiência cardíaca (Gong et al. 2012; Sun et al. 2014). Além disso, estudos epidemiológicos demonstram que indivíduos que carregam uma mutação de ponto no gene *ALDH2* (*ALDH2*2*), fato que resulta em dramática redução na atividade enzimática, são mais susceptíveis a doenças do coração (Chang et al. 2012).

Em condições de cardiotoxicidade promovida pela DOX, a ALDH2 é inibida pela formação de adutos com o 4-HNE, que, além de substrato, é potente inibidor da enzima. A inibição da ALDH2 é reversível em baixas concentrações, mas se torna irreversível quando a concentração de 4-HNE atinge 10 µM (Doorn et al. 2006; Chen et al. 2010). Portanto, a exposição à DOX, o que promove aumento de aldeídos tóxicos, especialmente do 4-HNE,

compromete severamente a função da ALDH2, contribuindo para a disfunção mitocondrial e consequente alterações cardíacas (Carvalho et al. 2014).

Levantamento realizado por Chen et al. em 2008, deu evidência a uma molécula com relevante potencial clínico, a Alda-1, ou ativador da ALDH2. Este agonista, que simultaneamente funciona como uma chaperona, aumenta a eficiência da atividade da ALDH2 tanto *in vitro* como *in vivo*, de duas formas: aumentando a atividade catalítica da ALDH2 por aproximadamente duas vezes (Chen et al. 2008a; Perez-Miller et al. 2010); e protegendo a atividade enzimática contra inativação induzida pelo 4-HNE, o que permite a manutenção da atividade catalítica mesmo na presença de altas concentrações de 4-HNE (Doorn et al. 2006; Chen et al. 2014). De fato, diversos estudos têm evidenciado a atividade cardioprotetora da Alda-1 em diferentes modelos animais em situação de toxicidade cardíaca. Foi observada, por exemplo, a redução de 60% do dano cardíaco após isquemia-reperfusão (Chen et al. 2008b); a supressão de anomalias mecânicas em cardiomiócitos, protegendo contra a disfunção contrátil induzida pelo etanol e estímulo à autofagia (Ge et al. 2011); a diminuição da disfunção do miocárdio induzida pela DOX por meio do 4-HNE (Sun et al. 2014).

Apesar do conhecimento acumulado, o tratamento efetivo para a redução da cardiotoxicidade induzida pela DOX não está ainda disponível. Este problema assume ainda maior relevância quando se considera que o número de pacientes com câncer, que passou por quimioterapia, vem aumentando todos os anos, com estimativas de 19 milhões em 2024, apenas nos Estados Unidos (DeSantis et al. 2014). É neste cenário, portanto, que a identificação de compostos efetivos contra os efeitos adversos da DOX assume grande importância.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações Gerais

A doxorubicina (DOX), também conhecida como Adriamycin®, Rubex® e Doxil®, pertence a uma classe de compostos de estruturas similares chamadas antraciclinas. A DOX foi descoberta em 1967 (Bonadonna et al. 1969), a partir de uma linhagem mutada da bactéria *Streptomyces peucetius*, e consiste de um anel tetracíclico com uma quinona-hidroquinona como grupos adjacentes (aglicona) e um amino açúcar, a daunosamina, ligada a um dos anéis por uma ponte glicosídica (Figura 1). Devido a estas características, a DOX apresenta tanto regiões hidrofílicas quanto hidrofóbicas, permitindo que se ligue a proteínas plasmáticas e a membranas celulares (Tacar et al. 2013; Carvalho et al. 2014; Renu et al. 2018). A DOX é também anfotérica, podendo se comportar como ácido ou base. Portanto, trata-se de um composto versátil, com capacidade para atingir vários compartimentos celulares e interagir com diferentes biomoléculas. A DOX pode ser reduzida dentro da célula em doxorubicinol, metabólito que também apresenta atividade biológica (Mitry & Edwards 2016).

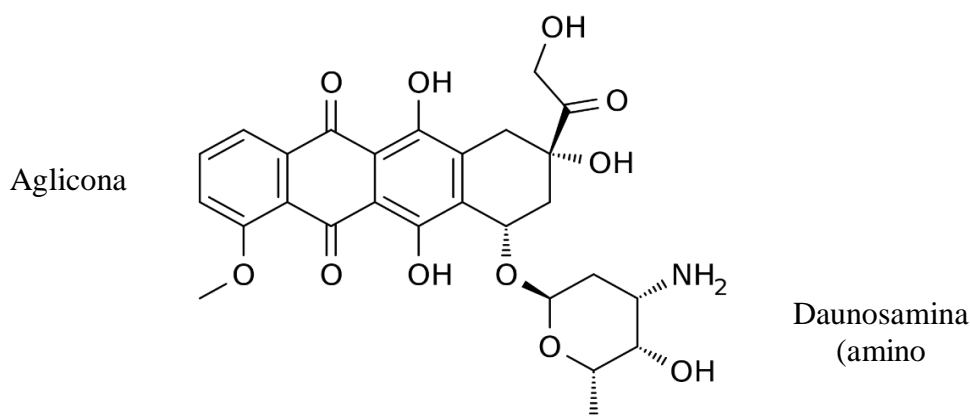


Figura 1: Estrutura química da doxorubicina (Adriamycin®; 10-[(3-amino-2,3,6 trideoxya-L-lyxohexopyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8 (hydroxyacetyl)-1-methoxy-5,12-naphthacenedione). Modificado de (Zagotto et al. 2001).

A DOX é uma das antraciclinais antitumorais mais utilizadas, sendo altamente eficaz contra ampla variedade de neoplasias, mesmo em baixas concentrações (Bonadonna et al. 1970). Os primeiros estudos realizados em modelos animais demonstraram a eficácia da DOX na inibição da proliferação neoplásica e o aumento da sobrevivência animal (Bonadonna et al. 1969). A eficácia da DOX foi testada em diferentes tipos de cânceres humanos, como leucemias, linfomas e tumores ginecológico, urogenital, endócrino e gástrico, bem como em sarcomas de Ewing e Kaposi (Carvalho et al. 2014). Devido à eficácia, desde a descoberta de suas propriedades citostáticas, a DOX se tornou um dos agentes antineoplásicos mais prescritos (Renu et al. 2018).

Vários estudos de farmacocinética foram conduzidos para avaliar as opções de tratamento com a DOX, isolada ou em combinação com múltiplos agentes, e contra ampla variedade de neoplasias. Tipicamente, a DOX é administrada como uma infusão intravenosa de 40-75 mg/m² repetida em intervalos de 3 a 4 semanas, com monitoramento da dose cumulativa para que não exceda a concentração de 450-550 mg/m² (Wallace 2003). A DOX é distribuída rapidamente para os tecidos (o que é evidenciado pela rápida diminuição dos níveis sanguíneos) e, assim como a maioria das drogas, entra na célula via difusão passiva, geralmente acumulando-se no meio intracelular em concentrações de 10 a 500 vezes superiores às encontradas em compartimentos extracelulares (Tacar et al. 2013). A alta habilidade para penetrar nos tecidos e se manter no meio intracelular, e as propriedades intercalantes no DNA, estão diretamente associadas às características lipofílicas da DOX (Tacar et al. 2013). Uma vez no interior da célula, a DOX é encontrada no núcleo e em organelas como mitocôndria, lisossomos e aparelho de Golgi (Tacar et al. 2013; Yang et al. 2014).

2.2 Mecanismos de Ação Antineoplásica da Doxorrubicina

Os mecanismos de ação da DOX em células tumorais envolvem, essencialmente, a interação com o núcleo, mitocôndria e membranas biológicas, embora esses alvos sejam também afetados em células não neoplásicas. Os principais mecanismos apontados como responsáveis pelo efeito antitumoral da DOX incluem: (1) intercalação no DNA, levando à inibição da replicação e síntese de proteínas; (2) produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando a dano no DNA e/ou à peroxidação lipídica; (3) interferência na separação das fitas e atividade da helicase no DNA; (4) ação direta sobre a membrana celular com rompimento da estrutura da bicamada; e (5) dano no DNA via inibição da topoisomerase II (Simůnek et al. 2009; Carvalho et al. 2014; Yang et al. 2014; Pillai et al. 2016).

2.2.1 Interação com o DNA nuclear

A DOX tem maior probabilidade de intercalar-se no DNA em locais que apresentam pares de base G-C, provavelmente devido à especificidade para a formação de pontes de hidrogênio com a guanina (Figura 2). A interação entre a DOX e o DNA pode ser estabilizada por uma ligação covalente mediada pelo formaldeído celular gerado por reações com radicais livres provenientes de fontes de carbono, como, por exemplo, os lipídios. Apesar da evidência da formação de adutos de DNA durante o tratamento com a DOX, é pouco provável que este seja o principal mecanismo de ação anti-tumoral da DOX, tendo em vista que doses clínicas resultam em somente $4,4 \pm 1,0$ adutos/ 10^7 pares de base do DNA, o que representa uma pequena fração do total da DOX intracelular (Coldwell et al. 2008; Yang et al. 2014).

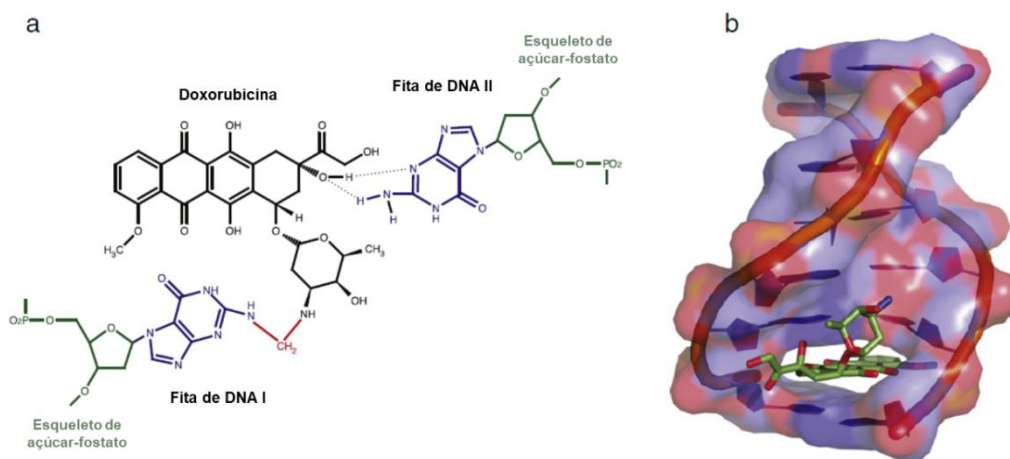


Figura 2: Estrutura do complexo doxorrubina-DNA. (a) A doxorrubina forma ligação covalente (vermelho) com a guanina em uma das fitas do DNA e pontes de hidrogênio com a guanina na fita oposta; (b) estrutura da intercalação da doxorrubina no DNA. Modificado de Yang et al. (2014).

2.2.2 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de EROs na citotoxicidade promovida pela DOX é complexa. Entretanto, está bem estabelecido que sob condições adequadas a estrutura química da DOX é capaz de gerar grande quantidade de EROs. Sua estrutura quinona permite que a DOX atue como um aceptor de elétrons em reações mediadas por oxireductases. Nessa situação ocorre a redução univalente da DOX para um radical semiquinona instável e altamente reativo, o qual pode ter três diferentes destinos: (1) redução posterior para hidroquinona; (2) formação de adutos covalentes com o DNA ou proteínas; (3) transferência do elétron não pareado para outro aceptor mais favorável gerando EROs mais estáveis (Wallace 2003). O ciclo redox com a liberação de EROs é estabelecido como o mecanismo primário responsável pela toxicidade da DOX (Figura 3). As EROs produzidas nesse processo não difundem para muito distante dos seus locais de origem. Sendo assim, o tipo e extensão da toxicidade tecidual promovida pela DOX é determinada, em grande parte, pela distribuição tecido-específica das enzimas capazes de catalisar tal reação. Com um potencial redox univalente de aproximadamente -320 mV, a

DOX é um substrato favorável para a redução por um grande número de oxidoreduases, como por exemplo a NADH desidrogenase do Complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Dessa forma, talvez sejam indiscriminadamente liberados radicais livres dentro do citoplasma, ou através de várias estruturas celulares, com diferentes fontes de origem, dependendo da relativa abundância dos respectivos sistemas de oxireduases característicos de cada tipo celular (Wallace 2003; Tacar et al. 2013; Carvalho et al. 2014).

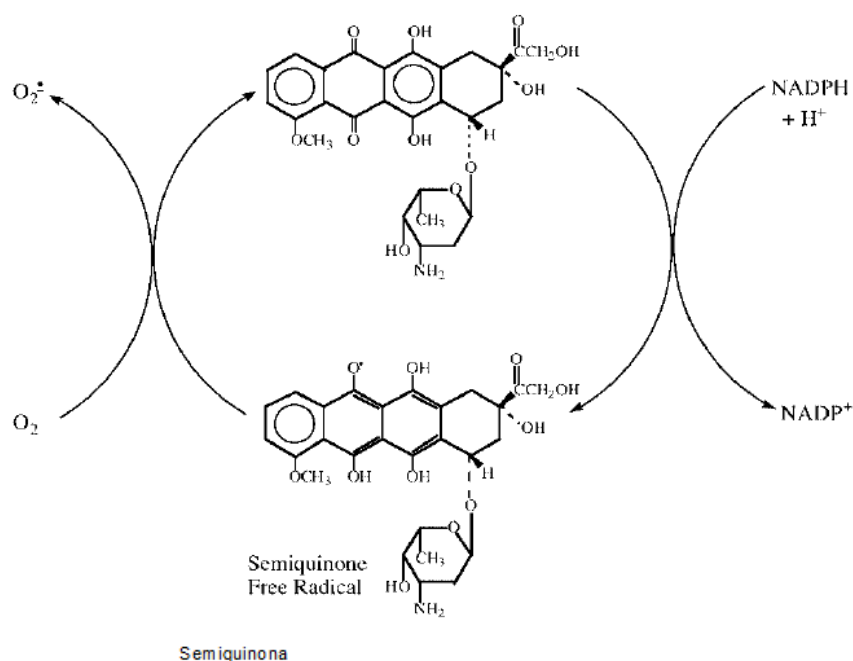


Figura 3: Via metabólica ilustrando a redução univalente da doxorubicina para seu radical livre intermediário semiquinona. Na presença de O_2 a doxorubicina pode se auto-oxidar gerando ânions superóxidos, revertendo a estrutura química inicial. Modificado de Wallace et al. (2003) e Carvalho et al. (2014).

2.2.3 Interação com Topoisomerases

Apesar da função oxidante da DOX ser originalmente identificada como singular, tem se tornado evidente que a interação desse composto antineoplásico com topoisomerases é de importância primária. As topoisomerases são proteínas altamente conservadas e presentes em todos os organismos, com a função de regular a topologia do DNA, a fim de facilitar sua

replicação e transcrição e outros processos nucleares. Várias drogas antineoplásicas e antibacterianas, como a camptotecina e o etoposido, têm as topoisomerases como alvo para promover a morte celular (Pommier et al. 2010; Yang et al. 2014). Tem sido sugerido que a DOX atua de forma similar sobre a topoisomerase II, enzima ATP-dependente que existe em duas isoformas em seres humanos, a topoisomerase II α e a topoisomerase II β . Além disso, há evidências que os níveis da topoisomerase II são que determinam o efeito do tratamento com a DOX em linfoma de camundongos (Burgess et al. 2008), embora existam dados que mostram que a DOX causa morte celular independente da topoisomerase II, e que a paralisação desta enzima nos locais de clivagem não é o único mecanismo anti-tumoral da droga (Swift et al. 2006; Yang et al. 2014).

2.3 Efeitos Adversos do Tratamento com a Doxorrubicina

O uso da DOX é principalmente limitado pelos seus efeitos adversos. Durante testes preliminares de toxicidade em pacientes observaram-se, em um primeiro momento, diferentes efeitos, incluindo náusea, vômito e febre, e, posteriormente, significativa incidência de alterações cardiovasculares (Takemura & Fujiwara 2007; Pedrycz & Kramkowska 2016). Estudo com sobreviventes de câncer, 4 a 20 anos após o tratamento, mostrou diminuição significativa do percentual de sangue ejetado para a aorta na sístole (fração de ejeção) e de alterações na cavidade do ventrículo esquerdo, sendo estas dependentes da dose cumulativa de DOX (Ganz et al. 2008; Armstrong et al. 2012). Estudos revelaram, também, que cerca de 2% a 3% dos pacientes que passaram por transplante de coração, o tratamento com a DOX estava como a causa principal (Chatterjee et al. 2010a). Atualmente, as cardiomiopatias são consideradas como os mais importantes e limitantes efeitos adversos da DOX.

O dano agudo promovido pelo tratamento com a DOX ocorre rapidamente após uma única dose, com manifestações clínicas que podem acontecer em poucos minutos ou até semanas após o início da administração. Essas manifestações podem incluir anomalias eletrofisiológicas transientes, como mudanças não-específicas nas ondas ST e T (repolarização ventricular), achatamento da onda T, diminuição da voltagem para o complexo QRS (despolarização ventricular), prolongamento do intervalo entre as ondas Q e T, observadas em 20% a 30% dos pacientes, e taquicardia sinusal e aritmias supra ventriculares (Carvalho et al. 2014). Por outro lado, os efeitos adversos crônicos são mais graves, irreversíveis e envolvem o desenvolvimento de cardiomiopatias e, em último caso, insuficiência cardíaca, condição com alta taxa de mortalidade (Swain et al. 2003).

A incidência de cardiotoxicidade crônica, ou seja, aquela resultante da exposição prolongada a várias doses da DOX, é muito mais baixa, com valor de 1,7%, e é usualmente evidente a partir de 30 dias após a administração, mas podendo ocorrer de 6 a 20 anos após o tratamento. A incidência da cardiotoxicidade promovida pela DOX é diretamente associada à concentração administrada e é de aproximadamente 4% em doses de 500-550 mg/m², 18% entre 551-600 mg/m² e 36% quando a dose excede 600 mg/m². O prognóstico para pacientes tratados com a DOX e que desenvolveram insuficiência cardíaca é ruim, com taxa de mortalidade de aproximadamente 50% no intervalo de um ano (Chatterjee et al. 2010a). Diferenças no tempo de manifestação da cardiotoxicidade aguda e crônica da DOX sugerem diferentes mecanismos moleculares para cada um dos processos (Segredo et al. 2014).

2.4 Mecanismos Moleculares da Cardiotoxicidade da Doxorubicina

Múltiplos mecanismos estão envolvidos na cardiotoxicidade promovida pela DOX (Zhang et al. 2012; Pillai et al. 2016; Renu et al. 2018). A longa lista de mecanismos

propostos para explicar as alterações induzidas pela droga demonstra que a causa é complexa, porém a produção de EROs, disfunções mitocondriais e bioenergéticas e apoptose, são as prováveis causas primárias (Carvalho et al. 2014). A problemática na investigação dos mecanismos de cardiotoxicidade da DOX deriva da grande quantidade de vias secundárias que são ativadas pelas alterações iniciais (Mitry & Edwards 2016). O coração é particularmente susceptível ao dano oxidativo induzido pela DOX devido à grande densidade e volume das mitocôndrias (fontes e alvos importantes das EROs), à elevada taxa de consumo de oxigênio e à baixa quantidade de defesas antioxidantes, comparadas a tecidos como, por exemplo, do fígado (Kaiserová et al. 2007). Acredita-se que em virtude à grande densidade mitocondrial no tecido cardíaco (até 35% do volume celular) o Complexo I mitocondrial NADH-desidrogenase seja a principal enzima envolvida no ciclo redox da DOX, levando à produção de EROs por mecanismos já anteriormente descritos (Wallace 2003). Além disso, a DOX pode ser retida na membrana mitocondrial interna por meio da formação irreversível de um complexo com a cardiolipina, com severas implicações na dinâmica da organela, tendo em vista que as proteínas da cadeia respiratória requerem ligações com este fosfolípido para que operem adequadamente. Tem sido evidenciado que a ruptura da interface cardiolipina-proteínas mitocondriais promovida pela DOX potencializa a produção de radicais superóxidos (O_2^-) (Schlame et al. 2000), e que a produção de EROs também induzida pela droga pode danificar fosfolípidios das membranas biológicas, aumentando a permeabilidade e inativando receptores e outras enzimas.

Aryal e Rao (2016) identificaram em pacientes portadores da síndrome de Barth, uma desordem genética severa que leva à redução da concentração e alteração da composição da cardiolipina e à diminuição da sensibilidade ao tratamento com a DOX. Nos linfócitos B dos indivíduos portadores da síndrome, a diminuição da sensibilidade pode ser resultado da redução da produção de EROs e lipoperoxidação, e maior produção de ATP em comparação

aos linfócitos de indivíduos saudáveis, com níveis normais de cardiolipina. Segundo os autores, uma deficiência na produção da cardiolipina compromete a formação do complexo DOX-cardiolipina nas mitocôndrias, diminuindo o efeito da DOX sobre as organelas e conferindo aos portadores da síndrome a vantagem terapêutica de serem menos susceptíveis à toxicidade promovida pela droga.

Devido às evidências descritas, a mitocôndria vem sendo considerada a organela mais extensiva e progressivamente afetada na cardiotoxicidade induzida pela DOX (Mitry & Edwards 2016). O comprometimento do metabolismo mitocondrial e, conseqüentemente, celular, tem sérias implicações para o tecido cardíaco, uma vez que essas organelas são responsáveis por mais de 90% do ATP produzido nos cardiomiócitos (Octavia et al. 2012). De fato, diversos estudos têm mostrado a extensa gama de alterações mitocondriais decorrentes da exposição à DOX, tais como: (1) diminuição no potencial de membrana (Zhang et al. 2016; Pillai et al. 2016); (2) perda da capacidade de acúmulo de cálcio devido ao aumento na indução do poro de transição de permeabilidade (Ascensão et al. 2011); (3) dano direto no mtDNA pela formação de adutos, ou indiretamente via produção de EROs, promovendo oxidação do mtDNA (Carvalho et al. 2014); (4) bloqueio da importação e inibição da β -oxidação de ácidos graxos mitocondriais (Tokarska-Schlattner et al. 2006); (5) alterações estruturais (Yin et al. 2018); entre outras (Renu et al. 2018).

Uma hipótese que ainda deve ser mais profundamente explorada é a possibilidade de que o dano mitocondrial adquirido durante a exposição aguda à DOX é progressivamente acumulado mesmo na ausência desta antraciclina, levando, posteriormente, à inibição da capacidade bioenergética da organela. O bloqueio inicial da cadeia respiratória pela ligação da DOX à cardiolipina, ou sua interação diretamente com o mtDNA, pode favorecer tanto direta quanto indiretamente o aumento da produção das EROs que, por sua vez, potencializa as alterações mitocondriais. Este ciclo vicioso talvez continue mesmo após a ausência de

exposição à DOX e representa, ou contribui, para os mecanismos moleculares da dose memória observada clinicamente nas cardiomiopatias que se manifestam tardiamente (Figura 4) (Lebrecht et al. 2003). As lesões oxidativas no mtDNA induzidas pela DOX contribuem para uma progressiva diminuição da capacidade mitocondrial, subclínica, até que um certo limite seja ultrapassado (Carvalho et al., 2014). Tais lesões podem, eventualmente, promover mutações no mtDNA e produzir um quadro conhecido como heteroplasmia. Considerando o fato de que existem múltiplas cópias de mtDNA em cada célula, heteroplasmia mitocondrial é uma condição na qual a célula apresenta uma mistura de mtDNA do tipo selvagem e mutante, com a porcentagem de mtDNA mutados podendo variar de 1% a 99%. Diferentes doenças ligadas a mutações no mtDNA se manifestam dentro de um quadro de heteroplasmia, como por exemplo a síndrome de MELAS (encefalomiopatia mitocondrial) e de MERRF (epilepsia mioclônica com fibras vermelhas) (Stewart & Chinnery 2015).

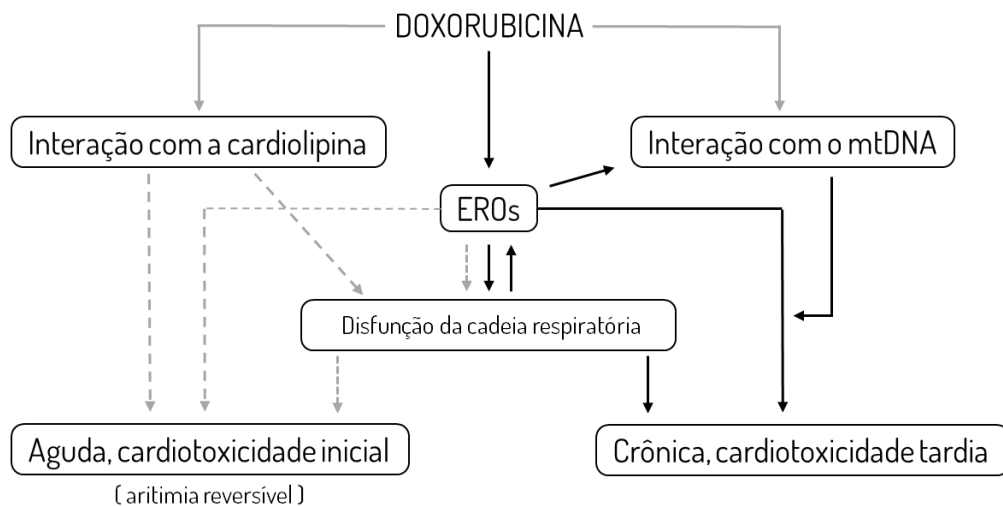


Figura 4: Mecanismo proposto para o efeito cardiotoxico da doxorubicina (DOX) em longo prazo. Em cinza, efeitos na presença da DOX; em preto, efeitos em longo prazo sem contato com a droga. Modificado de Lebrecht et al. (2003).

A primeira evidência clara relacionando mutações no mtDNA a doenças humanas veio do estudo de doenças neuromusculares, no final da década de 80, quando dois trabalhos

independentes publicados nos periódicos *Nature* e *Science* identificaram mutações patogênicas no mtDNA (Holt et al. 1988; Wallace et al. 1988). Com o avanço das técnicas moleculares, na década seguinte houve uma expansão de descrições de mutações de ponto e deleções no mtDNA em pacientes com uma variedade de fenótipos clínicos. Posteriormente, identificou-se que o nível de heteroplasmia estava correlacionado à extensão do envolvimento do órgão e que a alteração bioquímica era usualmente severa nos tecidos afetados (Stewart & Chinery, 2015).

Para mutações em condição de heteroplasmia, os estudos *in vitro* utilizando cíbridos como linhagens celulares foram importantes para a identificação dos padrões de mutações no mtDNA e o fenótipo observado. Cíbrido ou híbrido citoplasmático é uma linhagem celular eucariótica produzida pela fusão de uma célula inteira com um citoplasto (célula enucleada) que retêm suas mitocôndrias. Esta célula híbrida mescla, então, genes nucleares de uma célula com os genes mitocondriais de outra, permitindo, assim, estudar o efeito de variantes do mtDNA sem a interferência do genoma nuclear. Nesse sistema, a partir da transferência do mtDNA de um indivíduo com uma condição em particular ou doença, é possível gerar e expandir os cíbridos resultantes e utilizá-los para avaliar marcadores moleculares e bioquímicos e comparar com linhagens celulares de cíbridos de doadores controle, sem a alteração. Devido às mesmas condições ambientais (parâmetros de cultura) e núcleo, as diferenças observadas nos índices mensurados refletem diferenças no mtDNA. Tais estudos *in vitro* utilizando cíbridos mostraram que a proporção de mtDNA mutado deve exceder a um limite crítico (tipicamente entre 60%-80%) antes da alteração bioquímica ser identificada (Wilkins et al. 2014; Stewart & Chinery 2015).

Por diferentes mecanismos, como segregação vegetativa e replicação relaxada, uma mutação afetando poucas moléculas de mtDNA pode atingir altas frequências dentro de uma população e contribuir para uma alteração bioquímica e comprometimento da função

mitocondrial. Este mecanismo, apesar de ainda não ter sido investigado sob condições de toxicidade da DOX, pode explicar a toxicidade tardia, muitas vezes observada décadas após o tratamento (Chatterjee et al., 2010a; Stewart & Chinery, 2015).

2.5 Lipoperoxidação

O aumento de EROs nas mitocôndrias favorece a lipoperoxidação (Hrelia et al. 2002; Carvalho et al. 2014). É sabido que os ânions superóxido (O_2^-), gerados por exemplo na interação da DOX com a NADH desidrogenase do Complexo I mitocondrial, podem provocar a oxidação de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) nas membranas mitocondriais por meio de uma reação em cadeia que leva à formação de hidroperóxidos de lipídeos como produtos primários (Yin et al. 2011). Alguns desses produtos de oxidação primária podem se decompor levando à formação de eletrófilos, dentre os quais o aldeído 4-hidroxinonal (4-HNE), um dos produtos de lipoperoxidação mais bioativos e, portanto, mais estudados (Zhong & Yin 2015).

O 4-HNE foi primeiramente identificado na década de 1960, porém seu potencial citotóxico somente foi evidenciado na década de 80, na investigação do processo de peroxidação lipídica no fígado (Schauenstein 1967; Benedetti et al. 1980). Os 4-hidroxicenonas, grupo que inclui o 4-HNE, são os produtos de maior relevância no processo de liperoxidação, tendo em vista que são produzidos em grandes quantidades e apresentam alta capacidade para reagir com moléculas próximas. Particularmente o 4-HNE, é considerado o principal produto tóxico gerado, devido à rápida capacidade de reagir com grupos tiol e amina, e por sua habilidade em modular grande número de processos, principalmente por meio da formação de adutos covalentes com núcleos funcionais de proteínas, ácidos nucleicos e lipídios de membranas (Ayala et al. 2014).

Vários estudos têm mostrado que a mitocôndria pode ser tanto um alvo constante, como, também, uma importante fonte de produção do 4-HNE. Por mecanismos já descritos, a cardiolipina pode ser oxidada pelas EROs levando à formação do 4-HNE (Zhong et al. 2014). O impacto das alterações mitocondriais pode ser então observado pela mudança estrutural na própria cardiolipina (impactando a mitocôndria como um todo, devido ao papel central desse fosfolípido na função da organela), como pelo o aumento do 4-HNE mitocondrial. De fato, as alterações mitocondriais têm sido relatadas como decorrentes da interação entre o 4-HNE e componentes da maquinaria mitocondrial. Estudos revelaram que o 4-HNE inibe a atividade da sirtuína mitocondrial 3 (SIRT 3) se ligando ao aminoácido Cys280 e promovendo alterações na regulação da expressão gênica e controle metabólico. Tais alterações têm sido identificadas em doenças cardiovasculares e durante o processo de envelhecimento (LoPachin & Gavin 2014; Ansari et al. 2017). Além disso, o aumento do 4-HNE foi associado à diminuição da produção de ATP, ao consumo de oxigênio e à indução de apoptose prematura via formação de adutos com a MAP quinase JNK (c-jun-N-terminal quinase) (Breitzig et al. 2016). Outro estudo mostrou que 30% dos adutos formados com o 4-HNE e proteínas no ambiente celular são localizados nas mitocôndrias, e a maioria associada à cadeia transportadora de elétrons, tendo estas alterações uma relação direta com a diminuição das funções da organela em cardiomiócitos de camundongos (Zhao et al. 2014). A associação entre o 4-HNE e alterações no tecido cardíaco, foi também mostrada em outros estudos. Mak et al. (2000) encontraram aumento das concentrações do 4-HNE no plasma de pacientes com quadro de insuficiência cardíaca; Calamaras et al. (2015) mostraram que adutos do 4-HNE com proteínas também ocorrem no miocárdio de pacientes com a mesma cardiopatia.

2.6 Aldeído Desidrogenase Mitocondrial – ALDH2

Existe uma importante via de detoxificação que possibilita a conversão do 4-HNE para espécies químicas menos reativas, controlando, assim, seus níveis dentro da célula. Atuam sobre essa via uma classe de enzimas detoxificadoras catalisadoras da remoção de aldeídos tóxicos no organismo, as aldeído desidrogenase NAD(P)⁺-dependente (ALDH). Dentre as 19 isoenzimas que compõem a família ALDH, a aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2) destaca-se por ser aquela com maior atividade na remoção desses aldeídos (Gao et al. 2015). A ALDH2 é uma enzima tetramérica com quatro subunidades idênticas de ~56 kDa, codificada pelo núcleo e exclusivamente localizada na matriz mitocondrial. A ALDH2 é altamente expressa no fígado e em órgãos que requerem alta capacidade mitocondrial para geração de ATP oxidativo como o coração e o cérebro, e é mais conhecida e estudada por sua participação no metabolismo do etanol (Pang et al. 2017). A ALDH2 também possui capacidade de metabolizar uma variedade de aldeídos alifáticos de cadeia curta, bem como aldeídos policíclicos aromáticos, fornecendo importante proteção enzimática contra esses agentes tóxicos. Em particular, a ALDH2 desempenha papel importante na oxidação de aldeídos endógenos que surgem do processo de lipoperoxidação, como o 4-HNE (Chen et al. 2014)

Muitas evidências têm apontado para o papel da ALDH2 na prevenção e como causa de doenças e na citoproteção. Estudos utilizando camundongos *knockouts* identificaram que a ausência de expressão da ALDH2 está diretamente associada ao aumento de dano tecidual, modificações no DNA, disfunção cardíaca e formação de adutos com o 4-HNE (Yu et al. 2009). Por outro lado, a hiperexpressão da ALDH2 foi associada a significativa redução de adutos com o 4-HNE e proteção contra estresse oxidativo em fígado, coração e cérebro (Chen et al. 2010). Camundongos transgênicos com mutação no gene que codifica a enzima

ALDH2, a qual reduz drasticamente sua atividade, apresentam envelhecimento precoce, aumento de adutos com o 4-HNE, aumento do estresse mitocondrial e remodelamento metabólico (Chen et al. 2014). A ALDH2 tem emergido rapidamente como uma enzima crucial na proteção do coração contra o estresse oxidativo. A capacidade dessa enzima como a principal metabolizadora do 4-HNE, a tornam importante alvo para estudos de cardioproteção. Utilizando diferentes abordagens para aumentar a atividade da enzima, foi mostrado que a ALDH2 protege contra doenças cardiovasculares aguda e crônica (Chen et al. 2010). O potencial cardioprotetor da ALDH2 tem sido também evidenciado por estudos epidemiológicos, que mostram que indivíduos com uma mutação de ponto no gene *ALDH2*2*, a qual resulta em dramática redução da atividade enzimática, são mais susceptíveis a doenças cardíacas e a morbidades associadas (Bian et al. 2010).

2.7 Alda-1 [N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida]

O potencial cardioprotetor da ALDH2 tem estimulado a identificação de moléculas que possam efetivamente potencializar sua ação contra aldeídos tóxicos, favorecendo, assim, a cardioproteção sob diferentes condições. Nesse cenário, o grupo da pesquisadora Dra Daria Mochly-Rosen, da Universidade de Stanford, Estados Unidos, realizou uma busca em bibliotecas de compostos visando a identificação de moléculas com esse potencial. Uma família de agonistas da isoenzima ALDH2 chamadas Aldas, demonstrou importante potencial, especialmente a molécula Alda-1 [N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida] (Chen et al. 2008a). Foi mostrado que a Alda-1: (1) aumenta especificamente a atividade catalítica da enzima ALDH2 em aproximadamente duas vezes; (2) protege a atividade enzimática da ALDH2 da inativação pelo 4-HNE, o que permite que a enzima mantenha sua atividade catalítica mesmo na presença de altas concentrações de 4-HNE; (3) aumenta a

atividade da variante mutada, ALDH2*2, em aproximadamente 11 vezes, aproximando sua atividade a do tipo selvagem da enzima (Chen et al. 2008b; Perez-Miller et al. 2010; Chen et al. 2014).

A análise estrutural da interação entre a Alda-1 e a ALDH2 mostrou que a Alda-1 se liga ao túnel catalítico da enzima próximo aos aminoácidos Cys302 e Glu286, alvos críticos para a catálise do substrato (Figura 5). A ligação da Alda-1 próximo ao substrato potencialmente favorece a interação produtiva entre moléculas de água ativadas e o intermediário tioacil do substrato, resultando em acelerado processo de hidrólise e liberação do produto catalítico. A proximidade entre a Alda-1 e o Cys302 provavelmente também protege este essencial resíduo catalítico do ataque de aldeídos reativos como o 4-HNE. Portanto, a Alda-1 atua como agonista, e simultaneamente como uma chaperona química, exercendo seu efeito alostérico para restaurar a alteração estrutural que compromete a atividade catalítica da enzima (Chen et al. 2010; Chen et al. 2014).

De fato, estudos têm mostrado o aumento da atividade catalítica da ALDH2 após administração da Alda-1, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Chen et al. (2008) identificaram que o aumento da atividade da enzima via Alda-1 reduziu em 60% o tamanho do infarto do miocárdio em ratos. No mesmo estudo os autores observaram que a inibição da atividade da ALDH2 pelo 4-HNE após isquemia-reperfusão, evento que promove aumento do estresse oxidativo, foi totalmente prevenida pela Alda-1, e os níveis de 4-HNE reduzidos quando comparados ao grupo controle. Resultados similares de cardioproteção foram obtidos por outros autores, também investigando, *in vivo*, os efeitos deletérios nos cardiomiócitos após isquemia-reperfusão (Lagranha et al. 2010; Gong et al. 2012). Ge et al. (2011) demonstraram que o uso da Alda-1 protege células cardíacas da disfunção contrátil e exacerbada autofagia induzidas pelo etanol. A administração da Alda-1 a camundongos tratados com etanol também normalizou a quantidade de cálcio intracelular em cardiomiócitos, eliminou as

anomalias mecânicas e reduziu a atividade da caspase-3, componente chave da morte celular programada. Esses resultados evidenciam, portanto, o potencial da Alda-1 na proteção contra dano cardíaco causado por aldeídos tóxicos que podem ser acumulados por diferentes processos, incluindo a exposição à DOX.

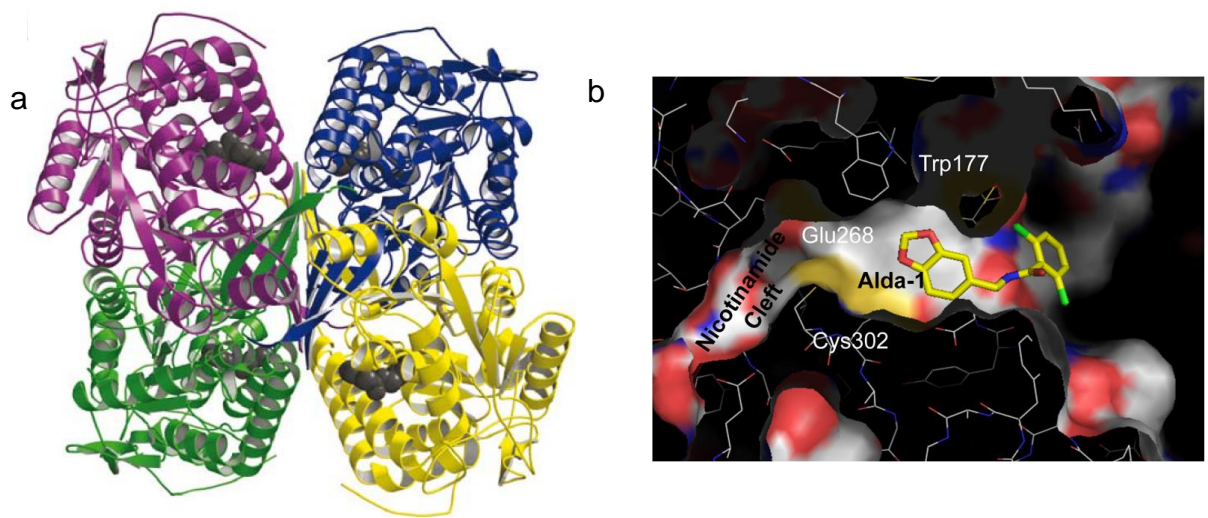


Figura 5: Estrutura da ligação da ALDH2 com a Alda-1. (a) Estrutura do tetrâmero da ALDH2 com diferentes cores mostrando as subunidades individuais e as 4 ligações com as moléculas de Alda-1, representadas em cinza. (b) Estrutura da Alda-1 no túnel catalítico da ALDH2. Em destaque estão os aminoácidos críticos para esta interação. Modificado de Perez-Miller et al. (2010) e Chen et al. (2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Este estudo teve como objetivo investigar os mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade da DOX e o potencial cardioprotetor da Alda-1.

3.2 Específicos

3.2.1 Estudo in vivo - ratos Wistar machos submetidos ao tratamento com a DOX:

- avaliar a dosagem sérica de lipídios;
- avaliar, em cardiomiócitos, o perfil de expressão de genes envolvidos nas vias de beta oxidação de ácidos graxos, estresse oxidativo e apoptose;
- avaliar o perfil de expressão do gene *ALDH2* em cardiomiócitos;
- avaliar, em cardiomiócitos, a expressão do microRNA miR-34a regulador do gene *ALDH2*;
- avaliar o processo de lipoperoxidação em cardiomiócitos;
- avaliar o potencial protetor da Alda-1 sobre os parâmetros acima mencionados.

3.2.2 Estudo in vitro - fibroblastos e híbridos submetidos ao tratamento com a DOX:

- avaliar a viabilidade celular;
- avaliar o percentual de heteroplasmia mitocondrial;
- avaliar alterações estruturais em mitocôndrias;
- avaliar o perfil das espécies moleculares da cardiolipina;
- avaliar o potencial protetor da Alda-1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estudo *in vivo*

4.1.1 Animais e compostos químicos

Foram utilizados ratos adultos machos da linhagem Wistar, com idade entre 4 e 8 semanas e peso aproximado de 150 g, adquiridos do Biotério da ANILAB (Animais de Laboratório Criação e Comércio), Paulínia-SP. Os animais foram mantidos em gaiolas (4 por gaiola) no Biotério da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) da Faculdade de Medicina (FMB) – UNESP – Botucatu, sob temperatura (24°C) e ciclo de luz (12h claro/12h escuro) controlados e recebendo água e ração comercial *ad libitum*. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMB – UNESP - (CEUA 1023/2013).

Os compostos doxorubicina (DOX) e Alda-1 foram adquiridos, respectivamente, da Sigma-Aldrich e Tocris Bioscience, e administrados por via intraperitoneal (i.p.). A DOX foi diluída em soro fisiológico (NaCl 0,9%), na concentração de 2 mg/mL; a Alda-1 foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck), na concentração de 20 mg/mL. Os anestésicos cetamina (40%) / xilazina (25%), diluídos em soro fisiológico e administrados por injeção intraperitoneal, foram utilizados para a eutanásia dos animais, para a obtenção das amostras biológicas.

4.1.2 Delineamento experimental

Foram realizados dois protocolos de tratamento: o primeiro, protocolo de tratamento agudo, em que os animais receberam uma única dose da DOX (4mg/kg) e da Alda-1

(8mg/kg), ambas por via intraperitoneal; o segundo, protocolo de tratamento crônico, no qual os animais foram tratados com quatro doses das drogas, de acordo com o protocolo anteriormente utilizado por Segredo et al. (2014), que se mostrou efetivo na indução de efeitos tóxicos pela DOX. Em ambos os protocolos, a eutanásia dos animais do grupo controle negativo (sem nenhum tratamento; n= 6) ocorreu 24h antes do início dos tratamentos dos demais grupos. No estudo agudo, a eutanásia sempre ocorreu 24h após o tratamento com uma única dose das drogas ou com seus respectivos veículos de diluição: DOX (n=8); Alda-1 (n=6); Alda-1+DOX + (n=8); soro fisiológico/DMSO (n=6; controle). A Alda-1 e a DOX (nesta sequência) foram administradas no mesmo dia, com diferença de 4 horas entre as aplicações (Figura 6).

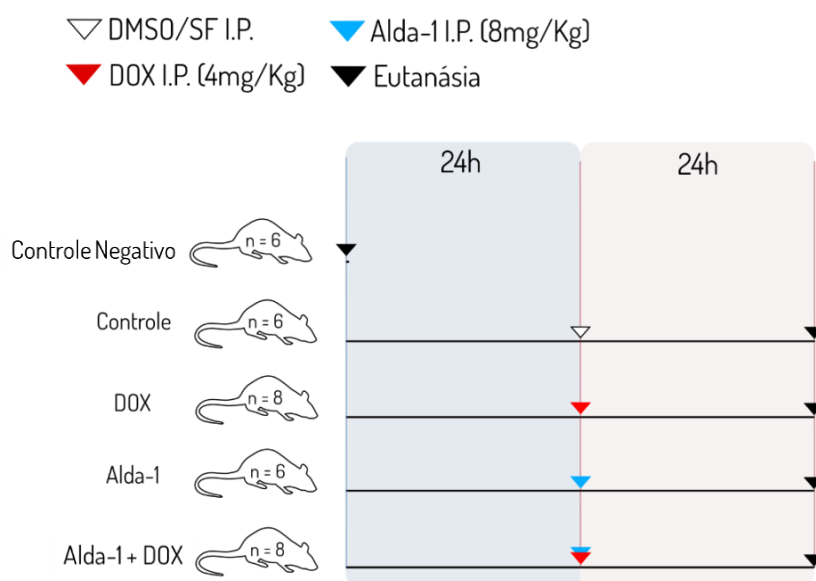


Figura 6: Delineamento experimental do protocolo de tratamento agudo. DOX: doxorubicina; Alda-1: ativador 1 da aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2); Controle negativo: sem nenhum tratamento; Controle: tratado com: SF (soro fisiológico)/dimetilsulfóxido (DMSO); I.P.: injeção intraperitoneal.

No protocolo de tratamento crônico foram utilizados 106 animais: grupos DOX (n = 26; 5 animais foram a óbito e, portanto, excluídos das análises); Alda-1 (n = 24); Alda-1 + DOX (n = 26); soro fisiológico/DMSO (n = 24). Os animais foram tratados com quatro doses

de 4 mg/kg p.c de DOX, uma por semana, durante 4 semanas (dose cumulativa de 16 mg/kg); a Alda-1 também foi administrada em quatro doses de 8 mg/kg p.c, uma por semana, durante 4 semanas (dose cumulativa de 32 mg/kg); o grupo Alda-1 + DOX foi tratado com quatro doses da Alda-1 (8 mg/kg pc) e quatro da DOX (4 mg/kg pc), uma vez por semana, durante 4 semanas (dose cumulativa: DOX = 16 mg/kg pc e Alda-1 = 32 mg/kg pc). A Alda-1 e a DOX (nesta sequência) foram administradas no mesmo dia, com diferença de 4 horas entre as aplicações. O grupo controle recebeu quatro injeções de soro fisiológico e quatro de DMSO, administradas seguindo o mesmo protocolo de tratamento da Alda-1 + DOX. Durante todo o período experimental, os animais receberam dieta e água *ad libitum* e tiveram os pesos e o consumo de água registrados semanalmente. A eutanásia dos animais de todos os grupos foi realizada em quatro momentos distintos: M1: uma semana após o 1º tratamento com as drogas; M2: uma semana após o 2º tratamento; M3: uma semana após o 3º tratamento; M4: uma semana após o 4º tratamento (Figura 7).

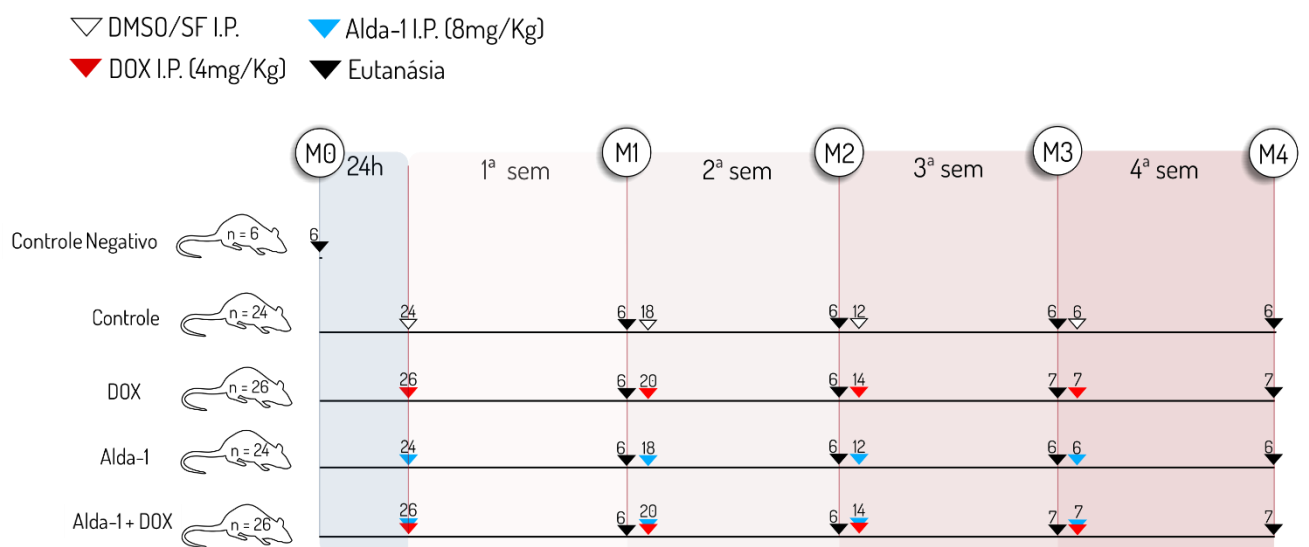


Figura 7: Delineamento experimental do protocolo de tratamento crônico. DOX: doxorrubicina; Alda-1: ativador 1 da aldeído desidrogenase mitocondrial (ALDH2); Controle negativo: sem nenhum tratamento; Controle: tratado com: dimetilsulfóxido (DMSO)/SF (soro fisiológico); I.P.: injeção intraperitoneal; M0-M4: momentos das eutanásias; ▾ : número de animais.

4.1.3 Análise de colesterol e frações

No momento da eutanásia, foram coletados, por punção cardíaca, 3 a 5 mL de sangue para análise dos níveis séricos de colesterol total, triglicérides, lipoproteínas de alta (HDL), baixa (LDL) e muito baixa (VLDL) densidades. As amostras foram submetidas ao sistema de automação *Vitros 950* (Johnson & Johnson). Para a obtenção dos valores de colesterol total e triglicérides foi utilizado o método colorimétrico de ponto final-química seca; o método utilizado para aferição dos níveis séricos de HDL foi o colorimétrico magnético – química seca; o LDL-colesterol foi calculado pela fórmula de Friedwald, que se baseia nos valores de colesterol total, HDL colesterol e triglicérides ($\text{LDL colesterol mg/dL} = \text{colesterol total} - \text{HDL-colesterol} - (\text{triglicérides}/5)$)(Friedewald et al. 1972).

4.1.4 Lipoperoxidação - determinação do 4-hidroxinonenal (4-HNE)

A concentração do 4-HNE foi avaliada no tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) de ratos utilizando-se o *kit* OxiSelect™ HNE-His Adduct ELISA (Cell Biolabs Inc, San Diego, CA, EUA), que corresponde ao ensaio imunoenzimático desenvolvido para rápida detecção e quantificação dos adutos de HNE com proteínas. Todo procedimento foi realizado em ambiente protegido de luz e seguindo as instruções do fabricante do *kit*. A quantidade de adutos de HNE/proteína foi determinada por comparação da absorbância com um padrão de HNE da albumina de soro bovino (BSA), proteína de alto peso molecular que apresenta curva conhecida. Padrões de BSA ou amostras de proteína (10 µg / mL) foram adsorvidos em uma placa de 96 poços durante 2 horas, a 37° C. Os adutos de HNE/proteínas presentes na amostra ou no padrão foram colocados na presença do anticorpo anti-HNE e posteriormente do anticorpo secundário conjugado HRP, enzima que ao se ligar ao substrato emite sinal que leva

à sua detecção. A absorvância de cada poço foi lida em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA), em 450 nm. A concentração de 4-HNE foi corrigida pela concentração de proteína da amostra (concentração da amostra realizada pelo método Bradford). Os resultados foram expressos em µg de 4-HNE ajustado por grama de proteína da mesma amostra.

4.1.5 Coleta e armazenamento das amostras para os estudos de expressão gênica

Imediatamente após a eutanásia, o coração foi retirado e o ventrículo esquerdo isolado. Em seguida, o ventrículo foi seccionado e parte transferida para microtubo com *RNA Later*®, onde permaneceu *overnight*, à 4°C. Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -80 °C após remoção total do *RNA later*®.

4.1.6 Extração, quantificação e avaliação da integridade do RNA

A extração do RNA total do tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) foi realizada utilizando-se o reagente de lise *QIAzol*®, com posterior processamento pelo *miRNeasy*® *Minikit* (ambos da QIAGEN). Esta abordagem permite a purificação de RNAs com 18 nucleotídeos ou mais, fornecendo grande espectro de transcritos que incluem RNA mensageiros (mRNA) e microRNAs (miRNAs) necessários para os ensaios de expressão. Adicionalmente, foi incluído tratamento com DNase diluída em tampão RDD (*RNAse-Free DNase Set*, QIAGEN) para eliminação mais eficiente do DNA genômico das amostras. Essas etapas foram padronizadas e conduzidas segundo protocolos do fabricante. As concentrações e purzas dos RNAs extraídos do tecido cardíaco foram determinadas em espectrofotômetro (*Thermo Scientific™ NanoDrop™ One*), utilizando como parâmetros de pureza as razões

260/280 e 260/230. A razão 260/280 de aproximadamente 2 é aceita como indicativo de RNA puro, sem proteína, fenol e outros contaminantes que absorvem fortemente próximo ao comprimento de onda de 280 nm. A razão 260/230 é usada como medida secundária de pureza do RNA, indicando contaminantes como EDTA, guanidina HCL, trizol, entre outros, cuja absorção é próxima ao comprimento de 230 nm. Valores indicativos de pureza do RNA para esta razão estão entre 2 e 2,2. Após a quantificação e após a verificação de índices satisfatórios de pureza, o RNA foi armazenado a -80°C . Aleatoriamente, foram selecionadas amostras dentre os diferentes tratamentos para avaliação da integridade do RNA por meio de gel de agarose a 2% (Figura 8). O RNA foi extraído, quantificado e avaliado quanto sua pureza a partir de 30 amostras de tecido cardíaco coletado dos animais que integraram o protocolo de tratamento agudo [controle negativo (n=6), controle (n=6), DOX (n=6), Alda-1 (n=6) e DOX + Alda-1 (n=6)] e 78 amostras do protocolo de tratamento crônico [M0 (n=6), M1 (n=24), M2 (n=24), M4 (n=24)] totalizando 108 amostras (Tabela 1).

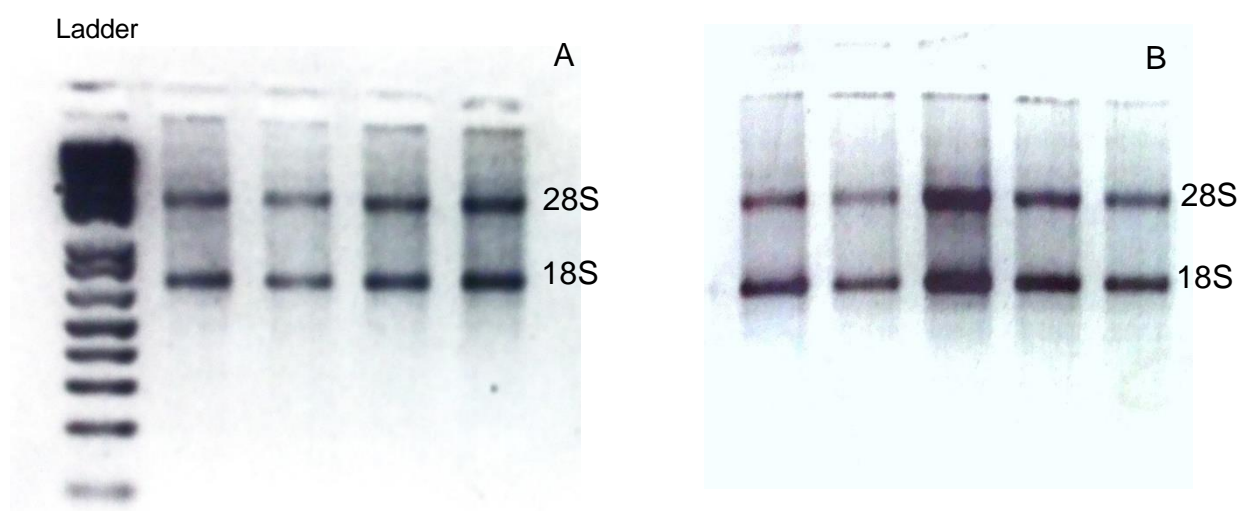


Figura 8: Fotografia de gel de agarose 2% mostrando a integridade das amostras de RNAs extraídas do tecido cardíaco de ratos do estudo agudo (A) e do estudo crônico (B), e aleatoriamente selecionadas. Padrão de bandas associadas às subunidades ribossomais 28S e 18S; *ladder*: marcador de peso molecular.

Tabela 1. Concentrações e razões indicativas de pureza do RNA extraído do tecido cardíaco dos ratos dos estudos agudo e crônico

	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) \pm dp	Razão	
		260/280 \pm dp	260/230 \pm dp
Estudo agudo	0,444 \pm 0,158	2,117 \pm 0,038	2,098 \pm 0,183
Estudo crônico	0,431 \pm 0,126	2,110 \pm 0,025	2,066 \pm 0,247

4.1.7 Transcrição reversa - síntese do cDNA

4.1.7.1 Ensaios de expressão gênica por PCR - array

Inicialmente, foi realizada uma etapa para a eliminação da contaminação das amostras de RNA por DNA genômico. Nesta, foi utilizado 0,5 μg de RNA total e água de alta qualidade, livre de nucleases. A síntese do DNA complementar (cDNA) para os ensaios de expressão gênica utilizando a plataforma *RT² ProfilerTM PCR Arrays* foi realizada com o *kit RT² First Strand* (QIAGEN), desenhado e otimizado para PCR quantitativo em tempo real. A reação foi incubada em termociclador, inicialmente a 42°C por 15 minutos e, em seguida, a 95 °C, por 5 min. O cDNA foi armazenado a -20°C até a realização da PCR em tempo real na plataforma *PCR - array*.

4.1.7.2 Ensaios de expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *C1QBP*

A síntese do cDNA para os ensaios de expressão dos genes *ALDH2*, *C1QBP*, *Bax* e *Bcl-2* foi realizada utilizando-se o *kit High Capacity* (Applied Biosystem – ABI, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. A reação no termociclador, em uma primeira etapa, ocorreu a 25° C por 10 minutos, posteriormente, a 37°C por 120 minutos e, por fim, a 4°C. O

cDNA foi armazenado a -20°C para posterior uso na qPCR com os *primers* para os genes de interesse.

4.1.7.3 Ensaaios de expressão de microRNAs

Para os ensaios de expressão de microRNAs, a síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o *kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription* que se diferencia das abordagens anteriores devido a transcrição reversa ocorrer via *primer* específico para o microRNA. A concentração utilizada de RNA foi de 10 ng por reação de transcrição reversa. A reação no termociclador, em uma primeira etapa, ocorreu a 16°C por 30 minutos, posteriormente a 42°C por 30 minutos, depois a 85°C por 5 minutos e, por fim, a 4°C. Os cDNAs para todos os ensaios de expressão foram armazenados a temperatura de -20°C.

4.1.8 Análise de expressão gênica por RT-qPCR

4.1.8.1 Expressão gênica por PCR-array

A análise do perfil de expressão de 84 genes envolvidos nas vias de metabolismo de ácidos graxos (catabolismo; transporte; regulação da biossíntese; cetogênese; e catabolismo de triacilglicerol) foi realizada pela técnica de *PCR* em tempo real, com a utilização do *Rat Fatty Acid Metabolism RT² Profiler™ PCR Array* (PARN 007Z), em conjunto com o *RT² SYBR Green Master Mix* (ambos da QIAGEN). O *RT² Profiler™ PCR Array* consiste de uma microplaca de 96 poços com *primers* referentes aos genes que compõem a via estudada, bem como controles endógenos (β -2 microglobulina - *B2M*; a lactato desidrogenase - *LDHA* e a proteína ribossomal P1 -*RPLP1*), da eficácia da transcrição reversa, da *PCR* e de contaminação genômica. A solução *RT² SYBR Green Mastermix* é composta por tampão da reação, *Taq polimerase*, nucleotídeos e corante *SYBR Green*, que emite sinal fluorescente

significativamente superior quando ligado ao DNA de dupla-fita. O aumento do número de cópias de DNA resultante da ampliação por PCR eleva o sinal fluorescente, que é detectado pelo termociclador. A análise das diferenças de expressão gênica foi realizada por quantificação relativa utilizando-se o método C_t comparativo (fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta C_T}$), ou seja, foram analisadas alterações na expressão gênica de uma determinada amostra em comparação a outra de referência. Seguindo instruções da fabricante, foram adicionados 25 μ L de *RT² SYBR Green Mastermix* ao cDNA da amostra em cada poço da microplaca e, posteriormente, inserida no termociclador. Esta análise foi realizada com as amostras utilizadas no protocolo de tratamento agudo.

4.1.8.2 Expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *CIQBP*

A análise das diferenças de expressão dos genes *ALDH2*, *CIQBP*, *Bax* e *Bcl-2* foi realizada utilizando-se o sistema TaqMan[®] (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, EUA), que consiste de *Master Mix* universal e sonda específica para os genes de interesse. A quantificação das diferenças dos níveis de RNA mensageiro entre os grupos foi realizada da mesma maneira que as análises de *PCR array*, por quantificação relativa, e normalizadas por meio dos níveis de expressão da beta-actina (*ACTB*), gene endógeno utilizado. As análises por *RT-qPCR* dos genes *ALDH2*, *CIQBP*, *Bax* e *Bcl-2* foram aplicadas para as amostras dos protocolos de tratamento agudo e crônico. A análise foi realizada pelo *software* de análise *online* da The Applied Biosystems[™], aplicativo *web* para análise de dados gerados em instrumentos de PCR em tempo real da Thermo Fisher Scientific.

4.1.8.3 Expressão de *microRNAs*

O sistema TaqMan[®] foi também utilizado para a análise de expressão do miR-34a, sendo utilizados como controle endógeno para esses ensaios o RNA nuclear não-codificante

U6. Os ensaios de expressão de microRNAs foram realizados com as amostras resultantes do protocolo de tratamento agudo. A análise foi também realizada pelo *software* de análise *online* da The Applied Biosystems™.

4.2 Estudo *in vitro*

4.2.1 Linhagens celulares

A etapa *in vitro* foi realizada no laboratório do Dr. Yidong Bai, na The University of Texas Health Science Center (UTHSCSA), em San Antonio, Estados Unidos. Foram utilizados a linhagem celular A9 (ATCC® CCL-1.4), derivada de fibroblastos de camundongos, e os cíbridos 3A13, 3A6 e 3A20-30 com, respectivamente, ~20%, 50% e 90% de heteroplasmia para mutação no gene mitocondrial *ND5*. Os cíbridos foram anteriormente gerados no California Institute of Technology (UCLA/Caltech) pelo Dr. Yidong Bai, sob a supervisão do Dr. Giuseppe Attardi. Especificamente estes cíbridos foram gerados utilizando-se a linhagem celular LL/2-m21 (ATCC® CRL-1642), derivada de carcinoma pulmonar de Lewis (*Mus musculus*), que é amplamente utilizada para estudo de mecanismos de ação de agentes quimioterápicos. Após tratadas para perda total de suas mitocôndrias, se tornando, assim, células Rho-0, as células LL/2-m21 alteradas foram fusionadas com as mitocôndrias provenientes da linhagem celular A9, e que apresentavam mutação no gene *ND5* que codifica subunidade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial de mesmo nome. Desta forma, os cíbridos 3A13, 3A6 e 3A20-30 apresentavam o mesmo núcleo, mas mitocôndrias com mtDNA em diferentes graus de heteroplasmia para a mutação mencionada (Figura 9). A utilização de linhagens com esta mutação foi realizada para possibilitar a identificação da heteroplasmia mitocondrial nos seus diferentes níveis, via polimorfismos de comprimento de fragmentos de DNA (RFLP) como será posteriormente detalhado.

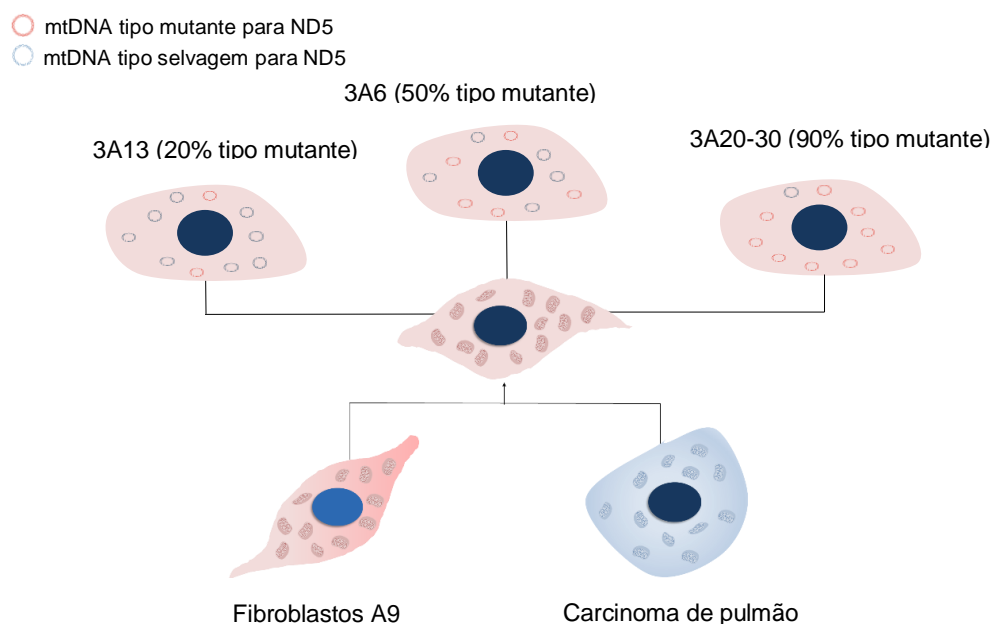


Figura 9: Diagrama ilustrando a geração dos cíbridos utilizados no estudo *in vitro* e seus respectivos percentuais de heteroplasmia para mutação em *ND5*.

4.2.2 Protocolo de tratamento das drogas

Dois diferentes protocolos de tratamento e análise celular foram realizados: (1) protocolo de quatro semanas (similar ao estudo *in vivo*), incluindo, além da análise da heteroplasmia, a investigação de outros parâmetros mitocondriais; (2) protocolo de 10 semanas, para análise de mudanças na heteroplasmia mitocondrial sob diferentes condições de exposição à DOX. No protocolo de quatro semanas, as drogas DOX e Alda-1 (ambas da Cayman Chemicals) foram utilizadas nas concentrações de 0,2 e 20 μM , respectivamente. Adicionalmente, visando comparar o efeito protetor da Alda-1 ao de dois outros compostos com reconhecida ação sobre as mitocôndrias foram realizados tratamentos com o SS-31 e com a rapamicina. O SS-31 (Elamipretide ou Bendavia[®]) é um peptídeo que apresenta alta afinidade à cardiolipina na membrana interna mitocondrial, e estudos têm apontado para a sua habilidade em proteger a estrutura da crista, promover a fosforilação oxidativa e restaurar a bioenergética mitocondrial, além de impedir a ligação da DOX à cardiolipina (Szeto 2014; Aryal & Rao 2016). A rapamicina (também conhecida como sirolimus) é um antibiótico e

inibidor clássico da via mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e vem sendo descrita como um regulador positivo da autofagia mitocondrial, ou mitofagia, importante no controle e na diminuição da disfunção mitocondrial sob diferentes cenários (Toker & Agam, 2015; Paquette et al., 2018). O SS-31 (Elamipretide or Bendavia®; BOC Sciences) e a rapamicina (Sigma) foram utilizadas nas concentrações de 0,1 e 0,2 μM , respectivamente.

As células (A9 e o híbrido 3A6) foram semeadas 48 horas antes do tratamento com cada uma das drogas, a uma densidade de 1×10^5 /poço, em placas de seis poços, com meio de cultura DMEM (Corning®) suplementado com 10% de soro bovino (GE Healthcare HyClone™). Exceto para a primeira coleta, após 24h de exposição às drogas (M1), nas coletas subsequentes as células tiveram um tempo de recuperação de seis dias em meio de cultura livre de drogas, após cada exposição: M2, M3, M4 e M5 com, respectivamente, uma, duas, três e quatro administrações das drogas (Figura 10).

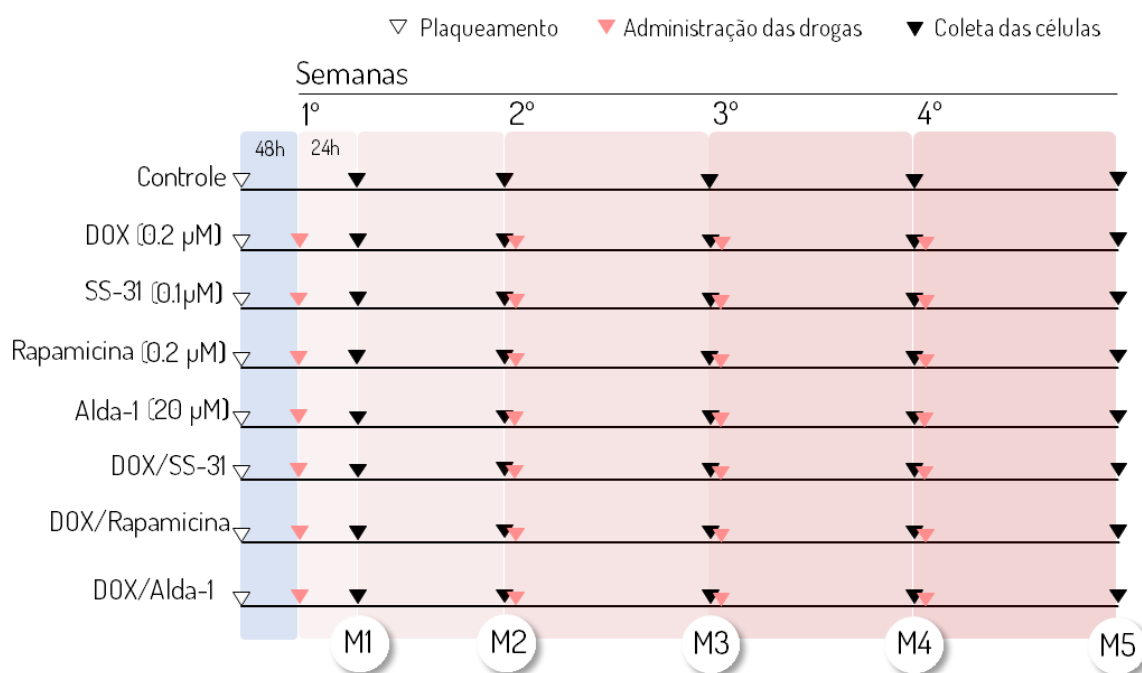


Figura 10: Protocolo de tratamento de quatro semanas com as drogas doxorrubicina (DOX), Alda-1, SS-31 e rapamicina em células da linhagem A9 e híbridos 3A6. M1 e M2: coleta das células, respectivamente, 24h e uma semana após o 1º tratamento; M3, M4 e M5: uma semana após, respectivamente, dois, três e quatro tratamentos com as drogas.

4.2.3 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular das linhagens A9 e 3A6 foi avaliada utilizando-se o método de exclusão por azul de tripan, com abordagem totalmente automatizada (Vi-CELL® XR Cell Viability Analyzer - Beckman Coulter) (Figura 11).

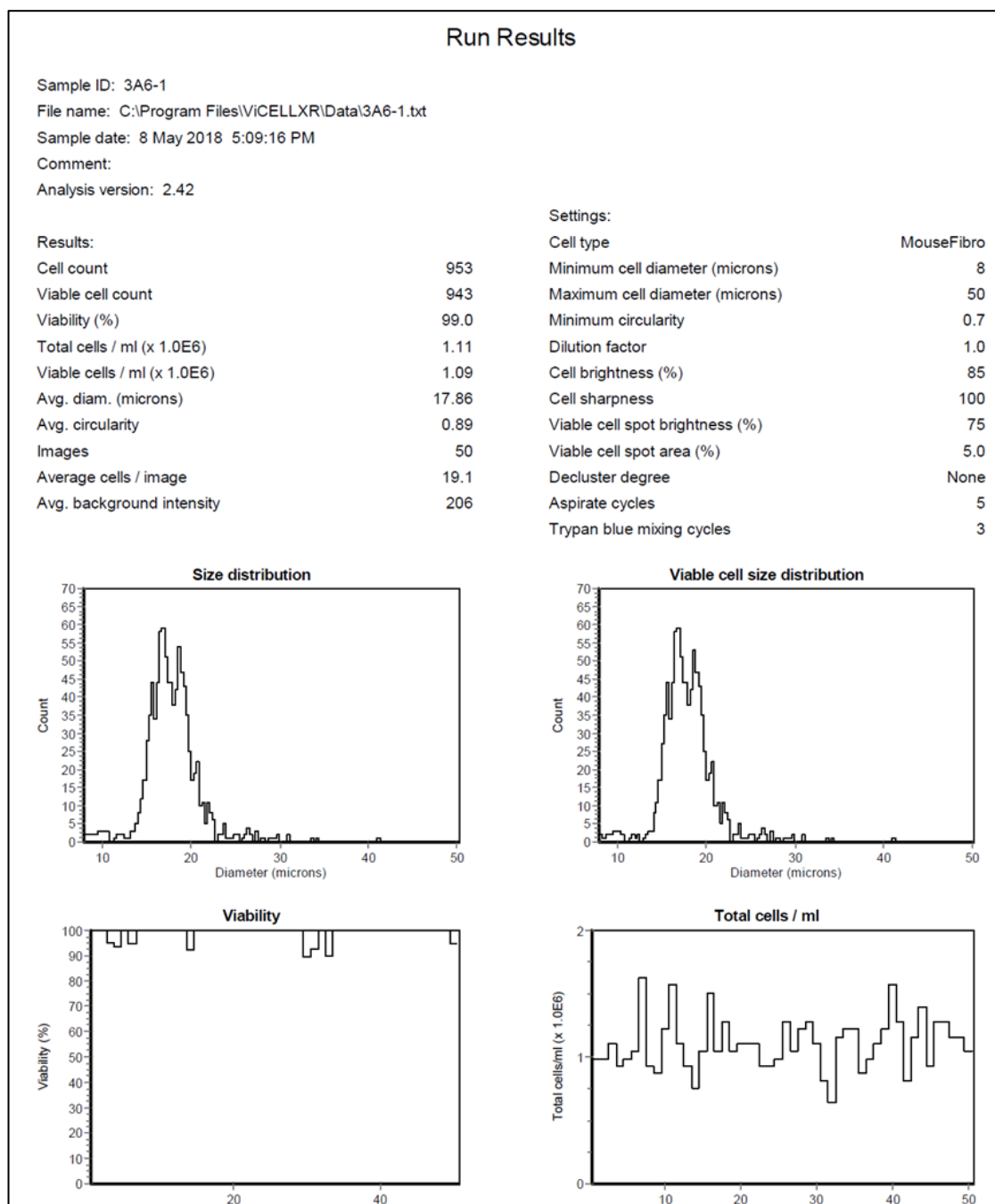


Figura 11: Gráficos gerados pela leitura automatizada do teste de exclusão de azul de tripan para tamanho, viabilidade e total de células para o cíbrido 3A6.

Resumidamente, as células foram tripsinizadas e 1 mL das amostras inserido no carrossel do equipamento. Os parâmetros do aparelho foram estabelecidos de acordo com as recomendações do fabricante. Para cada tratamento e linhagem celular, foram realizados pelo menos três experimentos independentes e as contagens realizadas diariamente durante a primeira semana do protocolo de tratamento.

4.2.4 Microscopia eletrônica de transmissão

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada para a determinação da morfologia mitocondrial nas linhagens A9 e híbrido 3A6. Resumidamente, as células foram fixadas com formaldeído 4% e glutaraldeído 1% em tampão fosfato (pH 7.4) a 4°C, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, por uma hora, em temperatura ambiente, desidratadas em uma série de diluições com etanol, e embebidas em resina epóxi (EMBed 812). Os blocos de resina foram seccionados em ultramicrotomo e os cortes corados com azul de tuloidina para identificar as áreas ideais para os cortes mais finos. As seções finas foram cortadas na espessura de 90 nm, colocadas em grades de cobre e coradas com acetato de uranilo 2% e citrato de chumbo. As grades foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEM 1400 plus), e as imagens digitais representativas capturadas em aumento original de 1.000-37.000x. O número de mitocôndrias de pelo menos 10 células foram contabilizados. Foi também realizada análise qualitativa das alterações morfológicas.

4.2.5 Shotgun lipidômico – determinação das espécies moleculares de cardiolipina

O *shotgun* lipidômico foi realizado em colaboração com a equipe do Dr. Xialin Han, do Barshop Institute for Longevity and Aging Studies (UTHSCSA), San Antonio, Estados

Unidos. O *shotgun* lipidômico é um processo de múltiplas etapas que faz uso de extrações paralelas, separação *intrasource* e análise multidimensional por espectrometria de massa. Resumidamente, a quantificação pelo *shotgun* foi realizada em duas etapas. Inicialmente, foram utilizados os fosfolipídios sintéticos *1,1',2,2'-tetramyristoyl cardiolipin* (T14:0 CL) e o *1,1', 2,2'-tetraoleoyl cardiolipin* (T18:1 CL). Ambas as espécies moleculares de cardiolipina foram quantificadas por cromatografia gasosa após metanólise. Foram preparadas soluções estoque individuais de T14:0 CL e T18:1 CL em clorofórmio-metanol (1:1, v/v) e armazenadas sob nitrogênio a -20 °C. Todas as soluções misturadas em várias proporções de T14:0 CL e T18:1 CL foram extraídas duas vezes pela técnica modificada de Bligh e Dyer. A mistura seca de cardiolipina foi ressuspensa em solução de clorofórmio/formaldeído/metanol (1:1, v/v) para reconstituir a concentração originalmente preparada. Cada amostra celular da linhagem A9 foi adicionada a tubo de vidro contendo soluções de clorofórmio-metanol (1:1, v/v) e cloreto de lítio antes da adição do controle interno (i.e., T14:0 CL) para quantificação das espécies moleculares de cardiolipina. A análise foi realizada no espectrofotometro de massa Q Exactive™. Dados das amostras biológicas foram normalizadas pelo conteúdo de proteínas e todas as 20 espécies moleculares de cardiolina, isoladas ou em diferentes agregados, foram quantificadas.

4.2.6 Extração de DNA

A extração do DNA de alto peso molecular das amostras biológicas foi realizada utilizando-se o *kit* 20/G Genomic-tip (QIAGEN®), segundo instruções do fabricante. As amostras foram tratadas com RNase A (Thermo Scientific™) e proteinase K (QIAGEN®). As amostras de DNA foram eluídas em tampão TE (Tris-EDTA) e armazenada a -80°C.

4.2.7 Análise de polimorfismos (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)

A análise da habilidade da DOX em promover alterações na heteroplasmia mitocondrial foi realizada pelo método de RFLP, a partir de experimento com 70 dias de duração. Os híbridos 3A6, 3A13 e 3A20-30 com, respectivamente, ~20%, 50% e 90% de heteroplasmia para mutação no gene *ND5*, foram tratados com doses semanais de DOX (0,1 μ M), por 4 semanas. Foi também utilizado protocolo de tratamento de 24 e 48 horas, no qual as células foram tratadas com a DOX na concentração de 0,5 μ M (Figura 12). A coleta das células para análise da heteroplasmia via RFLP ocorreu nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11, 14, 18, 21, 56 e 70.

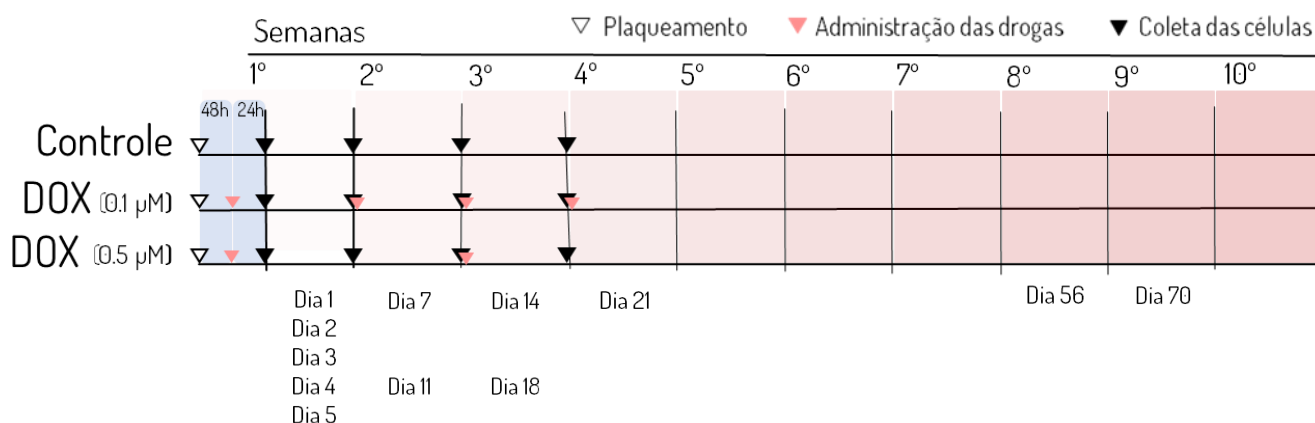


Figura 12: Protocolo de tratamento para avaliação da heteroplasmia mitocondrial por RFLP.

A quantificação da mutação no gene *ND5* do mtDNA foi realizada pela análise dos produtos da reação de digestão da enzima de restrição *ClaI*. Para isso, um fragmento de 465 pares de base do gene *ND5* foi amplificado por PCR com os *primers* ND5-5'-2 (posição 11785 a 11802), CCCCAATCCTAATTTCAA e ND5-3'-4 (posições 12248 a 12231), TGCTTGTAGGGCTGCAGT em um volume final de 20 μ L. Os produtos finais da PCR foram submetidos a digestão com a *ClaI* (5 U) em um volume de reação de 20 μ L, a 37°C, *overnight*. Sob tais condições, o mtDNA do tipo selvagem e, portanto, sem a mutação no fragmento amplificado de *ND5*, foi cortado em dois pequenos fragmentos de 297 e 168 pares

de base, enquanto o mutante, cujo sítio de corte foi destruído, o fragmento permaneceu intacto (Figura 13). Uma amostra de 10 µL dos produtos da reação de digestão foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 3%. A quantificação da porcentagem do tipo mutante nos diferentes híbridos e tratamentos foi realizada utilizando-se o *software* ImageJ.

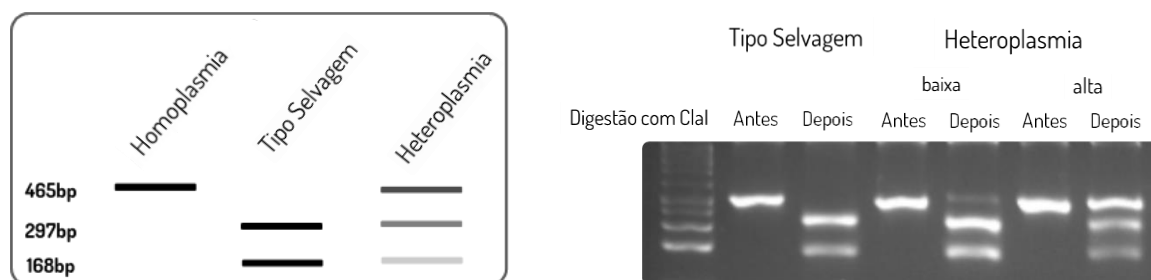


Figura 13: Padrão de digestão da Clal para mutação no gene mitocondrial *ND5*. A quantificação foi realizada pela análise dos produtos da reação de digestão enzimática após eletroforese em gel de agarose. Mutação homoplásmica: todos os mtDNA das mitocôndrias nas células apresentam a mutação no gene *ND5*.

4.3 Análise estatística

Os dados de peso dos animais, do lipidograma e lipoperoxidação são apresentados como média \pm SE. O teste t de Student ou ANOVA foi utilizado para a comparação dos parâmetros avaliados em diferentes momentos e ANOVA de duas vias para comparações entre grupos de tratamento. A análise de regressão linear foi realizada para avaliar o efeito cumulativo das drogas. O método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$) foi utilizado para determinar a expressão relativa do gene alvo em relação aos controles endógenos. O *software online* da *The Applied Biosystems*TM foi utilizado para determinar a quantidade de mRNA relativa de cada amostra por comparação da quantidade do alvo normalizada em cada amostra com a quantidade do alvo normalizada na amostra de referência. Para as análises do *PCR-array* os valores de p foram calculados com base no teste de t de Student, com os valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ replicados para cada gene nos grupos controle e de tratamentos. Para todos os ensaios de

expressão apenas os genes com *fold change* ≥ 2 foram considerados diferencialmente expressos. Os testes estatísticos para estudo foram conduzidos utilizando-se o *software* SigmaPlot versão 11.0 (SigmaPlot Software, Point Richmond, CA, EUA) e o *software* GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Estudo *in vivo*

5.1.1 *Peso corpóreo e de órgãos isolados (coração, rim e fígado)*

O efeito do tratamento agudo com a DOX e com a Alda-1 sobre os pesos corpóreo, do coração, rim e do fígado é apresentado na Tabela 2. Inicialmente, as comparações entre o grupo Controle Negativo (sem nenhum tratamento; M0 -24h antes do início dos tratamentos) e o grupo Controle não mostraram diferenças significativas, indicando a não interferência dos veículos de diluição das drogas sobre os parâmetros investigados. Nenhuma diferença significativa foi também detectada entre o grupo Controle e aqueles sob tratamento agudo com as duas drogas.

Tabela 2. Média (\pm SE) dos pesos corpóreo, do coração, rim e fígado de ratos Wistar após tratamento agudo com a doxorubicina e a Alda-1

DOX – doxorubicina (4 mg/kg pc); Alda-1 - ativador 1 da enzima aldeído desidrogenase mitocondrial (8 mg/kg).

No protocolo de tratamento crônico (múltiplo) com as drogas, a partir da 2ª semana houve perda significativa do peso corpóreo dos animais tratados com a DOX e com a DOX + Alda-1 em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa entre os

grupos DOX e DOX + Alda-1, em todos os momentos amostrados (Figura 14A). Com padrão similar, os pesos do coração, rim e fígado aumentaram gradativamente ao longo do tempo nos grupos controle e Alda-1, e foram significativamente menores nos grupos DOX e DOX + Alda-1 quatro semanas após o início dos tratamentos (M4) (Figura 14B, C e D). Para os rins e fígado a redução do peso foi observada a partir da segunda semana (M2) (Figura 14C e 14D).

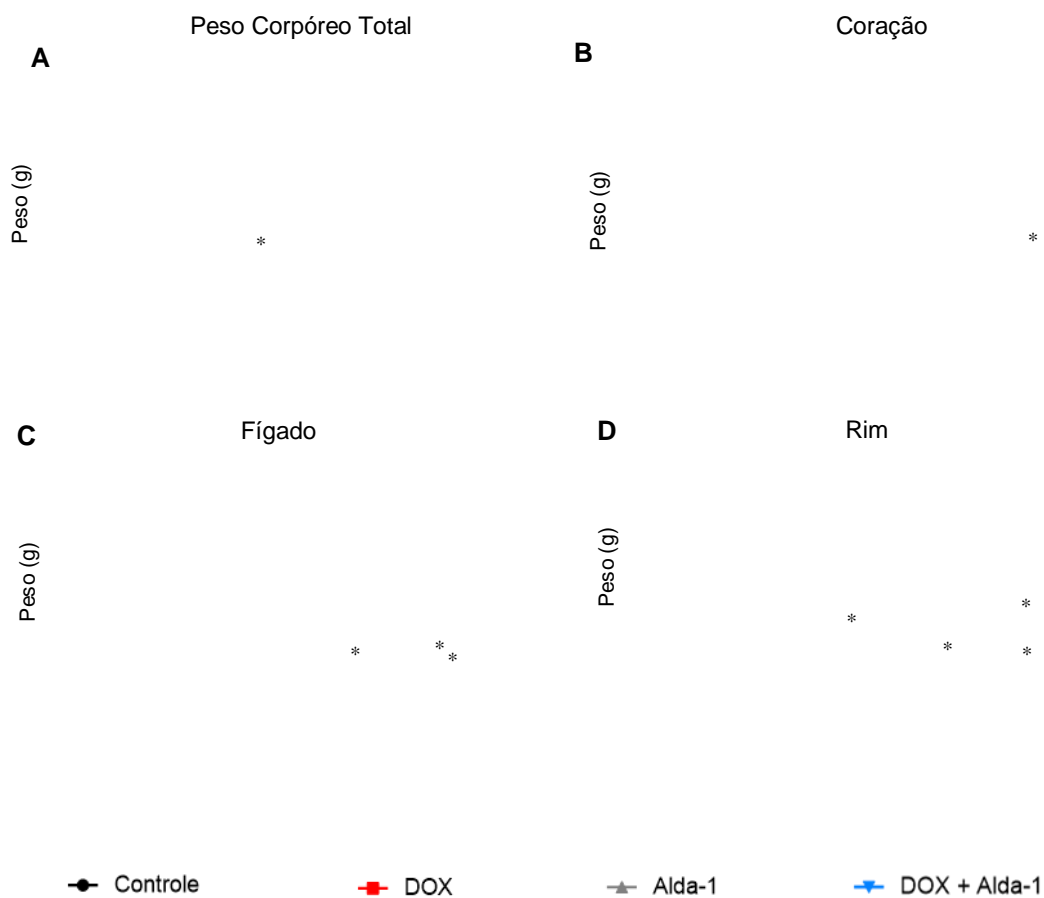


Figura 14: Pesos corpóreo (A), do coração (B), fígado (C) e rins (D) de ratos Wistar após tratamento de 4 semanas com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e a Alda-1 (8 mg/kg/semana). Os resultados são apresentados como média \pm SE; M1, M2, M3 e M4 - momentos da amostragem: respectivamente, uma semana após o 1º, 2º, 3º e 4º tratamentos com as drogas. * $p < 0,05$ com relação ao grupo controle.

5.1.2 Perfil lipídico

Os efeitos dos protocolos de tratamento agudo e crônico com a DOX e a Alda-1 sobre o perfil lipídico são mostrados, respectivamente, na Tabela 3 e Figura 15. Nenhuma alteração significativa foi detectada no tratamento agudo. No tratamento crônico, em M1, foi verificado efeito deletério da DOX nos níveis de triglicérides (DOX > Controle, $p < 0,001$) e VLDL (DOX > Controle, $p < 0,001$). A associação da Alda-1 + DOX resultou na diminuição (DOX+Alda-1 < DOX) dos níveis de triglicérides ($p < 0,001$) e de VLDL, também em M1 ($p < 0,001$) (Figura 4). A análise por regressão linear dos dados do lipidograma após o tratamento crônico não revelou efeito cumulativo das drogas.

Tabela 3. Perfil lipídico de ratos Wistar tratados com uma única dose de doxorrubicina (DOX) e Alda-1

Média \pm SE; DOX - 4 mg/kg; Alda-1 - 8 mg/kg; col, colesterol; HDL, lipoproteínas de alta densidade; VLDL, lipoproteínas de densidade muito baixa; LDL, lipoproteínas de baixa densidade; ANOVA de duas vias: $p > 0,05$.

Colesterol Total

Triglicérides

*

*

HDL

VLDL

*

Figura 15: Níveis lipídicos (média \pm SE) de ratos Wistar após tratamento crônico com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e Alda-1 (8 mg/kg/semana). M1, M2, M3 e M4, momentos da amostragem: respectivamente, uma semana após o 1º, 2º, 3º e 4º tratamento com as drogas. ; # $p < 0,05$ com relação ao Grupo Controle; * $p < 0,05$ com relação à DOX. ANOVA de duas vias.

5.1.3 Lipoperoxidação - determinação do 4-hidroxinonenal (4-HNE)

O efeito agudo da DOX e da Alda-1 sobre os níveis do 4-HNE cardíaco é apresentado na Tabela 4. Não foi observada diferença significativa entre o Grupo Controle Negativo e o Controle. Da mesma forma, não foi detectada diferença entre os demais grupos e o Controle, 24 horas após administração das drogas.

Tabela 4. Níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) cardíaco em ratos Wistar após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX - 4 mg/kg) e a Alda-1

Média \pm SE; ANOVA de duas vias: comparação entre os grupos Controle, DOX, Alda-1 e DOX+Alda-1; teste t de Student: comparação Controle Negativo x Controle (veículo de diluição das drogas).

O efeito do tratamento crônico com a DOX e a Alda-1 sobre os níveis de 4-HNE é apresentado na Figura 16. Não foram observadas diferenças significativas entre cada um dos tratamentos e o Grupo Controle e entre a DOX e DOX + Alda-1. A análise de regressão linear também não mostrou efeito cumulativo da DOX, da Alda-1 ou da associação das drogas na concentração cardíaca do 4-HNE (dados não apresentados).

Figura 16: Níveis de 4-hidroxinonenal (4-HNE) cardíaco após tratamento múltiplo com a doxorubicina (DOX; 4 mg/kg/semana) e a Alda-1 (8 mg/kg/semana). Os resultados são apresentados como média \pm SE; M1, M2, M3 e M4, respectivamente, uma semana após a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a, injeções com as drogas; ANOVA de duas vias: para comparar os grupos.

5.1.4 Expressão gênica

5.1.4.1 Genes relacionados ao metabolismo de ácidos graxos

A análise da expressão gênica a partir do RNAm extraído do tecido cardíaco dos animais sob tratamento agudo com a DOX inicialmente mostrou que não houve diferença significativa no perfil de expressão entre os grupos Controle Negativo e Controle. Dentre os 84 genes analisados, 10 se mostraram hiperexpressos e apenas um hipoexpressos ($p < 0,05$) nas comparações múltiplas entre os grupos investigados. No entanto, desses, apenas o *Fabp4* (nos grupos DOX e DOX+Alda-1) e o *Slc27a2* (no grupo DOX) apresentaram-se hiperexpressos com *fold change* ≥ 2 (Tabela 5). A análise de agrupamento apresentado na Figura 17 mostra os níveis de expressão dos genes com *fold change* ≥ 2 nos respectivos grupos experimentais. A partir da análise comparativa de cores pode-se observar a maior (vermelho) ou menor (verde) expressão dos genes.

O gene *Fabp4* foi mais expresso no grupo tratado com a DOX, seguido do DOX + Alda-1 e do Alda-1 (DOX > DOX + Alda-1 > Alda-1). Os níveis de expressão gênica nos grupos DOX e DOX+Alda-1 em comparação ao Grupo Controle após tratamento agudo estão apresentados no Gráfico de Dispersão (*volcano plot*), na Figura 18. Para o *Slc27a2* pode-se observar expressão significativamente aumentada no grupo DOX quando comparado a DOX + Alda-1 ($p < 0,01$; *fold change* = 14,12).

DOX vs Controle

DOX+Alda-1 vs Controle

DOX vs DOX + Alda-1

Figura 18: *Volcano plot* apresentando a significância estatística *versus* o *fold change*, respectivamente nos eixos y e x, da expressão normalizada de cada gene após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1. Genes hiperexpressos em vermelho e hipoexpressos em verde. A linha central indica os genes que não tiveram alterações nos níveis de expressão; a linha tracejada representa o limite de *fold change* = 2, limiar considerado para definir os genes diferencialmente expressos; a linha contínua representa o limite de significância estatística ($p=0,05$). Genes *Fabp4* e *Slc27a2* foram os únicos com diferença significativa nos níveis de expressão com *fold change* ≥ 2 .

5.4.2 Expressão dos genes ALDH2, Bax, Bcl-2 e CIQBP

Como não houve diferença significativa na comparação entre os grupos Controle e Controle Negativo para nenhum dos genes investigados, não são apresentados os dados referentes ao Controle Negativo. A Figura 19 apresenta os resultados da expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos grupos sob tratamento agudo com as drogas. Apenas os genes *Bcl-2* e *CIQBP* apresentaram expressão diferenciada. O *Bcl-2* estava hiperexpresso no grupo tratado com a DOX em comparação ao Controle ($p < 0,0001$; *fold change* = 2,294). No entanto, no grupo com a associação DOX + Alda-1 os níveis de expressão deste gene foram similares ao do Grupo Controle. Com relação ao *CIQBP*, embora não significativamente diferente do Controle, este mostrou-se hiperexpresso no grupo tratado com a DOX em relação

ao tratados com a Alda-1 ($p = 0,005$; *fold change* = 2,146) e com DOX + Alda-1 ($p = 0,008$; *fold change* = 2,030).

Figura 19: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos grupos experimentais após tratamento agudo com a doxorrubicina (DOX) e a Alda-1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *fold change* ≥ 2 .

Os resultados do tratamento crônico com as drogas estão apresentados na Figura 20. Alteração significativa foi observada apenas na expressão do *CIQBP*, na primeira semana após a administração da Alda-1. Neste momento (M1), houve diminuição nos níveis de RNAm do gene ($p < 0,001$) em comparação ao grupo Controle, porém com *fold change* = 0,403.

5.4.3 Expressão do miR-34a-5p

Os resultados da expressão do miR-34a-5p nos grupos sob tratamento agudo estão apresentados na Figura 21. Nenhuma diferença significativa foi detectada nas comparações entre os grupos.

□ Controle ■ DOX ■ Alda-1 ■ DOX+Alda-1

Figura 20: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão dos genes *ALDH2*, *Bax*, *Bcl-2* e *CIQBP* nos grupos com múltiplos tratamentos com a doxorrubicina (DOX) e a Alda-1. M1, M2 e M4, respectivamente, uma semana após as 1^a, 2^a e 4^a injeções. * $p < 0,001$.

Figura 21: Quantificação relativa (*RQ plot*) dos níveis de expressão do miR34a-5p após tratamento agudo com a doxorubicina (DOX) e a Alda-1. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$ e *fold change* < 2).

5.2 Estudo *in vitro*

5.2.1 Ensaio de viabilidade celular

A análise de viabilidade nas linhagens A9 e 3A6 mostrou diminuição significativa no número de células após exposição à DOX (0,2 μ M) isolada, ou em associação com as drogas SS-31, rapamicina e Alda-1. Contudo, a partir do 4º e 5º dia, respectivamente nas linhagens A9 e 3A6, foi observada uma recuperação, com aumento significativo da viabilidade celular nas culturas tratadas com DOX + Alda-1 em comparação ao grupo DOX (Figura 22).

A9

3A6

*

—○— Controle —■— DOX —▲— SS-31 —▼— Rapamicina —◇— Alda-1 —◊— DOX + SS-31 —□— DOX + Rapamicina —▲— DOX + Alda-1

Figura 22: Viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripano para as linhagens A9 e 3A6. Os dados são apresentados como média \pm SD; * $p < 0,05$ em comparação ao controle; # $p < 0,05$ em comparação a DOX

5.2.2 Microscopia eletrônica de transmissão - número de mitocôndrias e análise estrutural

Para as ambas as linhagens celulares, A9 e 3A6, o número de mitocôndrias não diferiu significativamente após 24h de exposição à DOX isolada, ou em associação com SS-31, rapamicina e Alda-1 (Figura 23).

Figura 23: Número de mitocôndrias por célula para as linhagens celulares A9 e 3A6. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão ($n \geq 10$ imagens).

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão mostrou, para ambas as linhagens celulares, aumento de alterações morfológicas mitocondriais após o tratamento com a DOX. Rupturas na estrutura da crista mitocondrial e das membranas interna e externa, e inchaço da matriz foram mais frequentemente observadas nas células tratadas com a DOX, mesmo em associação com o SS-31 e a rapamicina. Por outro lado, na associação DOX + Alda-1 foi observada diminuição da extensão das alterações morfológicas induzidas apenas pelo tratamento com a DOX (Figuras 24 e 25).

M

Figura 24: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura mitocondrial das células da linhagem A9 24 horas após o tratamento com a DOX e a Alda-1. A: cultura controle; B: células tratadas com a DOX. C: células e mitocôndrias tratadas com DOX + Alda-1. M: mitocôndria; Nuc: núcleo.

A

B

C

Figura 25: Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão mostrando a estrutura mitocondrial das células da linhagem 3A6 24 horas após o tratamento com a DOX e a Alda-1. A: cultura controle; B: células tratadas com a DOX. C: células e mitocôndrias tratadas com DOX + Alda-1. M: mitocôndria; Nuc: núcleo.

5.2.4 Análise de polimorfismos (RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism)

A quantificação de mutação no gene *ND5* induzida pela DOX no protocolo de 70 dias mostrou aumento significativo da heteroplasmia em direção ao tipo mutante nas linhagens 3A6 e 3A20-30 (DOX 0,1 μ M). Este aumento foi observado nos dias 56 e 70 no híbrido 3A6, e apenas no dia 70 no 3A20-30 (Figura 25). Não foram detectadas alterações no protocolo experimental de 4 semanas de tratamento com a DOX e os demais compostos.

Figura 26: Quantificação da heteroplasmia mitocondrial para o gene *ND5* induzida pela doxorrubicina (DOX). A: Gráfico da heteroplasmia de *ND5* obtido com dados do protocolo de 70 dias. B: Eletroforese em gel de agarose mostrando mitocôndrias com DNA selvagem (297 e 168 bp) e mutantes para o *ND5* (465 bp), e os respectivos gráficos com a porcentagem de DNAs mutantes nas linhagens 3A13, 3A6 e 3A20-30. Média \pm erro padrão. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que a droga antineoplásica doxorubicina (DOX), apesar de sua efetividade, apresenta cardiotoxicidade dose-dependente e cumulativa, com amplo espectro de alterações clínicas, que vão desde arritmias até a insuficiência cardíaca congestiva. Apesar de extensivas pesquisas para entender os mecanismos da cardiotoxicidade induzida pela DOX, não existem, ainda, tratamentos efetivos para as cardiomiopatias decorrentes. Assim, além de complementar o conhecimento sobre a atividade citotóxica da DOX, este estudo investigou a capacidade da Alda-1 em diminuir as ações deletérias do antineoplásico. Para isso, em uma primeira etapa foram avaliados os efeitos de uma (agudo) e múltiplas (crônico) doses da DOX em ratos Wistar, uma vez que já havia sido demonstrado que a cardiomiopatia induzida era dose-dependente, irreversível e mais grave em pacientes cronicamente expostos à droga (Deepa e Varalakshmi 2006). Inicialmente, nossos dados mostraram que a DOX induziu diminuição gradativa do peso corpóreo dos animais ao longo das semanas, efeito, este, que não foi minimizado pelo tratamento simultâneo com a Alda-1. A perda de peso parece ser uma resposta fisiológica comum, sendo um dos efeitos adversos também observados em pacientes sob tratamento com a DOX (Hussain et al., 2016). Segundo Biondo et al. (2016), além da diminuição da ingestão calórica e caquexia, o comprometimento da homeostase do tecido adiposo e a adipogênese (diminuição da lipogênese, lipólise e dos níveis de lipase) seriam as principais causas da perda de peso.

Para identificar possíveis alterações induzidas pela DOX no metabolismo energético, foram realizadas análises do perfil lipídico sérico e do padrão de expressão de 84 genes envolvidos em vias de β -oxidação de ácidos graxos. Os aumentos de colesterol, triglicérides e VLDL observados na última semana do tratamento crônico, foram igualmente identificados por Garg et al. (2014) e Saleem et al. (2013) em ratos expostos à DOX. De acordo com esses

autores, tais alterações podem estar relacionadas à diminuição da taxa de lipólise e ao aumento da liberação, na corrente sanguínea, de lipídios provenientes dos órgãos-fonte. Além disso, não pode ser descartado o possível comprometimento no uso desses ácidos graxos por tecidos periféricos, uma vez que já foi relatada a inibição da β -oxidação de ácidos graxos após exposição à DOX (Carvalho et al., 2014). Como consequência, portanto, poderia haver aumento da disponibilidade de triglicérides e VLDL na corrente sanguínea. Sabe-se que a hiperlipidemia é deletéria para função cardíaca e favorece o aparecimento de alterações cardiovasculares. A Alda-1, por ter sido capaz de reverter os valores de colesterol, triglicérides e VLDL, poderia ter uma ação protetora sobre esses tecidos frente à exposição à DOX e, de maneira mais evidente, no protocolo de tratamento crônico.

A insuficiência cardíaca resultante da diminuição da capacidade energética é um dos efeitos adversos centrais da DOX (Chatterjee et al. 2010b). Uma vez que o coração utiliza ATP oriundo da via de β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, e que alterações nessa via podem ser mecanismos determinantes da carditoxicidade induzida pelo antineoplásico, investigamos o perfil de expressão de genes envolvidos na via de β -oxidação. Dentre aqueles aparentemente alterados, apenas o *Fabp4* e o *Slc27a2* apresentaram-se significativamente modulados (*fold change* >2). As Fabps, proteínas de ligação a ácidos graxos e codificadas pelo gene *Fabp*, são membros de uma família altamente conservada de proteínas citosólicas encontradas em diferentes tipos celulares, e que atuam facilitando o transporte ativo de lipídios a compartimentos específicos da célula. Especificamente a proteína Fabp4 (também conhecida como aP2, ALBP ou A-FABP), esta é encontrada predominantemente no tecido adiposo, embora análises imunoistoquímicas tenham revelado que também pode estar presente em células endoteliais de diferente órgãos, incluindo o coração e o músculo esquelético (Lamounier-Zepter et al. 2009; Nickerson et al. 2009; Syamsunarno et al. 2013). Assim, a hiperexpressão da Fabp4 observada em decorrência do tratamento com a DOX pode

ser explicada como resposta celular à inibição da β -oxidação de ácidos graxos promovida pela droga, com a consequente depleção de ATP cardíaco. Portanto, a maior produção da *Fabp4* ocorreria como mecanismo para aumentar a disponibilidade de ácidos graxos em locais da conversão metabólica, na tentativa de reestabelecer a produção adequada de ATP.

A proteína codificada pelo gene *Slc27a2*, também hiperexpresso após o tratamento com a DOX, integra uma família composta por seis membros que codificam moléculas (FATP1-6) importantes na captação e transporte de ácidos graxos de cadeia longa. A proteína transportadora FATP2 é codificada pelo gene *Slc27a2*, e estudos têm mostrado que o aumento da expressão desse gene em camundongos levou ao aumento da absorção e ativação de ácidos graxos (Steinberg et al. 1999; Falcon et al. 2010). A DOX, como composto que compromete a função mitocondrial e promove a oxidação lipídica, talvez limite a produção de ATP, ao tempo em que diminui a disponibilidade de ácidos graxos necessários à sua produção. Assim, o aumento da expressão de proteínas transportadoras de ácidos graxos, como a FATP2, pode ter ação compensatória frente ao déficit energético, devido à sua capacidade de favorecer a absorção lipídica, de maneira similar ao gene *Fabp4*. Portanto, tendo em vista que a associação da Alda-1 com a DOX levou à diminuição dos níveis de expressão de *FATP2*, e com base na hipótese formulada de que a regulação positiva dos seus níveis de expressão seria uma resposta compensatória à depleção energética e indisponibilidade de ácidos graxos promovida pela DOX, pode ser sugerido o potencial protetor da Alda-1 (o tratamento com a Alda-1 levou à normalização da expressão de *FATP2* para níveis similares aos do grupo controle). Assim sendo, nossos dados corroboram estudos anteriores que demonstraram, em camundongos, que os aumentos da expressão do *Slc27a2* e da proteína transportadora de ácidos graxos, a FATP2, estão relacionados a maior absorção e ativação de ácidos graxos de cadeia longa pela célula (Steinberg et al. 1999; Falcon et al. 2010).

Resumidamente, a primeira etapa do estudo (análise dos níveis séricos de colesterol, triglicérides e lipoproteínas e análise do perfil de expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos) mostrou resultados que se complementam e favorecem o entendimento do mecanismo de citotoxicidade da DOX. Em circunstâncias fisiológicas normais, as células musculares cardíacas dependem, necessariamente, do adequado e constante fornecimento de ácidos graxos da corrente sanguínea para suprir suas necessidades energéticas. Assim, quantidades similares devem ser transferidas de compartimentos microvasculares para os cardiomiócitos. Os ácidos graxos chegam ao coração basicamente em duas formas: (1) ligados à albumina; (2) ou ligados a lipoproteínas, como as lipoproteínas de baixa densidade (VLDL e LDL). No caso do coração saudável e normalmente irrigado, este prontamente extrai e oxida ácidos graxos circulantes proporcionalmente à concentração arterial. No presente estudo foi identificado o aumento de triglicérides séricos, supostamente devido ao comprometimento do metabolismo mitocondrial promovido pela DOX. Este comprometimento inibiria a β -oxidação de ácidos graxos e levaria à retenção de lipoproteínas transportadoras na corrente sanguínea (triglicérides, LDL e VLDL), além do aumento da expressão de genes que codificam tais proteínas (*Fabp4* e *Slc27a2*), como mecanismo compensatório frente ao déficit energético, ou pela alta quantidade das lipoproteínas no sangue. Nesse mecanismo, a Alda-1 conferiria potencial protetor, tendo em vista sua atuação como agonista e simultaneamente como chaperona química, exercendo efeito alostérico para restaurar a alteração estrutural que compromete a atividade catalítica da enzima ALDH2 em condições de toxicidade pela DOX. Ao preservar e aumentar a atividade catalítica de ALDH2 nas mitocôndrias, a Alda-1 protegeria a função mitocondrial e, conseqüentemente, processos como a β -oxidação de ácidos graxos e a produção de ATP. Como explicado, o efeito compensatório, traduzido pelo aumento de proteínas transportadoras e de ácidos graxos na corrente sanguínea, não se faria mais necessário na associação DOX e Alda-1.

Considerando que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) tem sido identificada como um dos processos mais relevantes na cardiotoxicidade promovida pela DOX, para melhor entendimento do mecanismo de ação da droga foram avaliados seus efeitos sobre a lipoperoxidação; sobre a expressão do gene *ALDH2* (que codifica enzima alvo da Alda-1 e detoxificadora de aldeídos provenientes do processo de lipoperoxidação); sobre a expressão do micro-RNA 34a (regulador do gene *ALDH2*); e sobre a expressão de genes que respondem ao estresse oxidativo e que codificam proteínas importantes para a função mitocondrial, *CIQBP*, *Bax* e *Bcl-2*. No miocárdio, a lipoperoxidação foi avaliada por meio da mensuração dos níveis de 4-HNE, aldeído tóxico subproduto do processo, e que, nas mitocôndrias, é eliminado pela ação catalizadora da *ALDH2*, por meio da oxidação dos seus substratos aldeídicos. Não foram observadas diferenças nos níveis do aldeído, tão pouca alteração na expressão do *ALDH2* após a exposição à DOX ou à Alda-1, indicando que esses compostos não atuaram na via de produção de EROs tendo como subproduto o 4-HNE. Diferentemente, em estudo *in vitro* com cardiomiócitos de rato em período neonatal (1 a 2 dias de idade), Sun et al. (2014) observaram que a DOX induziu aumento do 4-HNE, e que a Alda-1 diminuiu os níveis do aldeído. Da mesma forma, mais recentemente, Gao et al. (2015) examinando camundongos tratados com a DOX (i.p. na 1^a, 4^a e 7^a semanas) e com a Alda-1 (e.v. na 3^a semana), detectaram que o antineoplásico inibia a expressão e a atividade da *ALDH2*, enquanto a associação com a Alda-1 levava à diminuição de adutos 4-HNE/proteína e de EROs no miocárdio, e que parcialmente resgatava a atividade da *ALDH2* e reduzia a mortalidade. A diferença observada entre o nosso estudo e o de Gao et al. (2015) pode estar associada, em parte, à técnica para aferir o 4-HNE. Embora Gao et al. (2015) também tivessem utilizado o ensaio imunoenzimático (ELISA), a concentração do 4-HNE foi determinada em leitor multimodal (BioTek, EUA; excitação 355 nm/emissão 460 nm), com maior sensibilidade para aferição da amostra. Além disso, os diferentes modelos

experimentais adotados poderiam também explicar a ausência de efeito dos tratamentos nos níveis cardíacos do aldeído. O período (uma semana) entre a aplicação das drogas e a determinação do 4-HNE adotado em nosso protocolo de tratamento crônico poderia não ter sido ideal para aferir esse aldeído altamente reativo (Aldini et al., 2014). No entanto, deve ser lembrado que o nível de expressão do *ALDH2* também não estava alterado no protocolo de tratamento agudo, 24 horas após a exposição à DOX e à Alda-1.

Com relação ao efeito da DOX sobre a expressão dos genes *Bcl-2*, *CIQBP* e *Bax*, apenas os dois primeiros apresentaram-se diferencialmente modulados no protocolo de tratamento agudo. O *Bcl-2* estava hiperexpresso após a exposição à DOX, mas voltou ao nível normal após o tratamento com a Alda-1. Este gene (*B-cell leukemia/lymphoma 2*) codifica uma proteína de 26 kDa da membrana mitocondrial externa, que exerce ação anti-apoptótica por meio da dimerização com seus homólogos pró-apoptóticos, resultando na inibição do citocromo C liberado da mitocôndria (Nelyudova et al. 2007). A proteína Bcl-2 bloqueia a apoptose promovida por ampla variedade de insultos, incluindo múltiplas classes de agentes quimioterápicos. No entanto, investigações mais detalhadas desta proteína são fundamentais, tendo em vista que a apoptose de cardiomiócitos é um evento importante na cardiotoxicidade promovida pela DOX (Lv et al. 2012). Há estudos mostrando que a hiperexpressão do *Bcl-2* pode estar associada a mecanismos celulares de adaptação ao estresse oxidativo, fortalecendo as defesas antioxidantes da célula e diminuindo a produção excessiva de radicais promovidas por diferentes estímulos, dentre os quais a inibição do poro de permeabilidade transitória mitocondrial (mPTP) (Kowaltowsky et al., 2000; Chen et al., 2003; Kowaltowsky & Fiskum, 2005). Portanto, os resultados do nosso estudo sugerem uma resposta adaptativa e protetora dos cardiomiócitos frente à morte celular induzida pela DOX, especialmente porque esse mecanismo foi observado apenas em condições de exposição aguda, tendo em vista que após múltiplos tratamentos não foram detectadas diferenças nos níveis de expressão do *Bcl-2*. A

associação da DOX com a Alda-1 levou à diminuição da expressão do gene a níveis similares a aqueles observados nos cardiomiócitos dos animais do grupo controle, o que, diante da hipótese acima, poderia indicar mecanismo protetor. Sabe-se que a Alda-1 tem ação protetora sobre as mitocôndrias por meio da preservação da estrutura e aumento da atividade da isoforma mitocondrial ALDH2. A ALDH2, por sua vez, atua na eliminação de subprodutos do processo de oxidação lipídica resultado do aumento da produção de EROs induzida pela DOX. Efeitos deletérios dessa exposição têm características progressivas, e o comprometimento da função mitocondrial *per se* levaria ao aumento da produção de EROs e ineficiência na produção energética. A Alda-1, por preservar tais estruturas e o funcionamento mitocondrial, induziria a diminuição de mecanismos celulares próprios, os quais são ativados em situações de toxicidade, como, por exemplo, o aumento dos níveis de expressão de *Bcl-2* que, como mencionado, protege a célula em situações de produção excessiva de EROs.

O gene *CIQBP* codifica a proteína C1QBP (*complement 1q-binding protein*), também conhecida como p32, HABP1 e gC1qR. Apesar de ter sido identificada em múltiplos compartimentos subcelulares, diversos estudos têm demonstrado que a C1QBP está predominantemente localizada na mitocôndria (McGee e Baines 2011; Hu et al. 2013). Tem sido também descrito que a C1QBP é um componente do mPTP e que a hiperexpressão do gene *CIQBP* está relacionada ao aumento da produção de EROs na mitocôndria, o que sugere função desta proteína na morte celular via mitocôndria (Chowdhury et al., 2008; McGee e Baines 2011). Sabe-se que a indução do mPTP é um fenômeno deletério que favorece a apoptose e que é importante na cardiotoxicidade promovida pela DOX (Vaseva et al. 2012). A indução do mPTP resulta no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, levando a abertura de poros não-seletivos que permitem a passagem de moléculas abaixo de 1,5 kDa. Essa abertura tem sido também associada ao inchaço osmótico e a danos estruturais nas mitocôndrias, sendo sua natureza molecular ainda motivo de debate (Carvalho

et al., 2014). A literatura tem mostrado que a expressão aumentada do *CIQBP* está também relacionada à expressão do *Bax* e à liberação do citocromo c (Chowdhury, Ghosh, e Datta 2008; Carvalho et al. 2014). Entretanto, os resultados são ainda controversos, uma vez que há estudos que indicam que a proteína CIQBP pode agir como inibidor endógeno do mPTP e que seu aumento de expressão poderia inibir o estresse oxidativo e a citotoxicidade. McGee et al. (2011) encontraram efeito citoprotetor similar, não tendo identificando alterações nos níveis de expressão de *Bax* que estivessem associadas ao aumento da expressão do *CIQBP*. Da mesma forma, nossos resultados não mostraram alterações nos níveis de expressão do *Bax*, embora o *Bcl-2* e o *CIQBP* estivessem hiperexpressos, fato que reforça a hipótese de que em condições de tratamento agudo ocorre uma resposta adaptativa e protetora dos cardiomiócitos contra a morte celular induzida por DOX.

Nos últimos anos, os estudos sobre a expressão de transcritos não-codificadores, mais especificamente os microRNAs, têm crescido em importância, pois permitem a identificação de moléculas que atuam como agentes moduladores da expressão gênica em condições cardíacas diversas, como infarto do miocárdio, doença hipertensiva e cardiotoxicidade promovida pela DOX (Ghigo et al. 2016). De fato, investigações sobre o perfil de expressão de microRNAs no miocárdio têm proporcionado a identificação de transcritos responsivos às exposições aguda e crônica à DOX (Roca-Alonso et al. 2015; Tong et al. 2015). Recentemente, Holmgreen et al. (2016) avaliaram os efeitos agudo e crônico da exposição ao agente antineoplásico sobre a expressão de microRNAs em cardiomiócitos derivados de células humanas pluripotentes e observaram que muitos dos transcritos estavam diferencialmente expressos após o tratamento com a droga. Dentre esses estava o miR-34a, que está associado a processos de apoptose e senescência celular (Boon et al. 2013), além de ter função ainda mais central na cardiotoxicidade, por ser capaz de interagir diretamente com a ALDH2. Utilizando o ensaio da luciferase, Fan et al. (2013) identificaram que o miR-34a

tem como alvo direto a ALDH2, e que sua expressão em cardiomiócitos de ratos neonatos está associada à indução de apoptose e à diminuição da expressão da ALDH2. Da mesma forma, Chen et al. (2010) observaram que a expressão aumentada do miR-34a em células HepG2 também está associada à inibição da expressão da ALDH2.

Tendo em vista a relação entre o miR-34a e a ALDH2, bem como sua resposta frente a exposição à DOX, no presente estudo foi também investigado os níveis de expressão do miRNA, especialmente considerando seu possível papel como regulador em vias de toxicidade promovidas pela DOX, e por interagir diretamente com a enzima alvo da Alda-1. Nas comparações entre os animais sob protocolo de tratamento agudo não foram observadas diferenças significativas, indicando que a exposição ao antineoplásico e à Alda-1, isoladas ou em associação, não levou a alterações na expressão do miR-34a em cardiomiócitos de ratos. Apesar de estudos anteriores terem apontado para a interação entre o miR-34a e a ALDH2, bem como para a sensibilidade frente à exposição a DOX, esses foram realizados em condições experimentais *in vitro*. Provavelmente, nas condições do presente estudo, a expressão do microRNA possa ter sido influenciada por outros fatores, tendo em vista que o miR-34a tem se mostrado diferencialmente expresso sob diferentes estímulos (Baker et al. 2016; Liu et al. 2016).

Apesar do conhecimento acumulado, importantes aspectos da toxicidade da DOX ainda não foram elucidados. Assim, neste estudo foram também incluídas avaliações *in vitro* (com linhagens de híbridos) para investigar os efeitos da DOX na indução de heteroplasmia mitocondrial, mais especificamente em mitocôndrias com mutações no gene *ND5*. Apesar da literatura descrever a capacidade do antineoplásico em gerar danos no mtDNA (Pillai et al. 2016), este foi o primeiro estudo a mostrar que a DOX interfere na heteroplasmia mitocondrial, além de avaliar a concentração das diferentes espécies moleculares de cardiolipina, morfologia mitocondrial e viabilidade celular.

Uma importante característica da toxicidade da DOX é o fato de que muitos dos pacientes que sobrevivem à quimioterapia com a droga desenvolvem cardiotoxicidade 10-20 anos após o término do tratamento (Lipshultz et al. 2008). A cardiomiopatia de início tardio apresenta-se em aproximadamente 1,6% a 5% dos pacientes, a maioria com resultados normais dos exames cardíacos, antes e logo após a quimioterapia. Os mecanismos que levam à cardiomiopatia são ainda desconhecidos, mas a característica progressiva da doença, com evolução para quadros mais severos mesmo na ausência da DOX, apontam para alterações no mtDNA como possível causa principal (Kumar et al. 2012; Carvalho et al. 2014). De fato, nossos resultados evidenciaram o potencial da DOX em aumentar os níveis de mutações no *ND5*, fato que corrobora a associação entre alterações no mtDNA e a cardiomiopatia decorrente do tratamento.

A DOX pode promover danos no mtDNA diretamente, pela formação de adutos, ou indiretamente, por meio do aumento da produção de EROs, comprometendo o processo de síntese da maquinaria mitocondrial (Ashley & Poulton 2009). A oxidação do mtDNA pode resultar em defeitos na cadeia respiratória, o que impediria a resposta adequada às altas demandas de energia do tecido cardíaco, e no aumento da produção de EROs, processo que perpetuaria a falha bioenergética. Uma importante evidência da toxicidade mitocondrial induzida pela DOX, são alterações no mtDNA (incluindo rearranjos, deleções e diminuição do número de cópias), encontradas no tecido muscular cardíaco, mas não no músculo esquelético, tanto em modelos animais como em pacientes (*post-mortem*) submetidos ao tratamento com DOX (Lebrecht et al. 2005; Carvalho et al. 2014). As mutações no mtDNA por mecanismos como segregação vegetativa ou replicação relaxada, podem aumentar em frequência dentro de uma população e contribuir para o comprometimento da função mitocondrial, com prejuízos à cadeia transportadora de elétrons (Stewart & Chinnery 2015). Alterações na cadeia transportadora de elétrons podem favorecer a produção de EROs e,

consequentemente, aumentar os danos no mtDNA. Esse processo cíclico poderia explicar a natureza cumulativa e persistente da cardiotoxicidade induzida pela DOX, mesmo na ausência do tratamento. Dessa forma, e como observado clinicamente, a falha cardíaca poderia surgir décadas após o tratamento com a droga.

A escolha dos cíbridos com aproximadamente 20%, 50% e 90% de *ND5* mutado, além de ter possibilitado avaliar se a exposição à DOX levaria a mudanças nos níveis de heteroplasmia, permitiu investigar se defeitos na cadeia respiratória também poderiam potencializar o efeito desta droga. O cíbrido 3A6, com 50% de heteroplasmia, foi a linhagem mais sensível à ação da DOX, apresentando, mais precocemente, aumento de cerca de 20% da proporção de mtDNA com o *ND5* mutante. A linhagem 3A20-30 (~ 90% de heteroplasmia) por sua vez, apresentou aumento mais tardio e de apenas 5% do tipo mutante. O cíbrido 3A13, com apenas 10% de heteroplasmia, não apresentou diferenças após tratamentos com a DOX. Assim, apenas as células com os maiores níveis de heteroplasmia mitocondrial foram sensíveis à DOX. A mutação no gene *ND5*, presente em altos níveis nas linhagens 3A13 e 3A20-30, é uma transversão C para A, que modifica o códon CGA (arginina) para um códon de parada AGA. O gene, então, que codificaria uma subunidade do Complexo I mitocondrial, com 607 aminoácidos, passa a codificar uma proteína truncada com apenas 115 aminoácidos (Bai et al. 2000). O Complexo I mitocondrial é o principal ponto de entrada de elétrons para cadeia transportadora, e, defeitos em sua estrutura, bem como a inibição por drogas, são formas efetivas de promover o aumento de produção de EROs (Seo et al. 2006). Assim sendo, a produção aumentada de EROs, observada nas linhagens com maiores níveis de heteroplasmia poderia ser uma explicação para a sensibilidade das células à ação DOX.

A quantificação das diferentes espécies moleculares de cardiolipina foi outra estratégia utilizada para identificar os mecanismos de cardiotoxicidade da DOX. Devido a ação central na formação da estrutura das cristas mitocôndriais e organização dos componentes da cadeia

transportadora de elétrons, a cardiolipina tem sido considerada alvo potencial de drogas (Schlame & Ren, 2009). Esse fosfolípido possivelmente desempenha papel crítico no acúmulo da DOX, devido à formação de forte complexo com DOX e DOX-Fe³⁺. Os metabólitos da DOX que se acumulam na membrana mitocondrial interna são facilmente reduzidos pelo Complexo I (NADH-ubiquinona redutase), e essa redução pode ser intensificada pela interação com a cardiolipina, resultando na retenção da DOX na membrana interna, com contínuo ciclo redox e consequente aumento de danos oxidativos nas mitocôndrias (Aryal & Rao 2016).

A cardiolipina pode ocorrer sob diferentes configurações moleculares, embora não seja claro o significado das diferentes espécies. Apesar de importante no processo de toxicidade da DOX (Aryal & Rao 2016), o perfil molecular da cardiolipina sob condições de exposição à droga não foi ainda estudado. Dentre os motivos para isso, está a quase inexistência de técnicas para a identificação precisa das espécies. No presente estudo, a identificação das configurações moleculares da cardiolipina foi realizada pela técnica de *shotgun* lipidômico. Não foi observada alteração na concentração total, nem no padrão molecular das cardiolipinas, imediatamente após exposição de 24h à DOX. No entanto, a efetividade do antineoplásico em induzir toxicidade nas condições testadas foi confirmada pela análise de viabilidade celular realizada no mesmo momento. Assim, pode-se sugerir que alterações nas concentrações e espécies de cardiolipinas não foi um evento inicial da toxicidade da DOX.

Aryal e Rao (2016) investigaram a toxicidade da DOX em cultura de linfócitos B provenientes de pacientes com Síndrome de Barth (caracterizada por cardiomiopatia, neutropenia e retardo de crescimento), doença ligada ao cromossomo X e causada por mutação recessiva no gene *tafazzin*, responsável pelo remodelamento da cardiolipina em seu estágio final de biosíntese e que leva à diminuição da espécie tetraoleil cardiolipina (18:1-

18:1-18:1-18:1) na membrana mitocondrial interna. Esses autores identificaram que as células dos pacientes com a síndrome, e que, conseqüentemente, apresentavam menor concentração de cardiolipina, eram menos sensíveis à DOX, apresentando menor quantidade de células em apoptose e menor produção de EROs. Segundo os autores, a maior concentração de cardiolipina produz maior retenção de DOX no interior da mitocôndria, estando diretamente relacionada ao aumento de toxicidade. Apesar da DOX se ligar à cardiolipina, favorecendo sua retenção nas mitocôndrias, nosso estudo mostrou que esse processo não produz mudanças no perfil das espécies moleculares, e que sua toxicidade ocorre independentemente destas de alterações.

Além de fornecer importantes informações sobre os mecanismos de toxicidade da DOX, o estudo *in vitro* confirmou a atividade protetora da Alda-1, tanto pelo aumento da viabilidade das células expostas ao antineoplásico, como pela preservação da morfologia mitocondrial. Embora não tenha sido possível determinar o exato mecanismo de ação da Alda-1, sabe-se que este composto tem capacidade de aumentar a atividade da enzima ALDH2, amplificando a remoção dos subprodutos da lipoperoxidação que são tóxicos às células (Chen et al., 2008a; Sun et al., 2014). De fato, nossas análises microscópicas evidenciaram maior preservação da morfologia mitocondrial nas células tratadas com DOX + Alda1. Esse achado concorda com estudos anteriores que mostraram que a hiperexpressão ou ativação da ALDH2 tem efeito protetivo sobre a integridade da crista e deformação mitocondrial (Sun et al., 2014; Yin et al., 2018). Por outro lado, nossos resultados permitem indiretamente sugerir que o efeito protetor da Alda-1 não se deu via proteção da cardiolipina, uma vez que o SS-31 (conhecido agente que interage com a cardiolipina) não preservou as células dos efeitos nocivos da DOX. Além disso, a atividade protetora da Alda-1 ocorreu também sob condições de heteroplasmia mitocondrial para o gene *ND5*, fato que amplia o

espectro de ação protetora do composto para ambientes com maior produção de estresse oxidativo.

Finalizando, na etapa *in vivo* nossos resultados confirmaram o efeito deletério da DOX sobre o perfil lipídico e evidenciaram a interferência da droga na expressão dos genes *Fabp4* e *Slc27a2* (transporte de ácidos graxos) e *Bcl-2* e *CIQBP* (proteção contra estresse oxidativo) no tecido cardíaco. Por outro lado, o estudo confirmou o potencial protetor da Alda-1 sobre a DOX, mostrando que o composto atuou diminuindo a hiperlipidemia e a expressão dos genes hiperexpressos pela ação do antineoplásico (*Slc27a2*, *Bcl-2* e *CIQBP*). Os resultados *in vitro*, por sua vez, permitiram identificar outros possíveis mecanismos de ação da DOX, especialmente relacionados à toxicidade tardia, como alterações na heteroplasmia mitocondrial. Ao mesmo tempo, os resultados confirmaram os achados *in vivo* sobre o efeito protetor da Alda-1, aumentando a viabilidade celular e preservando a estrutura mitocondrial.

7. CONCLUSÕES

A realização do presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

- o tratamento crônico (múltiplo) com a DOX promoveu alterações no perfil lipídico, as quais foram revertidas pela Alda-1;
- o tratamento agudo com a DOX aumentou os níveis de expressão dos genes *Fabp4* e *Slc27a2*, que codificam proteínas transportadoras de ácidos graxos;
- a Alda-1 foi capaz de reduzir o aumento da expressão do *Slc27a2* promovido pela DOX;
- o tratamento agudo com a DOX aumentou os níveis de expressão dos genes *Bcl-2* e *CIQBP*, ambos reduzidos após a administração conjunta com a Alda-1;
- os níveis de expressão do gene *ALDH2* e do microRNA miR-34a não foram alterados pela ação da DOX e da Alda-1;
- os níveis de lipoperoxidação em cardiomiócitos não foram alterados pela ação de DOX e Alda-1;
- a DOX foi capaz de alterar a heteroplasmia mitocondrial do gene *ND5* em direção ao genótipo mutante, sendo esta habilidade um potencial fator contribuinte na cardiotoxicidade de início tardio;

- a DOX promoveu alterações na estrutura mitocondrial sendo a Alda-1 capaz de preservá-la;
- a Alda-1 protegeu as células expostas à DOX preservando a viabilidade;
- a DOX não promoveu alterações nas concentrações das espécies moleculares de cardiolipina após 24 horas de exposição;
- A Alda-1 apresentou potencial protetor contra alterações promovidas pela DOX em cardiomiócitos de ratos Wistar, e em fibroblastos e híbridos *in vitro*.

Finalizando, diante de todos esses achados, pode-se concluir que, além dos mecanismos de ação já conhecidos, a DOX também atua modulando genes envolvidos no transporte de ácidos graxos e estresse oxidativo mitocondrial, bem como alterando a heteroplasmia do mtDNA. Por outro lado, os resultados confirmaram o efeito protetor da Alda-1 contra os efeitos tóxicos da DOX, mostrando sua ação redutora da hiperlipidemia e sobre a expressão gênica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ansari A, Rahman MS, Saha SK, Saikot FK, Deep A, Kim K. 2017. Function of the SIRT3 mitochondrial deacetylase in cellular physiology, cancer, and neurodegenerative disease. *Aging Cell*. 16:4–16.

Armstrong GT, Plana JC, Zhang N, Srivastava D, Green DM, Ness KK, Daniel Donovan F, Metzger ML, Arevalo A, Durand J-B, et al. 2012. Screening adult survivors of childhood cancer for cardiomyopathy: comparison of echocardiography and cardiac magnetic resonance imaging. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 30:2876–2884.

Aryal B, Rao VA. 2016. Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes. *PLoS ONE* [Internet]. [cited 2018 Aug 30]; 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4951097/>

Ascensão A, Lumini-Oliveira J, Machado NG, Ferreira RM, Gonçalves IO, Moreira AC, Marques F, Sardão VA, Oliveira PJ, Magalhães J. 2011. Acute exercise protects against calcium-induced cardiac mitochondrial permeability transition pore opening in doxorubicin-treated rats. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 120:37–49.

Ashley N, Poulton J. 2009. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs. *Biochem Biophys Res Commun*. 378:450–455.

Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014:360438.

Bai Y, Shakeley RM, Attardi G. 2000. Tight control of respiration by NADH dehydrogenase ND5 subunit gene expression in mouse mitochondria. *Mol Cell Biol*. 20:805–815.

Baker JR, Vuppusetty C, Colley T, Papaioannou AI, Fenwick P, Donnelly L, Ito K, Barnes PJ. 2016. Oxidative stress dependent microRNA-34a activation via PI3K α reduces the expression of sirtuin-1 and sirtuin-6 in epithelial cells. *Sci Rep.* 6:35871.

Benedetti A, Comporti M, Esterbauer H. 1980. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim Biophys Acta.* 620:281–296.

Bian Y, Chen Y, Xu F, Xue L, Ji W, Zhang Y. 2010. The polymorphism in aldehyde dehydrogenase-2 gene is associated with elevated plasma levels of high-sensitivity C-reactive protein in the early phase of myocardial infarction. *Tohoku J Exp Med.* 221:107–112.

Bonadonna G, Monfardini S, De Lena M, Fossati-Bellani F, Beretta G. 1970. Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin (NSC 123127). *Cancer Res.* 30:2572–2582.

Bonadonna G, Monfardini S, de Lena M, Fossati-Bellani F. 1969. Clinical Evaluation of Adriamycin, a New Antitumour Antibiotic. *Br Med J.* 3:503–506.

Boon RA, Iekushi K, Lechner S, Seeger T, Fischer A, Heydt S, Kaluza D, Tréguer K, Carmona G, Bonauer A, et al. 2013. MicroRNA-34a regulates cardiac ageing and function. *Nature.* 495:107–110.

Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. 2016. 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress? *Am J Physiol Cell Physiol.* 311:C537–C543.

Burgess DJ, Doles J, Zender L, Xue W, Ma B, McCombie WR, Hannon GJ, Lowe SW, Hemann MT. 2008. Topoisomerase levels determine chemotherapy response in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:9053–9058.

Calamaras TD, Lee C, Lan F, Ido Y, Siwik DA, Colucci WS. 2015. The lipid peroxidation product 4-hydroxy-trans-2-nonenal causes protein synthesis in cardiac myocytes via activated mTORC1-p70S6K-RPS6 signaling. *Free Radic Biol Med.* 82:137–146.

Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. 2014. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 34:106–135.

Chang Y-C, Chiu Y-F, Lee I-T, Ho L-T, Hung Y-J, Hsiung CA, Quertermous T, Donlon T, Lee W-J, Lee P-C, et al. 2012. Common ALDH2 genetic variants predict development of hypertension in the SAPHIRE prospective cohort: gene-environmental interaction with alcohol consumption. *BMC Cardiovasc Disord.* 12:58.

Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. 2010a. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology.* 115:155–162.

Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, Karliner JS. 2010b. Doxorubicin Cardiomyopathy. *Cardiology.* 115:155–162.

Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. 2008a. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 321:1493–1495.

Chen C-H, Budas GR, Churchill EN, Disatnik M-H, Hurley TD, Mochly-Rosen D. 2008b. Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science.* 321:1493–1495.

Chen C-H, Ferreira JCB, Gross ER, Mochly-Rosen D. 2014. Targeting aldehyde dehydrogenase 2: new therapeutic opportunities. *Physiol Rev.* 94:1–34.

- Chen C-H, Sun L, Mochly-Rosen D. 2010. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase and cardiac diseases. *Cardiovasc Res.* 88:51–57.
- Chowdhury AR, Ghosh I, Datta K. 2008. Excessive reactive oxygen species induces apoptosis in fibroblasts: role of mitochondrially accumulated hyaluronic acid binding protein 1 (HABP1/p32/gC1qR). *Exp Cell Res.* 314:651–667.
- Coldwell KE, Cutts SM, Ognibene TJ, Henderson PT, Phillips DR. 2008. Detection of Adriamycin–DNA adducts by accelerator mass spectrometry at clinically relevant Adriamycin concentrations. *Nucleic Acids Res.* 36:e100.
- Deepa PR, Varalakshmi P. 2006. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac and renal toxicity. *Toxicology.* 217:176–183.
- DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, Alteri R, Robbins AS, Jemal A. 2014. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 64:252–271.
- Doorn JA, Hurley TD, Petersen DR. 2006. Inhibition of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by 4-hydroxynon-2-enal and 4-oxonon-2-enal. *Chem Res Toxicol.* 19:102–110.
- Ewer MS, Ewer SM. 2010. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat Rev Cardiol.* 7:564–575.
- Falcon A, Doege H, Fluit A, Tsang B, Watson N, Kay MA, Stahl A. 2010. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 299:E384-393.

Fan F, Sun A, Zhao H, Liu X, Zhang W, Jin X, Wang C, Ma X, Shen C, Zou Y, et al. 2013. MicroRNA-34a promotes cardiomyocyte apoptosis post myocardial infarction through down-regulating aldehyde dehydrogenase 2. *Curr Pharm Des.* 19:4865–4873.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18:499–502.

Ganz PA, Hussey MA, Moinpour CM, Unger JM, Hutchins LF, Dakhil SR, Giguere JK, Goodwin JW, Martino S, Albain KS. 2008. Late cardiac effects of adjuvant chemotherapy in breast cancer survivors treated on Southwest Oncology Group protocol s8897. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 26:1223–1230.

Gao Y, Xu Y, Hua S, Zhou S, Wang K. 2015. ALDH2 attenuates Dox-induced cardiotoxicity by inhibiting cardiac apoptosis and oxidative stress. *Int J Clin Exp Med.* 8:6794–6803.

Ge W, Guo R, Ren J. 2011. AMP-dependent kinase and autophagic flux are involved in aldehyde dehydrogenase-2-induced protection against cardiac toxicity of ethanol. *Free Radic Biol Med.* 51:1736–1748.

Ghigo A, Li M, Hirsch E. 2016. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta.* 1863:1916–1925.

Gong D, Zhang Y, Zhang H, Gu H, Jiang Q, Hu S. 2012. Aldehyde dehydrogenase-2 activation during cardioplegic arrest enhances the cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Toxicol.* 12:350–358.

Gratia S, Kay L, Potenza L, Seffouh A, Novel-Chaté V, Schnebelen C, Sestili P, Schlattner U, Tokarska-Schlattner M. 2012. Inhibition of AMPK signalling by doxorubicin: at the

crossroads of the cardiac responses to energetic, oxidative, and genotoxic stress. *Cardiovasc Res.* 95:290–299.

Hlaváčová M, Gumulec J, Stračina T, Fojtů M, Raudenská M, Masařík M, Nováková M, Paulová H. 2015. Different doxorubicin formulations affect plasma 4-hydroxy-2-nonenal and gene expression of aldehyde dehydrogenase 3A1 and thioredoxin reductase 2 in rat. *Physiol Res.* 64 Suppl 5:S653-660.

Holmgren G, Synnergren J, Andersson CX, Lindahl A, Sartipy P. 2016. MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA.* 34:26–34.

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA. 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 331:717–719.

Hong YM, Kim HS, Yoon H-R. 2002. Serum lipid and fatty acid profiles in adriamycin-treated rats after administration of L-carnitine. *Pediatr Res.* 51:249–255.

Hrelia S, Fiorentini D, Maraldi T, Angeloni C, Bordoni A, Biagi PL, Hakim G. 2002. Doxorubicin induces early lipid peroxidation associated with changes in glucose transport in cultured cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta.* 1567:150–156.

Hu M, Crawford SA, Henstridge DC, Ng IHW, Boey EJH, Xu Y, Febbraio MA, Jans DA, Bogoyevitch MA. 2013. p32 protein levels are integral to mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology, cell metabolism and survival. *Biochem J.* 453:381–391.

Kaiserová H, Simunek T, Sterba M, den Hartog GJM, Schröterová L, Popelová O, Gersl V, Kvasnicková E, Bast A. 2007. New iron chelators in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol.* 7:145–150.

- Kumar S, Marfatia R, Tannenbaum S, Yang C, Avelar E. 2012. Doxorubicin-induced cardiomyopathy 17 years after chemotherapy. *Tex Heart Inst J.* 39:424–427.
- Kuznetsov AV, Margreiter R, Amberger A, Saks V, Grimm M. 2011. Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1813:1144–1152.
- Lagranha CJ, Deschamps A, Aponte A, Steenbergen C, Murphy E. 2010. Sex differences in the phosphorylation of mitochondrial proteins result in reduced production of reactive oxygen species and cardioprotection in females. *Circ Res.* 106:1681–1691.
- Lamounier-Zepter V, Look C, Alvarez J, Christ T, Ravens U, Schunck W-H, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Morano I. 2009. Adipocyte fatty acid-binding protein suppresses cardiomyocyte contraction: a new link between obesity and heart disease. *Circ Res.* 105:326–334.
- Lebrecht D, Kokkori A, Ketelsen U-P, Setzer B, Walker UA. 2005. Tissue-specific mtDNA lesions and radical-associated mitochondrial dysfunction in human hearts exposed to doxorubicin. *J Pathol.* 207:436–444.
- Lebrecht D, Setzer B, Ketelsen U-P, Haberstroh J, Walker UA. 2003. Time-dependent and tissue-specific accumulation of mtDNA and respiratory chain defects in chronic doxorubicin cardiomyopathy. *Circulation.* 108:2423–2429.
- Lipshultz SE, Alvarez JA, Scully RE. 2008. Anthracycline associated cardiotoxicity in survivors of childhood cancer. *Heart Br Card Soc.* 94:525–533.

- Liu X-L, Pan Q, Zhang R-N, Shen F, Yan S-Y, Sun C, Xu Z-J, Chen Y-W, Fan J-G. 2016. Disease-specific miR-34a as diagnostic marker of non-alcoholic steatohepatitis in a Chinese population. *World J Gastroenterol.* 22:9844–9852.
- LoPachin RM, Gavin T. 2014. Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. *Chem Res Toxicol.* 27:1081–1091.
- Lv X, Yu X, Wang Yiyang, Wang F, Li H, Wang Yanping, Lu D, Qi R, Wang H. 2012. Berberine inhibits doxorubicin-triggered cardiomyocyte apoptosis via attenuating mitochondrial dysfunction and increasing Bcl-2 expression. *PloS One.* 7:e47351.
- Mali VR, Palaniyandi SS. 2014. Regulation and therapeutic strategies of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in heart disease. *Free Radic Res.* 48:251–263.
- McGee AM, Baines CP. 2011. Complement 1q-binding protein inhibits the mitochondrial permeability transition pore and protects against oxidative stress-induced death. *Biochem J.* 433:119–125.
- Mitry MA, Edwards JG. 2016. Doxorubicin induced heart failure: Phenotype and molecular mechanisms. *IJC Heart Vasc.* 10:17–24.
- Montaigne D, Marechal X, Preau S, Baccouch R, Modine T, Fayad G, Lancel S, Neviere R. 2011. Doxorubicin induces mitochondrial permeability transition and contractile dysfunction in the human myocardium. *Mitochondrion.* 11:22–26.
- Nelyudova A, Aksenov ND, Pospelov V, Pospelova T. 2007. By Blocking Apoptosis, Bcl-2 in p38-Dependent Manner Promotes Cell Cycle Arrest and Accelerated Senescence After DNA Damage and Serum Withdrawal. *Cell Cycle.* 6:2171–2177.

Nickerson JG, Alkhateeb H, Benton CR, Lally J, Nickerson J, Han X-X, Wilson MH, Jain SS, Snook LA, Glatz JFC, et al. 2009. Greater Transport Efficiencies of the Membrane Fatty Acid Transporters FAT/CD36 and FATP4 Compared with FABPpm and FATP1 and Differential Effects on Fatty Acid Esterification and Oxidation in Rat Skeletal Muscle. *J Biol Chem.* 284:16522–16530.

Nitiss KC, Nitiss JL. 2014. Twisting and ironing: doxorubicin cardiotoxicity by mitochondrial DNA damage. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 20:4737–4739.

Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. 2012. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol.* 52:1213–1225.

Pang J, Wang J, Zhang Y, Xu F, Chen Y. 2017. Targeting acetaldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) in heart failure-Recent insights and perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 1863:1933–1941.

Pedrycz A, Kramkowska A. 2016. Adriamycin - efficacy and possible adverse effects. *Curr Probl Psychiatry.* 17:38–46.

Perez-Miller S, Younus H, Vanam R, Chen C-H, Mochly-Rosen D, Hurley TD. 2010. Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nat Struct Mol Biol.* 17:159–164.

Pillai VB, Bindu S, Sharp W, Fang YH, Kim G, Gupta M, Samant S, Gupta MP. 2016. Sirt3 protects mitochondrial DNA damage and blocks the development of doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 310:H962-972.

Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. 2010. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol.* 17:421–433.

Renu K, V.g. A, P.b. TP, Arunachalam S. 2018. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *Eur J Pharmacol.* 818:241–253.

Roca-Alonso L, Castellano L, Mills A, Dabrowska AF, Sikkell MB, Pellegrino L, Jacob J, Frampton AE, Krell J, Coombes RC, et al. 2015. Myocardial MiR-30 downregulation triggered by doxorubicin drives alterations in β -adrenergic signaling and enhances apoptosis. *Cell Death Dis.* 6:e1754.

Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, Hachet O, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. 2015. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci.* 36:326–348.

Schauenstein E. 1967. Autoxidation of polyunsaturated esters in water: chemical structure and biological activity of the products. *J Lipid Res.* 8:417–428.

Schlame M, Ren M. 2009. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1788:2080–2083.

Schlame M, Rua D, Greenberg ML. 2000. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Prog Lipid Res.* 39:257–288.

Segredo MP de F, Salvadori DMF, Rocha NS, Moretto FCF, Correa CR, Camargo EA, de Almeida DC, Reis RAS, Freire CMM, Braz MG, et al. 2014. Oxidative stress on cardiotoxicity after treatment with single and multiple doses of doxorubicin. *Hum Exp Toxicol.* 33:748–760.

- Seo BB, Marella M, Yagi T, Matsuno-Yagi A. 2006. The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I. *FEBS Lett.* 580:6105–6108.
- Siems W, Grune T. 2003. Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal. *Mol Aspects Med.* 24:167–175.
- Simůnek T, Stérba M, Popelová O, Adamcová M, Hrdina R, Gersl V. 2009. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol Rep PR.* 61:154–171.
- Steinberg SJ, Wang SJ, McGuinness MC, Watkins PA. 1999. Human liver-specific very-long-chain acyl-coenzyme A synthetase: cDNA cloning and characterization of a second enzymatically active protein. *Mol Genet Metab.* 68:32–42.
- Stewart JB, Chinnery PF. 2015. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat Rev Genet.* 16:530–542.
- Sun A, Cheng Y, Zhang Y, Zhang Q, Wang S, Tian S, Zou Y, Hu K, Ren J, Ge J. 2014. Aldehyde dehydrogenase 2 ameliorates doxorubicin-induced myocardial dysfunction through detoxification of 4-HNE and suppression of autophagy. *J Mol Cell Cardiol.* 71:92–104.
- Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. 2003. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer.* 97:2869–2879.
- Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, Phillips DR, Cutts SM. 2006. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res.* 66:4863–4871.

- Syamsunarno MRAA, Iso T, Hanaoka H, Yamaguchi A, Obokata M, Koitabashi N, Goto K, Hishiki T, Nagahata Y, Matsui H, et al. 2013. A Critical Role of Fatty Acid Binding Protein 4 and 5 (FABP4/5) in the Systemic Response to Fasting. *PLoS ONE*. 8:e79386.
- Szeto HH. 2014. First-in-class cardiolipin-protective compound as a therapeutic agent to restore mitochondrial bioenergetics. *Br J Pharmacol*. 171:2029–2050.
- Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. 2013. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol*. 65:157–170.
- Takemura G, Fujiwara H. 2007. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis*. 49:330–352.
- Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, Altman RB. 2011. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*. 21:440–446.
- Tokarska-Schlattner M, Zaugg M, Zuppinger C, Wallimann T, Schlattner U. 2006. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *J Mol Cell Cardiol*. 41:389–405.
- Tong Z, Jiang B, Wu Y, Liu Y, Li Y, Gao M, Jiang Y, Lv Q, Xiao X. 2015. MiR-21 Protected Cardiomyocytes against Doxorubicin-Induced Apoptosis by Targeting BTG2. *Int J Mol Sci*. 16:14511–14525.
- Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*. 149:1536–1548.

Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*. 242:1427–1430.

Wallace KB. 2003. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy. *Pharmacol Toxicol*. 93:105–115.

Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. 2014. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biol*. 2:619–631.

Yang F, Teves SS, Kemp CJ, Henikoff S. 2014. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim Biophys Acta*. 1845:84–89.

Yin H, Xu L, Porter NA. 2011. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*. 111:5944–5972.

Yin J, Guo J, Zhang Q, Cui L, Zhang L, Zhang T, Zhao J, Li J, Middleton A, Carmichael PL, Peng S. 2018. Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway. *Toxicol Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 51:1–10.

Yoval-Sánchez B, Rodríguez-Zavala JS. 2012. Differences in susceptibility to inactivation of human aldehyde dehydrogenases by lipid peroxidation byproducts. *Chem Res Toxicol*. 25:722–729.

Yu H-S, Oyama T, Isse T, Kitakawa K, Ogawa M, Pham T-T-P, Kawamoto T. 2009. Characteristics of aldehyde dehydrogenase 2 (Aldh2) knockout mice. *Toxicol Mech Methods*. 19:535–540.

Zagotto G, Gatto B, Moro S, Sissi C, Palumbo M. 2001. Anthracyclines: recent developments in their separation and quantitation. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 764:161–171.

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu L-S, Lyu YL, Liu LF, Yeh ETH. 2012. Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med.* 18:1639–1642.

Zhang Y, Chen L, Li F, Wang H, Yao Y, Shu J, Ying M-Z. 2016. Cryptotanshinone protects against adriamycin-induced mitochondrial dysfunction in cardiomyocytes. *Pharm Biol.* 54:237–242.

Zhao Y, Miriyala S, Miao L, Mitov M, Schnell D, Dhar SK, Cai J, Klein JB, Sultana R, Butterfield DA, et al. 2014. Redox proteomic identification of HNE-bound mitochondrial proteins in cardiac tissues reveals a systemic effect on energy metabolism after doxorubicin treatment. *Free Radic Biol Med.* 72:55–65.

Zhong H, Lu J, Xia L, Zhu M, Yin H. 2014. Formation of electrophilic oxidation products from mitochondrial cardiolipin in vitro and in vivo in the context of apoptosis and atherosclerosis. *Redox Biol.* 2:878–883.

Zhong H, Yin H. 2015. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol.* 4:193–199.