



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Pamela Nayara Modesto

Influência do extrato do chá verde (*Camellia sinensis*) no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos a doxorubicina.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa.Dra. Paula S. Azevedo Gaiolla
Coorientadora: Profa.Dra. Bertha Furlan Polegato

**Botucatu
2019**

Pamela Nayara Modesto

Influência do extrato do chá verde (*Camellia sinensis*) no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos a doxorrubicina.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor(a) em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Paula S. Azevedo Gaiolla
Co-orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Modesto, Pamela Nayara.

Influência do extrato do chá verde (*Camellia sinensis*)
no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos a
doxorubicina / Pamela Nayara Modesto. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de
Botucatu

Orientador: Paula S. Azevedo Gaiolla

Coorientador: Bertha Furlan Polegato

Capes: 40101100

1. Chá verde. 2. Cardiotoxicidade. 3. Doxorubicina. 4.
Estresse oxidativo. 5. Metabolismo energético.

Palavras-chave: Cardiotoxicidade; Chá verde;
Doxorubicina; Estresse oxidativo; Metabolismo Energético.

Dedicatória

A minha mãe, a quem devo tudo o que sou. Obrigada por me mostrar o real sentido da palavra “fé” e por me ensinar com seus exemplos de humildade e amor ao próximo a ser uma pessoa melhor a cada dia. O seu amor me fortalece e me dá segurança para seguir em frente, te amo!

Ao meu pai, uma pessoa simples, mas de coração enorme, n sempre me incentivou buscar o melhor e a lutar pelos meus sonhos, obrigada por ser tão presente em minha vida, amo você!

A minha tia Elisabete, que é meu exemplo de vida, de força, esperança e fé! Obrigada por me ensinar a não desistir e estar sempre ao meu lado.

A minha irmã Natalia, minha cúmplice e companheira, que me impulsiona todos os dias com palavras de carinho e apoio. Você é essencial em minha vida!

A minha sobrinha Elisa, que é o amor da minha vida, chegou para trazer ainda mais alegria e amor a nossa família.

Ao meu pai de coração Marcello, que participou de cada momento dessa minha caminhada e não mediu esforços algum para me incentivar e me ajudar no que fosse necessário, muito obrigada por tudo!

Á toda minha família, pela presença e incentivo constante.

*Agradecimentos
especiais*

A Deus,

muita gratidão por ter colocado todos esses sonhos em meu coração e me ensinado a ter fé, me sustentando, me dando forças e sabedoria para busca-los.

À minha orientadora Paula Schmidt Azevedo Gaiolla,

o meu agradecimento especial por me aceitar como sua orientada e ao longo desses anos não me deixar desamparada em nenhum momento. Obrigada por dividir comigo seus ensinamentos, e me ajudar a evoluir a cada dia, sempre com muita paciência e amizade. Sou muito grata pelas oportunidades que você me ofereceu, a você minha gratidão!

Agradecimientos

A **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por todo suporte financeiro, para que fosse possível a realização desse trabalho.

Professora Bertha Furlan Polegato, obrigada pela co-orientação desse trabalho, por contribuir com suas experiências como excelente pesquisadora, ensinamentos e correções. Suas colaborações foram fundamentais para a evolução desse trabalho, muito obrigada!

Aos professores Sergio Paiva, Leonardo Zornoff e Marcos Ferreira Minicucci agradeço pelos valiosos ensinamentos e contribuições durante o percurso de desenvolvimento do trabalho. É imensa a admiração e respeito que tenho por vocês.

Dra Silmeia Garcia Zanati Bazan e agradeço pela colaboração em realizar o ecocardiograma dos animais e por sua paciência em dividir comigo suas orientações sobre a metodologia do exame. Além disso, agradeço também por tê-la compondo minha banca do exame geral de qualificação, oferecendo sua contribuição científica.

Priscila Portugal dos Santos, que além de colega de laboratório, foi parte indispensável para conclusão desse trabalho. Pri, obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e dedicação que tem por todos nós do grupo. Obrigada por simplesmente tudo, te admiro muito como pessoa e excelente profissional que é.

Vickeline Namba Androcioli, que me auxiliou muito com o preparo e leitura das lâminas de imunofluorescência e imunohistoquímica, obrigada pela paciência, pelo carinho e amizade.

Elenize Jamas Pereira desde o início me amparou dentro do laboratório com carinho e amizade e dedicou seu tempo, dividindo comigo toda sua experiência. Obrigada pela sua colaboração, amizade, companheirismo e paciência.

Funcionários do Departamento de Clínica Médica, Alexandre, Bruno, Elisângela, Laura, Mário e Renato, e funcionários da seção de pós-graduação e biblioteca, obrigada por estarem sempre dispostos e disponíveis, e pela contribuição de alguma forma ao longo desses anos.

Queridos amigos, agradeço a cada um de vocês, que de pertinho ou de longe, estavam torcendo por mim. Obrigada pelos momentos de descontração e boas risadas durante todos esses anos e principalmente por entenderem a minha ausência em alguns momentos importantes na vida de vocês. Vocês são muito especiais!

Epígrafe

“Se você pode sonhar, você pode realizar.”

Walt Disney

RESUMO

INTRODUÇÃO: A doxorubicina (DOX) é um medicamento muito eficaz no tratamento de vários tipos de câncer, mas seu uso em larga escala tem causado preocupação devido à cardiotoxicidade causada pela droga. Não se sabe exatamente quais mecanismos estão envolvidos, mas acredita-se nos papéis centrais da ligação da DOX com a topoisomerase 2- β (Top2- β), que é uma enzima que protege a célula da citotoxicidade e destruição; da interação DOX-ferro gerando espécies reativas de oxigênio; além de disfunção mitocondrial, seguida por muitas outras vias secundárias ativadas por essas primárias, como inflamação e fatores da matriz extracelular (MEC). Por outro lado, o chá verde, uma bebida muito popular em todo o mundo, tem efeitos antioxidantes e antitumorais.

MÉTODOS: Foram utilizados 60 ratos Wistar machos. Estes animais foram divididos grupos: C=20 (controle) que recebeu ração padrão e administração intraperitoneal de salina, CV=20 (controle + chá verde) que receberam ração adicionada de extrato de chá verde e administração intraperitoneal de solução salina, D=20 (doxorubicina) que recebeu ração padrão e administração intraperitoneal de doxorubicina e DCV=20 (doxorubicina + chá verde) que receberam ração adicionada de extrato de chá verde e administração intraperitoneal de doxorubicina. A ração foi oferecida por 35 dias e no 33º dia a infusão de doxorubicina ou soro fisiológico foi realizada na mesma proporção (20 mg / kg em dose única) e os animais foram eutanasiados 48 horas após a injeção do fármaco. Os ratos foram submetidos ao ecocardiograma para avaliação da morfologia e função cardíacas e foram realizadas análises de atividade enzimática, expressão de proteínas, relacionadas à proteção celular, estresse oxidativo, metabolismo energético, inflamação e MEC. **RESULTADOS:** O estudo ecocardiográfico mostrou que a DOX aumentou o átrio esquerdo, a espessura relativa da parede e reduziu a FC que foram atenuados pelo chá verde. No grupo D houve aumento do estresse oxidativo caracterizado pela maior formação de hidroperóxido de lipídios (HP) e redução da glutathione peroxidase (GPx), que foram atenuados no grupo DCV. Em relação ao metabolismo energético, houve

aumento de enzimas da via glicolítica anaeróbia (fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase), diminuição de enzima da oxidação de ácidos graxos (3-hidroxiacil coenzima A desidrogenase), redução da atividade de enzimas do ciclo do citrato (citrato sintase), complexos mitocondriais (complexo I e II) e ATP sintase, no grupo D. O grupo DCV restabeleceu o padrão de uso da via glicolítica e oxidação de ácidos graxos. Embora a DOX tenha reduzido a fosforilação da proteína quinase B em relação a sua expressão total (p-AKT/t-AKT, o chá verde não participou dessa via. Houve diminuição da expressão da Top2- β no grupo D, sendo que o chá verde aumentou a expressão dessa enzima, tanto no grupo DCV quanto no grupo CV. A inflamação foi maior no grupo D, evidenciada por maior expressão de TNF- α , CD45 e metaloprotease 2 de atividade intermediária (MMP-2int), porém o chá verde não influenciou esses achados. Não houve alteração na expressão do colágeno I e III ou na presença de fibrose. **CONCLUSÃO:** A administração aguda de doxorrubicina causou remodelação cardíaca, sugerindo a presença de remodelamento concêntrico, disfunção diastólica e sistólica, atenuados pelo chá verde. Observou-se diminuição do Top2- β , aumento do estresse oxidativo e da inflamação e desbalanço do metabolismo energético, induzidos pela DOX. O chá verde aumentou a Top2- β , reduziu o estresse oxidativo e recuperou o metabolismo energético para valores próximos ao grupo controle. Portanto, este modelo experimental identificou potenciais mecanismos cardiotoxicidade induzida pela DOX e sugere os potenciais benefícios do chá verde, por provável ação em reduzir a citotoxicidade, a destruição celular e o estresse oxidativo, além de melhorar o metabolismo energético.

Palavras chave: Extrato de chá verde • Doxorrubicina • Cardiotoxicidade • Estresse oxidativo • Metabolismo energético

ABSTRACT

INTRODUCTION: doxorubicin (dox) is a very effective drug in the treatment of several types of cancer, but it plays an important role in cardiotoxicity. The mechanisms of DOX-induced cardiotoxicity include: binding to Top2- β , an enzyme that protects cells from cytotoxicity and destruction; interaction with iron and altering intracellular and mitochondrial antioxidants enzymes activities, followed by many other secondary pathways activated by these primary, for example inflammation, extracellular matrix (ECM) factors and others. On the other hand, green tea, a very popular beverage all over the world, has antioxidants and antitumor properties. **METHODS:** Sixty male Wistar rats were used. These animals were divided into groups: C = 20 (control) that received standard chow and intraperitoneal administration of saline, GT = 20 (control + green tea) receiving added chow of green tea extract and intraperitoneal administration of saline solution, D = 20 (doxorubicin) who received standard chow and intraperitoneal administration of doxorubicin and DGT = 20 (doxorubicin + green tea) who received added ration of green tea extract and intraperitoneal administration of doxorubicin. The feed was offered for 35 days and on the 33rd day the infusion of doxorubicin or saline was performed in the same proportion (20 mg / kg in a single dose) and the animals were euthanized 48 hours after the injection of the drug. The rats were submitted to echocardiogram to evaluate the cardiac morphology and function. Analyzes of enzymatic activity, protein expression, related to cell protection, oxidative stress, energy metabolism, inflammation and ECM were performed. **RESULTS:** DOX increased left atrium and relative wall thickness, aside of reducing heart rate, all of them were attenuated by green tea. In D group it was observed greater oxidative stress marked by lipid hydroperoxide (HP) and reduction of glutathione peroxidase (GPx), which was attenuated in the DGT group. In relation to energy metabolism, it was evidenced higher activity of anaerobic glycolytic pathway (phosphofructokinase and lactate dehydrogenase) enzymes, reduction in the activity of fatty acid oxidation (3-hydroxyacyl coenzyme a dehydrogenase),

reduction of the enzymatic activity of the citrate cycle (citrate synthase), mitochondrial complexes (complex I and II) and ATP synthase in group D. The DGT group recovery the pattern of glycolytic fatty acids oxidation pathways. Although DOX reduced the protein kinase phosphorylation with respect to the total expression (p-akt / t-akt), green tea did not influenced this. There was a decrease in the expression of Top2- β in group D, and green tea increased expression of this enzyme, both in the DGT group and in the GT group. The inflammation was higher in group D, evidenced by greater expression of TNF- α , CD45 and metalloprotease 2 of intermediate activity (MMP-2int), but green tea did not influence these findings. There was no change in the expression of collagen I and III or in the presence of fibrosis. **CONCLUSION:** the acute administration of doxorubicin caused cardiac remodeling, suggesting the presence of concentric remodeling, diastolic and systolic dysfunction, attenuated by green tea. It was observed a decrease of the Top2- β , increase of the oxidative stress and the inflammation and imbalance of the energetic metabolism, induced by DOX. Green tea increased Top2- β , reduced oxidative stress, and recovered energy metabolism to values close to the control group. Therefore, this experimental model identified potential mechanisms of DOX-induced cardiotoxicity and suggests the potential benefits of green tea for its likely action in reducing cytotoxicity, cell destruction and oxidative stress, as well as improving energy metabolism.

Key words: Green tea extract • Doxorubicin • cardiotoxicity. • oxidative stress • energy metabolism

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração da realização do procedimento, desde a aquisição dos animais, oferta de ração, aplicação da doxorubicina ou solução salina até o ecocardiograma final, eutanásia e coleta de material.....	17
Figura 2 - Imagem de laminas de imunohistoquímica de CD45.....	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Concentração de anticorpo primário para western blot.....	23
TABELA 2 – Concentração de anticorpo primário para western blot.....	24
TABELA 3 – Variáveis Ecocardiográficas de ratos após 48 horas da aplicação da doxorubicina.....	27
TABELA 4 – Enzimas do metabolismo energético após aplicação da doxorubicina.....	28
TABELA 5. Resultados das análises de AKT, AMPK α , PPAR α e Topoisomerase II β pelo método de western blotting após aplicação da doxorubicina.....	29
TABELA 6. Resultados da análise de CD45 por Imunohistoquímica.....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
1.2 HIPÓTESE.....	14
1.3 OBJETIVOS.....	15
2 METODOLOGIA.....	16
2.1 DELINEAMENTO.....	16
2.2 INDUÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE PELA DOXORRUBICINA e EUTANÁSIA.....	16
2.3 PREPARO DA RAÇÃO.....	17
2.4 AVALIAÇÃO ECOCARDIOGRÁFICA.....	17
2.5 PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS.....	18
2.6 ESTRESSE OXIDATIVO E METABOLISMO ENERGÉTICO.....	19
2.6.a ESTRESSE OXIDATIVO.....	19
2.6.b METABOLISMO ENERGÉTICO.....	20
2.7 WESTERN BLOT.....	21
2.8 DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA METALOPROTEINASE: ZIMOGRÁFIA.....	24
2.9 ESTUDO MORFOLÓGICO.....	25
2.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	25
3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
4 RESULTADOS.....	27
5 DISCUSSÃO.....	31
6 CONCLUSÃO.....	36
REFERÊNCIAS.....	37
ANEXOS.....	40
ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA FMB/UNESP.....	41
ANEXO B – AUTORIZAÇÃO APROVADA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA FMB/UNESP, PARA ALTERAÇÃO DE TÍTULO.....	42

1 INTRODUÇÃO

Utilizada desde 1960, a Doxorubicina (Dox) ou Adriamicina é um antibiótico da classe das Antraciclinas, que vem sendo descrita como potente agente quimioterápico usada no tratamento de diversos tipos de câncer, sendo a Dox uma das primeiras drogas a serem utilizadas na prática clínica (MCGOWAN, CHUNG, *et al.*, 2017).

A descoberta de atividade antineoplásica das antraciclinas levou a sua utilização em larga escala e observou-se que com o uso da droga há melhora no câncer, mas a doença cardiovascular tornou-se uma principal causa de morbidade e mortalidade entre sobrevivente (GHIGO, LI e HIRSCH, 2016)

Evidências clínicas demonstraram que o uso da Dox resulta no surgimento e desenvolvimento de cardiotoxicidade, cardiomiopatia dilatada irreversível e insuficiência cardíaca (ZENG *et al.*, 2019).

Quatro tipos de cardiotoxicidade causados pela Dox são descritos: toxicidade aguda, subaguda, crônica e tardia (GHIGO, LI e HIRSCH, 2016). Esses tipos de cardiotoxicidade são caracterizados por arritmia, dilatação ventricular, disfunção diastólica e sistólica (YU, WANG, *et al.*, 2018).

Estudos observacionais mostram que a cardiotoxicidade induzida pela Dox geralmente ocorre dentro de 2 a 3 dias após receber uma dose da droga, sendo referida como cardiotoxicidade aguda (SHABALALA, MULLER *et al.*, 2017; HYDOCK, WONDERS, *et al.*, 2009; TKEMURA, FYJIWARA, 2007).

Não se sabe ao certo quais os mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade, porém acredita-se que o estresse oxidativo, inibição da topoisomerase II β (Top 2 β), disfunção mitocondrial, danos ao DNA, alterações bioenergéticas e inflamação podem colaborar de forma significativa (RENU, ARUNACHALAM, 2018; YU, WANG, *et al.*, 2018).

O estresse oxidativo acontece quando a Dox atravessa a membrana sarcoplasmática e se acumula no citoplasma dos cardiomiócitos formando um radical semiquinona. Uma vez lá dentro as antraciclinas se interagem ao ferro,

formando um complexo ferro-antraciclina, reduzindo o oxigênio e formando superóxido (SHABALALA, MULLER, *et al.*, 2017)

O superóxido apresenta alta afinidade à cardiolipina, principal componente da membrana interna da mitocôndria, sendo necessária para que ocorra a fosforilação oxidativa. Estudos mostram, ainda que existe afinidade direta da doxorubicina pela cardiolipina. A cardiolipina é rica em fosfolípidos e, portanto, quando interage com superóxido ou Dox, é susceptível a lipoperoxidação (CAPPETTA, A., *et al.*, 2017).

A peroxidação lipídica da membrana interna da mitocôndria impede o trânsito de transportadores iônicos gerando comprometimento da transferência de energia e favorecendo maior formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Outro ponto importante é que foram observadas menores concentrações de antioxidantes na vigência da cardiotoxicidade pela Dox. Adicionalmente, a Dox pode se ligar a óxido nítrico sintase, aumentando a produção de superóxido e reduzindo a produção de óxido nítrico (LAMBERTI, GIOVANE, *et al.*, 2014)

Além do estresse oxidativo, a inflamação cardíaca também contribui para o processo de cardiotoxicidade. A Dox promove a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que são relacionadas a várias manifestações, variando de cardiotoxicidade a astenia. Ela estimula monócitos e macrófagos pela liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que ativa o receptor do TNF (TNFR). Esta ação possivelmente está relacionada alterações estruturais e cardiomiopatia dilatada (YU, WANG, *et al.*, 2018).

Estudos mostraram que dosagens de Dox consideradas clinicamente altas, podem aumentar a expressão e os níveis de genes inflamatórios interleucina (IL) - 1 β e IL-6 cuja expressão é relevante para a indução da cardiotoxicidade induzida por Dox (WONG, SMITH, *et al.*, 2013).

Outro mediador importante que vem sendo descrito na cardiotoxicidade é a Topoisomerase 2 β (Top II β). Acredita-se que ela seja mediadora chave no processo de cardiotoxicidade induzida por antraciclina (VEJPONGSA e YEH, 2014).

As topoisomerasas são proteínas que participam de processos que permitem

alterações no grau de superenrolamento do DNA, para realizar processos cruciais como transcrição e replicação (BOLLIMPELLI, S., *et al.*, 2017).

Existem 2 tipos de topoisomerase: a Top 2 α que é indetectável em cardiomiócitos de adultos e a Top 2 β é altamente abundante no miocárdio, e acredita-se que a Dox seja um potente inibidor da Top 2 β (YU, WANG, *et al.*, 2018).

Quanto ao metabolismo energético, em condições normais o coração utiliza principalmente ácidos graxos como fonte energética para a contração dos miócitos (de 50 a 70%). Porém outra fonte energética importante é o carboidrato que é oxidado e transformado em lactato, glicose e piruvato (LOPASCHUK, USSHER, *et al.*, 2010).

Várias reações enzimáticas configuram o metabolismo energético cardíaco normal.

De modo geral, dentro da mitocôndria o piruvato é oxidado em a acetil-Coenzima A (acetil Co-A), que por sua vez, a beta oxidação de ácidos graxos ou oxidação do piruvato entra no ciclo do ácido cítrico resultando na produção de adicional de NADH⁺ e FADH². Estas transportam elétrons, por meio dos complexos I ao IV, na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. A fosforilação oxidativa é o processo responsável pela produção de ATP (adenosina trifosfato), esse processo envolve a cadeia transportadora de elétrons, oxigênio, translocador de nucleotídeos da adenina, transportador de fosfato, fosfato inorgânico e ATP sintase (AZEVEDO, MINICUCCI, *et al.*, 2013).

Os receptores finais dos elétrons são moléculas de oxigênio que vão ser convertidas em H₂O. O ATP é transferido para a creatinaquinase formando fosfo-creatinoquinase (CK-PCr), o qual é o transportador de energia para as células, como por exemplo, os miócitos. Neles, a ATP é clivada em ADP + Pi pela ATPase liberando energia necessária para contração (LOPASCHUK, USSHER, *et al.*, 2010).

Quando há disfunção cardíaca, ocorrem alterações na utilização de substratos, na geração e no transporte de energia para os tecidos (LUSTOSA, *et al.*, 2016).

A cardiotoxicidade induzida pela Dox reduz a utilização dos substratos, tanto

os ácidos graxos quanto a glicose, além de danificar a estrutura e função mitocondrial (LOPASCHUK, USSHER, *et al.*, 2010)

Durante o início do processo de remodelação cardíaca, para se proteger, o coração passa a utilizar mais glicose e menos ácidos graxos. Entretanto, estes quando não são oxidados, são estocados no coração na forma de triacilgliceróis. Este processo é denominado lipotoxicidade, fazendo parte da disfunção miocárdica, que se desenvolve com o decorrer do processo de remodelação (AZEVEDO, MINICUCCI, *et al.*, 2013)

Além da mudança na utilização dos substratos, outro ponto importante no metabolismo energético cardíaco refere-se à mitocôndria. Durante o processo de remodelação ocorre redução da função e da massa mitocondrial, que resultam em alteração no transporte de elétrons. Esse transporte inadequado favorece o desemparelhamento de elétrons, com consequente formação de EROS, levando a uma menor geração de energia para a contração dos miócitos (RIMBAUD, RUIZ, *et al.*, 2011).

O impacto da Dox no metabolismo global do coração vem sendo demonstrado não só por diminuir a produção de ATP mitocondrial em geral, mas conduzir a uma diminuição de isoenzimas de CK, incluindo isoenzimas mitocondrial (MtCK) e proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). Além disso, a sinalização da AMPK diminuída reduz a capacidade da célula para iniciar um aumento compensatório na taxa glicolítica e para estimular a captação de glicose (CARVALHO, BURGEIRO, *et al.*, 2013).

Tanto a utilização de glicose, como a β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa são prejudicados na cardiomiopatia induzida pela Dox, que levado ao extremo pode implicar um quebra geral do metabolismo energético. Curiosamente, uma ligação entre o estresse oxidativo geral e respostas metabólicas já foi proposta. Depois de uma hora de tratamento com Dox, a peroxidação lipídica aumentou e causou uma resposta adaptativa resultando num aumento da absorção de glicose, que se manifesta por um aumento da proteína GLUT1, presumivelmente para restaurar a energia celular, estabelecendo uma relação entre a Dox, peroxidação lipídica e alterações agudas no transporte de glicose

(CARVALHO, BURGEIRO, *et al.*, 2013).

Um aumento da produção de lactato, que é subproduto da glicólise é um sinal de provável redução da função mitocondrial. Através da análise de ressonância magnética nuclear de metabólitos intracelulares, os níveis de acetato foram propostos como novos biomarcadores para cardiotoxicidade e estavam aumentados nos animais tratados com Dox em comparação com os controles, o que correlaciona a conversão não enzimática de piruvato para acetato. Os níveis de aminoácidos ramificados (AACR) valina, leucina, isoleucina também estão diminuídas no coração desses animais, mostrando que os ácidos graxos de cadeia longa e a β -oxidação são inibidas e ciclo de Krebs é prejudicado (CARVALHO, BURGEIRO, *et al.*, 2013).

Os benefícios de se utilizar doxorrubicina como quimioterápico é indiscutível e aparentemente os mecanismos de ação antitumoral e cardiotoxico são diferentes. Porém, o aparecimento de insuficiência cardíaca pode comprometer o tratamento da neoplasia. Este fato pode ser evidenciado pela alta mortalidade atribuída à combinação entre doença cardiovascular e câncer querepresenta 68% de toda a taxa global de mortalidade (SHABALALA, MULLER, *et al.*, 2017)

Portanto o estudo de compostos que possam atenuar a cardiotoxicidade da Dox faz-se necessário para otimização do tratamento de alguns pacientes com neoplasias

Dentre os diferentes alimentos que possuem função antioxidante, encontram-se os chás. Originário da China, o chá verde é cultivado e consumido pelas suas características de aroma, sabor e propriedades medicinais em mais de 160 países, especialmente asiáticos (XU, JI, *et al.*, 2018).

O chá verde (*Camellia Sinensis*), após a água, é a bebida mais consumida no mundo. Entre os vários benefícios relacionados à saúde estão a prevenção de doenças cardiovascular, câncer e diabetes (OLIVEIRA, 2012).

Conhecido também por suas atividades antiinflamatória, antiproliferativa, antiaterosclerótica, o chá verde é rico em polifenóis, que são poderosos antioxidantes e agentes quimiopreventivos desempenhando um papel em neutralizar os radicais livres, reduzindo a inflamação e diminuindo a velocidade

crescimento do tumor, o que levou a inclusão do chá verde em suplementos dietéticos, nutracêuticos e alimentos funcionais (ENG, THANIKACHALAM e RAMAMURTHY, 2018).

A maioria dos benefícios do chá verde podem ser atribuídos ao flavonóides polifenólicos, conhecidos como as catequinas (GUO et al, 2017) que são compostos incolores, hidrossolúveis, que contribuem para o amargor e a adstringência do chá verde (XU, JI, *et al.*, 2018).

Atualmente as catequinas consideradas mais importantes são: catequina (C), epicatequina (EC), epigallocatequina-epicatequina (ECG), epigallocatequina (EGC), e epigallocatequina galato (EGCG); sendo este último o mais ativo no chá verde (OLIVEIRA, 2012).

O teor de catequinas no vegetal depende de alguns fatores externos, tais como forma do processamento das folhas antes da secagem, localização geográfica do plantio e condições de cultivo (XU, JI, *et al.*, 2018). Os efeitos potenciais das catequinas sobre a saúde não dependem somente da quantidade consumida, mas também sobre sua biodisponibilidade, que parece ser muito variável (CABRERA, ARTACHO e GIMÉNEZ, 2006).

O metabolismo de polifenóis ocorre através de uma via comum. Durante o processo de absorção, os polifenóis são conjugados no intestino delgado e no fígado. Este processo inclui metilação, sulfatação e glucuronidação. Os polifenóis circulantes também são conjugados, são amplamente ligados à albumina. Os polifenóis são capazes de penetrar nos tecidos, particularmente naqueles em que são metabolizados, mas a sua capacidade de acumular nos tecidos-alvo específicos precisa ser mais investigada (MANACH, SCALBERT, *et al.*, 2004).

O impacto favorável do chá verde nas doenças cardiovasculares parece estar relacionado à ação das catequinas sobre o sistema vascular. As propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, antitrombóticas, antiproliferativas e redutoras de LDL conferidas ao chá verde, atenuam a aterosclerose e melhoram a função endotelial (JOCHMANN, BAUMANN e STANGL, 2008).

Apesar dos estudos apontarem para os potenciais efeitos benéficos do chá verde no sistema vascular, pouco se sabe sobre as ações deste composto

diretamente sobre o miocárdio (JOCHMANN, BAUMANN e STANGL, 2008).

Dentre os poucos estudos que avaliaram o papel do chá verde no miocárdio podemos destacar modelos de isquemia-reperfusão, miocardite e insuficiência renal crônica. Nestes modelos observou-se que o chá verde melhorou o inotropismo, diminuiu a inflamação e reduziu hipertrofia cardíaca (HSIEH, TSAI e CHEN, 2009).

Com relação a estudo com chá verde, as catequinas demonstraram efeitos positivos na funcionalidade da mitocôndria e conseqüentemente melhorou o metabolismo energético cardíaco. E estudos com ratos com cardiotoxicidade induzida pelo uso de Isoproterenol, mostrou que as catequinas tiveram efeito preventivo sobre o dano mitocondrial, através da diminuição da peroxidação lipídica e do seu efeito antioxidante. Além disso, o pré tratamento com as catequinas manteve a função mitocondrial normal, neutralizou o aumento dos níveis de Ca^{2+} e manteve a atividade da ATPase e a concentração de ATP (HERNÁNDEZ, GIAMPIERI, *et al.*, 2014).

Dessa forma, é possível observar que muitas das alterações que ocorrem no metabolismo energético cardíaco durante o processo de remodelação, são potenciais sítios de ação das catequinas do extrato de chá verde.

1.2 HIPOTESE

Com base nos dados apresentados, a hipótese do nosso trabalho é que cardiotoxicidade causada pela doxorrubicina, pode ocorrer devido a estresse oxidativo, alterações do metabolismo energético, dano mitocondrial, inflamação e alterações na matriz extracelular, resultando no processo de remodelação cardíaca. Considerando que o chá verde possui propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e bioenergéticas, é possível que o mesmo atenuar os efeitos cardiotoxicos da Dox, retardando o processo de remodelação cardíaca.

1.3 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar se o extrato de chá verde:
 - pode melhorar a atividade enzimática;
 - melhora a expressão de proteínas que regulam o metabolismo energético;
 - é capaz de reduzir a inflamação causada pela doxorrubicina;
 - atua sobre as alterações da matriz extracelular;
 - é capaz de atenuar a remodelação cardíaca.

2 METODOLOGIA

2.1 Delineamento

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Botucatu.

Os animais foram divididos em 4 grupos de 15 animais cada, porém cada animal permaneceu em gaiolas individuais durante o experimento.

- ❖ Grupo C – composto por 15 animais que foram alimentados com ração padrão por 35 dias e estudados após 48 horas após administração de solução salina intraperitoneal.
- ❖ Grupo DX – composto por 15 animais que foram alimentados com ração padrão por 35 dias e estudados após 48 horas após administração Doxorrubicina intraperitoneal.
- ❖ Grupo CCV – composto por 15 animais que foram alimentados com ração adicionada de extrato de chá verde por 35 dias e estudados após 48 horas após administração de solução salina intraperitoneal.
- ❖ Grupo DCV – composto por 15 animais que foram alimentados com ração adicionada de extrato de chá verde por 35 dias e estudados após 48 horas após administração Doxorrubicina intraperitoneal.

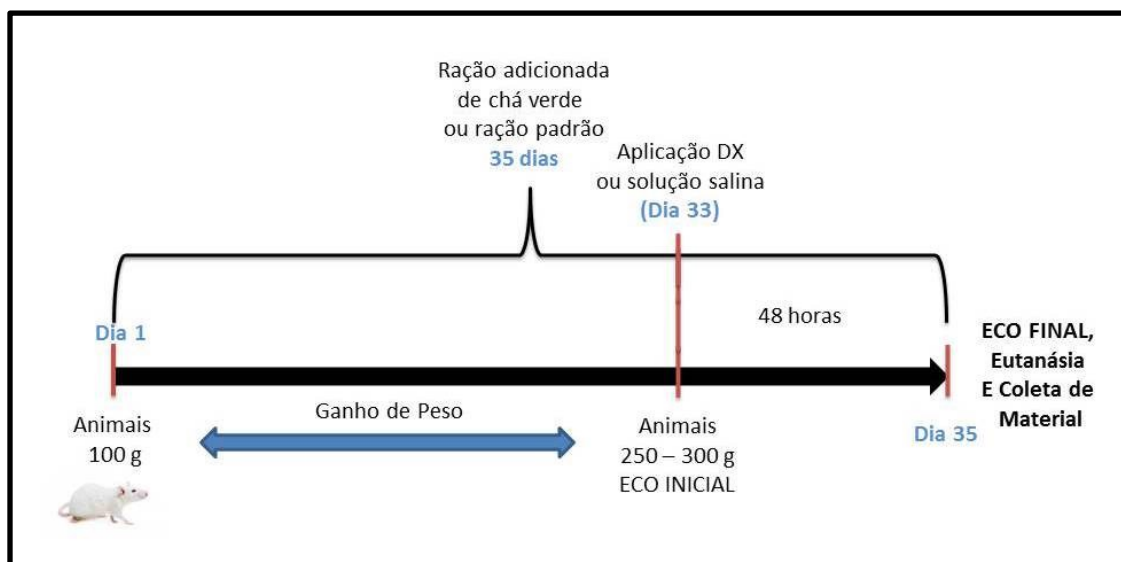
2.2 Preparo da ração com extrato de chá verde

Utilizamos o extrato de chá verde em pó Polyphenon 60 (Sigma-Aldrich Canadá, Oakville, ON, Canadá) composto por 65,4% de catequinas, das quais 29,2% correspondem a galato de epigallocatequina, 21% epigallocatequina, 7,9% galato de epicatequina e 7,3% epicatequina. A concentração utilizada foi 0,25%, isto é, 2,5 g de extrato de chá verde por kg de ração. Considerando consumo de ração do rato Wistar, em torno de 30g/dia, cada animal ingeriu o equivalente a seis a sete copos de chá verde/dia para um humano de 60 kg (AKHLAGHI e BANDY, 2010).

2.3 Indução da cardiotoxicidade pela doxorubicina e eutanásia.

A cardiotoxicidade foi induzida por meio de injeção intraperitoneal de uma dose única de 20mg/kg de doxorubicina, que aconteceu no 33º dia de experimento (REAGAN-SHAW, NIHAL e AHMAD, 2008) e os animais foram estudados após 48 horas após a injeção da droga ou de salina, a qual foi administrada na mesma proporção da doxorubicina. Os animais foram submetidos à eutanásia após as 48 horas com tratamento com injeção intra-peritoneal de tiopental sódico (50 mg/kg) de acordo com as diretrizes estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal e em conformidade com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Figura 1. Ilustração de como foi realizado todo procedimento, desde a aquisição dos animais, oferta de ração, aplicação da doxorubicina ou solução salina até o ecocardiograma final, eutanásia e coleta de material.



2.4 Avaliação Ecocardiográfica

Todos os animais foram submetidos a estudo ecocardiográfico imediatamente antes da injeção intraperitoneal da doxorubicina ou solução salina, para avaliar a homogeneidade entre os grupos estudados e também 48 horas após a injeção da doxorubicina ou salina. Para isso, receberam anestesia intramuscular com ketamina (50mg/kg) e xylasina (1 mg/kg), foi feita uma tricotomia e o rato foi posicionado em decúbito lateral esquerdo parcial. Foi utilizado o equipamento General Electric Medical System, modelo Vivid S6 (Tirat Carmel, Israel), equipado com transdutor eletrônico multifrequencial de 5,0-11,5 MHz. Todas as variáveis foram obtidas a partir dos cortes paraesternal eixo longo e curto e apical quatro e cinco câmaras. O exame foi realizado pelo mesmo examinador, que desconhece o grupo do animal.

Foram avaliadas as seguintes variáveis doppler cardiográficas: frequência cardíaca (FC), diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), parede posterior (PP), diâmetro do átrio esquerdo (AE).

Outras variáveis foram obtidas das formulações descritas a seguir:

- ❖ Espessura relativa da parede (ERPP) = $(2 \times \text{EPP}) / \text{DDVE}$;
- ❖ % de encurtamento (Enc) = $[(\text{DDVE} - \text{DSVE}) / \text{DDVE}] \times 100$;
- ❖ Tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido para a frequência cardíaca (FC): $(\text{TRIV} / \text{R-R}) = \text{TRIV} / \sqrt{\text{R-R}}$, sendo que $\text{R-R} = 60 / \text{FC}$;
- ❖ Índice de massa do ventrículo esquerdo $\text{IMVE} = 1,04 \times ((\text{DDVE} + \text{PP} + \text{PP}) \times (\text{DDVE} + \text{PP} + \text{PP}) \times (\text{DDVE} + \text{PP} + \text{PP}) - ((\text{DDVE}) \times (\text{DDVE}) \times (\text{DDVE})) + 0,6) / 1000$

Algumas variáveis ecocardiográficas foram normalizadas pelo peso corporal (PC).

2.5 Parâmetro Morfométrico

Após o estudo funcional, foi realizado o estudo morfométrico, segundo técnica já padronizada (DOERING, 1998; MATSUBARA, 2000). Em seguida os

corações tiveram o VE seccionado a 4 mm, a partir do ápice, em fragmento de 3 mm de espessura, que junto com a base e o ápice do VE foram congeladas a -80°C para as dosagens bioquímicas.

2.6 Estresse oxidativo e metabolismo energético

Amostras de aproximadamente 200 mg do VE foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M, pH 7,0) e centrifugado a 10.000 rpm, durante 15 minutos a -40°C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas, hidropéroxido de lipídios, atividade das enzimas antioxidantes e as do metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial foi determinada após ressuspensão do pellet com tampão fosfato de sódio 0,1M contendo 250mM de sacarose e 2mM de EDTA e, centrifugação (10000 rpm; 5 minutos), de acordo com técnica adaptada dos autores Cassina e Radi (1996). As leituras foram realizadas em leitor de microplaca (μ Quant-MQX Bio-Tech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) com controle pelo software. Todos os reagentes são procedência da Sigma (St. Louis, USA). Para determinar as proteínas totais empregou-se o método de Biureto, em que as ligações peptídicas das proteínas reagiram com íon cúprico, em meio alcalino, resultando em um complexo cor de violeta, cuja intensidade de coloração é proporcional à concentração de proteínas totais presentes na amostra (MOURA, 1982).

2.6.a Estresse Oxidativo

A atividade do hidropéroxido de lipídio (HP) foi determinado na presença de sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) e alaranjado de xilenol, ácido sulfúrico e butilato de hidroxitolueno (BHT) em mistura de metanol 90%, segundo método descrito anteriormente (JIANG, WOOLLARD e WOLFF, 1991).

A catalase (E.C. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato pH 7,0, utilizando-se 0,5ml de amostra e peróxido de hidrogênio (30%) (AEBI, 1974).

Leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplaca a 560nm.

O superóxido dismutase (SOD) foi determinada monitorando a inibição da redução do nitroblutetrazólico (NBT) através de radicais superóxidos gerados em solução contendo NADH₂ e fenazina metassulfato (EWING e JANERO, 1995).

A atividade da glutathione peroxidase (GSH-Px) foi determinada a partir da oxidação do NADPH₂ em meio a mistura reativa contendo tampão fosfato de sódio, glutathione reduzida, azida sódica, EDTA, glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada, de acordo Nakamura, Hojoda e Hayashi, 1974.

2.6.b Metabolismo Energético

A atividade da fosfofrutoquinase (PFK) foi determinada em meio contendo tampão TRISHCl (50mM; pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂, segundo método descrito anteriormente (BASS, BRDICZKA, *et al.*, 1969).

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada de acordo com Wilkinson et al (1965) com a utilização do método UV otimizado, em que foi medido o consumo de NADH₂, que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

Na presença de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4) determinou-se a atividade da piruvato desidrogenase (PIDH), em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditiotretol, MgCl₂, NBT, piruvato de sódio e fenazina metasulfato, em que mediu-se a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade da redução do NAD. A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetado, reação catalisada pela citrato sintase (CS), cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB em tampão fosfato TrisHCl 50mM, pH 8,0 (BASS, BRDICZKA, *et al.*, 1969).

A atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -OH-acil CoA-DH) foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-

CoA e NADH (BASS, BRDICZKA, *et al.*, 1969).

A atividade da NADH-desidrogenase (complexo I) foi determinada pelo método de Singer (1984) em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80mM pH 7,4, EDTA e NADH, em que se monitorou a velocidade de oxidação do NADH. A atividade enzimática da succinato desidrogenase (complexo II) foi medida pelo método descrito por Fischer et al (1985) em meio a tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e DPIP, o qual teve absorbância a 600nm diminuída. A atividade da ATP sintetase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM; pH 8,0), na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase, segundo método (DESAI, WEINDRUCH, *et al.*, 1996).

2.7 Western Blot

A expressão das proteínas TNF α , Colágeno I e III, AKT total (AKT-t) e AKT fosforilada (AKT-f) AMPK α , PPAR α e a Top2- β foram realizada pela técnica western blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Inicialmente, fragmentos amostrais (80-100 mg) foram homogeneizados com 800 mL de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1% (v/v), deoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). A seguir, o homogenato foi centrifugado por 20 minutos, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando a curva de BSA Protein Standard como padrão. Foi feito a eletroforese em gel após a quantificação da concentração proteica. As amostras

cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4° C com 50 μ g de proteína total. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução, determinada de acordo com o peso molecular da proteína analisada: TNF α e o Colágeno I e III o gel utilizado foi de 12%, já para AKT total (AKT-t) e AKT fosforilada (AKT-f) AMPK α , PPAR α o gel utilizado foi de 10% e a Top2- β o gel foi de 8%. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2,5 horas a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal de acordo com as instruções do fabricante, mantendo em agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0 e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 1,5 horas em agitação constante, na tabela 1 e na tabela 2 é possível encontrar as concentrações utilizadas de anticorpo primário e secundário respectivamente. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0. Por fim, a

imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram analisadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA) nos tempos padronizados para cada proteína estudada. Após essa etapa, foram realizados procedimentos para a determinação do GAPDH. As mesmas membranas foram lavadas em solução Stripping por 15 minutos em agitação constante, e então, reiniciado o processo de bloqueio, incubação dos anticorpos para o GAPDH e imunodeteção da mesma forma descrita anteriormente. Uma vez com os dados gerados pelo analisador de imagens, a quantificação foi feita da seguinte maneira: 1) as proteínas de interesse foram normalizadas pela amostra de um animal e repetido em todos os géis; 2) o GAPDH, da mesma forma, foi normalizado pelo animal repetido em todos os géis; 3) as proteínas (já normalizadas) foram então normalizadas pelo GAPDH (já normalizado), para ser obtido o resultado da expressão por Western Blot.

TABELA 1. Diluição do anticorpo primário para realização da técnica de western blot

Anticorpo	Diluição
TNF- α	1/1000
Colágeno I	1/100
Colágeno III	1/100
AMPK α	1/1000
PPAR α	1/100
AKT total	1/2000
AKT fosforilada	1/1000
Top2- β	1/10000
GAPDH	1/10000

TABELA 2. Diluição do anticorpo secundário para realização da técnica de western blot

Proteína	Anticorpo	Diluição
TNF- α	Antirabbit	1/5000
Colágeno I	Antirabbit	1/2000
Colágeno III	Goat Antimouse	1/1000
AMPK α	Antirabbit	1/5000
PPAR α	Antimouse	1/10000
AKT total	Antirabbit	1/5000
AKT fosforilada	Antirabbit	1/5000
Top2- β	Antirabbit	1/5000
GAPDH	Antimouse	1/10000

2.8 Determinação da atividade da metaloproteinase cardíaca: zimografia

Aproximadamente 30 mg de tecido congelado foram utilizados para extração de proteína em tampão de extração contendo: 50 mM Tris, pH 7,4; 0,2 M NaCl; 0,1% Triton X and 10 mM CaCl₂. Para cada 30 mg de tecido foram adicionados 1,5 ml deste tampão. As amostras foram trituradas utilizando o aparelho Ultra Turrax, 21.000 rpm e centrifugadas a 12.000 rpm, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a proteína quantificada, utilizando método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml. As amostras foram diluídas em tampão da amostra contendo 0,5 M Tris, pH 6,8; glicerol 100%, e 0,05% de azul de bromofenol. O gel de separação utilizado foi de poliacrilamida a 12% e 1% de gelatina e a corrida foi realizada com aparato Bio-Rad mini-protean, a 80 V por 2 horas, contendo tampão Tris-Glicina-SDS, pH 8,3. Após a corrida o gel foi lavado 2 vezes, por 30 minutos cada vez, em 2,5% Triton X-100 e após, em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4. Em seguida, o gel foi incubado por 16 horas em tampão tris-HCl 50 mM pH 8,4 com 500 mM de CaCl₂, em agitação contínua e à temperatura

de 37°C. Após a incubação o gel foi corado com coumassie blue 2,5% por 1 hora e descorado com solução de 30% metanol e 10% ácido acético (29). Os géis foram fotografados no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA), e o programa utilizado para avaliar a densidade foi o Gelpro, que mede a área de digestão da gelatina em unidade de imagem denominada pixel. Os resultados foram normalizados pelo animal controle que foi repetidos em todos os géis.

2.9 Estudo Morfológico

Os corações foram retirados, dissecados e os ventrículos direito (VD) e o esquerdo (VE), incluindo o septo interventricular. Em seguida os corações tiveram o VE seccionado a 4 mm, a partir do ápice, em fragmento de 3 mm de espessura, que foi fixado em solução de formol tamponado a 4% por período de 48 horas, segundo relato prévio. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes coronais para posterior análise histológica.

2.10 Imunofluorescencia e imunohistoquímica

Para avaliação do colágeno no miocárdio, lâminas com cortes histológicos coronais de 6 micra foram corados pela técnica de Picro Sirius red, foi feita avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo. Foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo, excluindo-se o colágeno perivascular.

Já para a realização da reação de imunohistoquímica para detecção da Cd45, foram utilizados os fragmentos de coração que foram fixados em formalina 10% tamponada por 48 horas, que posteriormente foram lavados em água, conservados em álcool 70% e os tecidos parafinizados. A seguir foram cortados na espessura de três micra e colocados sobre lâminas tratadas com Poli d-lisina (Sigma Chemical CO, St Louis, USA). Foi realizada a recuperação antigênica em “panela de pressão” por 30 minutos usando tampão citrato no pH 6,0. Após, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena usando bloqueador de peroxidase comercial e o

bloqueio de proteína foi feito utilizando BSA a 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente. A aplicação do anticorpo primário para detecção de CD45, foi usada na concentração 1:400 e mantido overnight a 4°C. Foi aplicado o polímero Nishieri por 30 minutos e aplicado o DAB, conforme as recomendações do fabricante e incubado por 5 minutos. A contra-coloração foi feita com hematoxilina por 3 minutos em temperatura ambiente e lavada com água destilada e hidróxido de amônio. As lâminas foram desidratadas com uma bateria de álcool (álcool etílico 50%, álcool etílico 70% e álcool etílico 100%) e xilol, e posteriormente montadas permanentemente com meio de montagem a base de xilol. Para quantificação da CD45, foram fotografadas 6 áreas diferentes da lâmina. Então foram contados por toda extensão dos fragmentos, células com forte marcação. As áreas dos fragmentos de coração foram determinadas utilizando-se o programa de imagens KS300 (Carl Zeiss, Alemanha). Foi feito uma média de células marcadas, estimando-se a atividade da célula Cd45 por grupo.

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A avaliação dos resultados foi realizada por meio de comparações entre os grupos, utilizando o teste de análise de variância ANOVA de dois fatores independentes. O nível de significância adotado foi de 5%. Para variáveis normais, os valores obtidos foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão, e as variáveis não normais, submetidas à normalização e também apresentadas em média $\pm$ desvio padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Ecocardiograma

Foi realizado ecocardiograma inicial para mostrar a homogeneidade entre os grupos estudados e não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma variável ecocardiográfica. Após 48 da aplicação da droga, apresentaram diferenças estatísticas as seguintes variáveis: FC, AE/PC e ERP. A FC apresentou uma diminuição no grupo D, porém o grupo DCV atenuou essa diminuição. O AE/PC e a ERP tiveram um aumento no grupo D e o grupo DCV diminuiu quando comparado aos outros grupos como mostra a tabela 3.

TABELA 3: Variáveis Ecocardiográficas de ratos após 48 horas da aplicação da doxorrubicina.

VARIAVEL	C (15)	CV (15)	D (15)	DCV (15)	P INT	P CV	P D
FC (bpm)	367±9,50	335±10,5	290±9,82	305±9,82	0,02	0,39	<0,001
DDVE/PC (mm)	20,5±0,66	19,9±0,73	20,9±0,67	21,0±0,67	0,55	0,69	0,29
DSVE/PC (mm)	10,1±0,72	9,26±0,79	10,7±0,74	9,96±0,74	0,94	0,28	0,39
PP (mm)	1,39±0,04	1,36±0,05	1,50±0,05	1,32±0,05	0,14	0,03	0,52
PP/PC (mm/g)	4,39±0,17	4,15±0,19	4,76±0,17	3,97±0,17	0,12	0,006	0,58
AE/PC (mm/g)	10,1±0,45	11,1±0,48	12,3±0,45	11,3±0,48	0,004	0,93	0,01
AE/AO (mm)	1,03±0,05	1,15±0,05	1,14±0,05	01,15±05	0,26	0,22	0,27
A (cm/s)	78,0±4,63	78,4±4,88	49,0±4,63	68,4±4,88	0,05	0,03	<0,001
E (cm/s)	88,1±9,23	82,7±4,46	72,8±4,22	74,2±4,48	0,44	0,65	0,001
E/A	1,18±0,11	1,11±0,12	1,60±0,11	1,09±0,12	0,07	0,02	0,09
ERP	0,42±0,02	0,42±0,02	0,46±0,02	0,38±0,02	0,03	0,08	0,93
TRIVc (m/s)	4,08±0,06	3,99±0,06	4,11±0,06	4,08±0,06	0,60	0,30	0,35
Fração enc	0,51±0,02	0,53±0,03	0,49±0,02	0,53±0,02	0,72	0,24	0,74

Grupos: C (controle); CV (chá verde); D (doxorrubicina); DCV (doxorrubicina + chá verde). FC: frequência cardíaca, DDVE/PC: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal, DSVE/PC: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal, PP: parede posterior, PP/PC: parede posterior corrigida pelo peso corporal, AE/PC: átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal, A: onda A, E: onda E, E/A: relação onda E onda A, ERP: espessura relativa da parede, TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico, Fração enc: fração de encurtamento. Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Valor de P: ANOVA de dois fatores. PINT: valor de interação; PCV: valor p do chá verde; PD: valor de p da doxorrubicina. Quando observamos interação entre os fatores (PINT <0,05). FC: C ≠ CV; C ≠ D; DCV ≠ D. BW / c: D ≠ DGT. AE/PC: D ≠ C; DCV ≠ D. ERP: D ≠ DCV.

4.2 Metabolismo energético

Todas as enzimas para metabolismo energético apresentaram diferença estatística, exceto o piruvato desidrogenase. A fosfofrutoquinase e o lactato desidrogenase apresentaram um aumento no grupo D, que foi atenuado pelo grupo DCV. Em relação ao citrato sintase, a beta hidroxiaçil coenzima A ocorreu o oposto, uma redução no grupo D e um aumento no grupo DCV. Quanto às enzimas do complexo I e II houve diferença entre os grupos que receberam Dox (D e DCV) dos grupos que não receberam (C e CV) independentes da presença do chá verde. Sobre o ATP sintase, houve uma diminuição no grupo D, que foi atenuada pelo DCV, como mostra a tabela 4.

TABELA 4. Enzimas do metabolismo energético após aplicação da doxorrubicina.

ENZIMAS (mmol/g)	CP (8)	CCV (8)	DX (6)	DCV (6)	P INT	P CCV	P DOX
Fosfofrutoquinase	0,90±0,28	1,28±0,34	1,86±0,31	1,16±0,41	<0,001	0,23	0,003
Lactato desidrogenase	3,51±0,25	3,50±0,15	7,69±1,41	5,05±0,51	<0,001	<0,001	<0,001
Piruvato desidrogenase	1,03±0,21	0,97±0,10	1,03±0,14	0,88±0,13	0,46	0,10	0,42
Citrato Sintase	48,22±8,58	45,52±5,05	29,05±5,68	35,48±6,22	0,08	0,46	<0,001
Beta hidroxiaçil CoA	20,91±2,10	19,79±2,74	10,60±1,56	18,89±2,24	<0,001	<0,001	<0,001
Complexo I	44,38±5,97	45,9±5,20	34,2±4,42	30,20±6,14	0,19	0,55	<0,001
Complexo II	9,16±1,97	8,53±1,75	4,80±1,23	5,57±0,88	0,26	0,91	<0,001
ATP sintase	25,39±3,00	21,86±2,89	16,55±2,02	18,83±5,15	0,03	0,63	<0,001

Grupos: C (controle); CV (chá verde); D (doxorrubicina); DCV (doxorrubicina + chá verde). Os valores são expressos em média ± desvio padrão. Valor de P: ANOVA de dois fatores. PINT: valor de interação; PCV: valor p do chá verde; PD: valor de p da doxorrubicina. Fosfofrutoquinase: C≠D; C≠CV; D≠DCV. Lactato desidrogenase: C≠D; C≠CV; D≠DCV. Piruvato desidrogenase: não houve diferença estatística. Citrato sintase: os grupos que receberam D≠ dos grupos que não receberam. Beta hidroxiaçil coenzima A: C≠D; C≠CV; D≠DCV. Complexo I: animais que receberam D≠ dos animais que não receberam. Complexo II: animais que receberam D≠ dos animais que não receberam. ATP sintase: C≠D; C≠CV.

4.3 Western Blotting

É possível observar que houve um aumento nos níveis de AMPK α no grupo DX, que foi atenuado no grupo DCV. Em relação a AKT e a Topoisomerase II β , os grupos que receberam a droga tiveram um aumento em seus níveis, quando comparado aos grupos que não receberam. Houve também uma redução do PPAR α no grupo DX, quando comparado ao grupo CCV, porém o grupo DCV não foi capaz de manter seus níveis elevados. Todos os resultados foram ajustados para a quantidade total de proteína de cada amostra e normalizados pelo GAPDH. A tabela 5 mostra os resultados da quantificação pelo método do Western Blotting.

TABELA 5. Resultados das análises de AKT, AMPK α , PPAR α e Topoisomerase II β pelo método de western blotting após aplicação da doxorrubicina.

VARIAVEL	C (5)	CV (5)	D (5)	DCV (5)	P INT	CV INT	D INT
AKT	0,14 $\pm$ 0,05	0,16 $\pm$ 0,09	2,17 $\pm$ 1,87 ^c	0,63 $\pm$ 0,45 ^d	0,13	0,13	0,007
AMPK α	0,67 $\pm$ 0,23	1,29 $\pm$ 1,09	1,89 $\pm$ 1,90	1,06 $\pm$ 1,03	0,04	0,26	0,48
PPAR α	0,51 $\pm$ 0,40	1,43 $\pm$ 0,50 ^b	0,46 $\pm$ 0,20	0,35 $\pm$ 0,29	0,001	0,01	0,004
TOPO II β	0,12 $\pm$ 0,10	0,39 $\pm$ 0,62	0,52 $\pm$ 0,49 ^c	0,66 $\pm$ 0,39 ^d	0,75	0,32	0,11

Grupos: C (controle); CV (chá verde); D (doxorrubicina); DCV (doxorrubicina + chá verde). Os valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão. Valor de P: ANOVA de dois fatores. PINT: valor de interação; PCV: valor p do chá verde; PD: valor de p da doxorrubicina. AKT (relação P-akt/T-akt): animais que receberam D $\neq$ dos animais que não receberam. AMPK α : C $\neq$ CV. PPAR α : CV $\neq$ DCV; CV $\neq$ D. TOPO II β (Topoisomerase II β): animais que receberam D $\neq$ dos animais que não receberam.

4.4 Imunohistoquímica para detecção da CD45.

Houve um aumento na atividade da CD45 nos grupos que receberam doxorrubicina, independente da presença do chá verde, como mostra a tabela 6.

TABELA 6. Resultados da análise de CD45 por Imunohistoquímica.

VARIAVEL	C	CV	D	DCV	P	CV	D
	(5)	(5)	(6)	(6)	INT	INT	INT
CD45	5,66±2,71	2,03±0,78	^c 9,75±6,78	^d 11,8±8,09	0,021	0,15	0,002

CD45: ^{cd}animais que receberam DX≠ dos animais que não receberam.

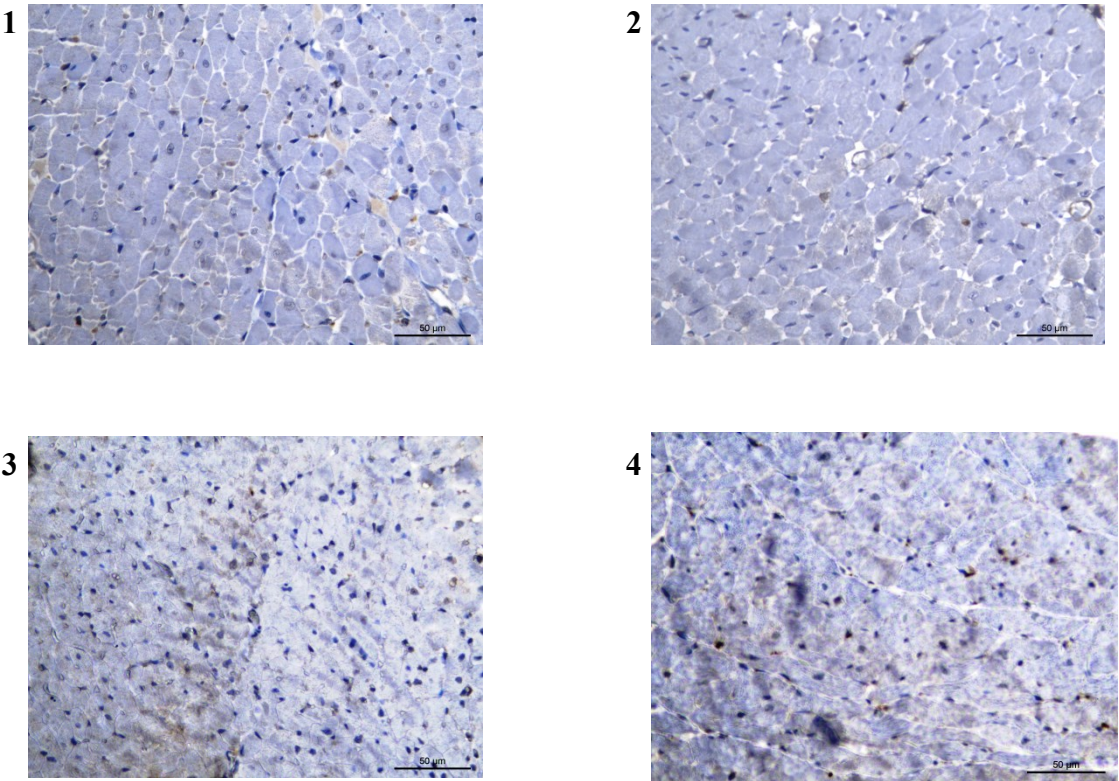


Figura 2. Lâminas de Imunohistoquímica para detecção da atividade da CD45 em miocárdio de ratos tratados com doxorubicina. Imagem 1: C, imagem 2 CV, imagem 3: D e imagem 4 DCV.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que, em um modelo experimental de lesão aguda induzida por altas doses de DOX, os ratos apresentaram remodelação cardíaca atenuada pelo chá verde. Dentre os mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade induzida pela DOX, foi observada participação do estresse oxidativo levando à peroxidação lipídica e menor atividade das enzimas antioxidantes, associadas à maior inflamação, e anormalidades no metabolismo energético. Todos eles foram, pelo menos em parte, atenuados pelo chá verde.

Existem diferentes modelos experimentais para estudar a cardiotoxicidade induzida pela DOX. Escolhemos um padrão de lesão aguda como descrito anteriormente (POLEGATO, MINICUCCI, *et al.*, 2015). De fato, após algumas horas de infusão de DOX, foi descrita a presença de inflamação e dano miocárdico (LAMBERTI, GIOVANE, *et al.*, 2014).

No presente estudo, após 48h de infusão de DOX, os principais achados foram o aumento da ERP sem aumento da massa ventricular, significando remodelamento concêntrico e aumento do AE, o que pode representar disfunção diastólica. Também observamos menor FC no grupo DOX. Apesar de a disfunção sistólica ter sido considerada uma característica da cardiotoxicidade induzida pela DOX, o encurtamento fracional não foi afetado. No entanto, no modelo de ratos, menor frequência cardíaca pode representar disfunção sistólica (POTOCNIK *et al.*, 2017). O extrato de chá verde reduziu o AE, a ERP e a FC elevada, assim a intervenção atenuou as alterações morfológicas e melhorou a disfunção diastólica e sistólica.

Uma vez que as catequinas do chá verde podem prevenir experimentalmente a cardiotoxicidade induzida pela DOX sem reduzir a eficácia das propriedades anti-cancerígenas, esta tem sido considerada como terapia adjuvante adequada. No entanto, há necessidade de estudos adicionais sobre mecanismos e recrutamento adicional de pacientes para estudos clínicos (CAPPETTA, A., *et al.*, 2017).

Considerando que o DOX opera em diferentes mecanismos, os mais

citados são: ligação ao Top2- β , interação com ferro e alteração das atividades das enzimas antioxidantes intracelulares e mitocondriais, seguida por muitas outras vias secundárias, como inflamação, fatores de MEC e outras.

Top2- β é uma proteína que ajuda o DNA a corrigir problemas topológicos e protege as células contra a destruição. A DOX interage com o DNA e a topoisomerase, aumentando a ruptura da cadeia dupla, levando ao efeito citotóxico (MITRI e EDWARDS, 2015). No presente estudo, a expressão do Top2- β nuclear aumentou nos dois grupos tratados com extrato de chá verde. A expressão de Top2- β não foi reduzida em ratos tratados com DOX quando comparados com o controle. No entanto, em situações de agressão, o Top2- β deve ser aumentado, para proteger a célula da citotoxicidade (MITRI e EDWARDS, 2015). Portanto, a similaridade de DOX e controle pode sugerir má resposta à lesão.

Além disso, fica claro que o chá verde, na verdade, aumentou o Top2- β e, portanto, é um provável local de proteção, por reduzir a destruição celular através da citotoxicidade (MITRI e EDWARDS, 2015).

O estresse oxidativo também altera o coração lesionado pela DOX. De fato, o presente estudo evidenciou níveis mais elevados de hidróperóxido de lipídeos (LH), um produto da lipoperoxidação e baixos níveis de enzimas antioxidantes. Observou-se também o papel do chá verde na redução do LH, principalmente pelo aumento da atividade da GPx. DOX é um substrato para oxirredutases, resultando em um radical semiquinona, que se liga ao ferro, resultando em um complexo ferro-antraciclina. O complexo ferro-antraciclina reduz o oxigênio formando superóxido. O superóxido, por outro lado, possui alta afinidade com a cardiolipina, principal componente da membrana interna da mitocôndria e necessária para a fosforilação oxidativa. A cardiolipina é rica em fosfolipídios e, portanto, ao interagir com superóxido ou doxorubicina, é suscetível à lipoperoxidação. A peroxidação lipídica da membrana interna da mitocôndria impede o trânsito de transportadores iônicos causando danos à transferência de energia favorecendo a formação de EROs. De fato, menores concentrações de antioxidantes foram observadas durante a cardiotoxicidade pela doxorubicina (LAMBERTI, GIOVANE, *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo tem relação direta com as atividades mitocondriais, uma vez que a mitocôndria é uma das principais fontes de ROS. Por outro lado, a DOX se acumula no núcleo da mitocôndria e pode expor o DNA mitocondrial a mais ataques de EROs. (MITRI e EDWARDS, 2015).

Finalmente, o desequilíbrio significativo da cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa resultam em baixa geração de energia. Em condições normais, os ácidos graxos são os principais substratos usados pelas mitocôndrias para fornecer energia ao coração.

De 60% a 90% do ATP do coração é gerado pela oxidação de ácidos graxos e de 10 a 40% pelo metabolismo da glicose. A coenzima A do acetil é o produto comum do metabolismo dos ácidos graxos e da glicose, que entra no ciclo do citrato que gera portadores do elétron à cadeia de transporte do elétron através do complexo I a V na membrana interna mitocondrial. No complexo V, adenosina difosfato liga-se ao fósforo (ADP + P) para ser transformado em adenosina trifosfato (ATP) sob a ação da ATP-sintase.

Em situações de remodelação cardíaca, ocorre um processo compensatório e a glicólise se torna a via preferencial. No entanto, na maioria das situações não é suficiente e uma diminuição na produção de ATP e disfunção contrátil pode não ser evitada (AZEVEDO, MINICUCCI, *et al.*, 2013).

No presente estudo, o metabolismo energético também esteve envolvido, evidenciado por maior atividade de fosfofrutoquinase e lactado desidrogenase, sugerindo que a via glicolítica anaeróbia é estimulada. Além disso, a menor atividade da 3-OHADH sugere um comprometimento da oxidação de ácidos graxos. A atividade do citrato sintase, a partir do ciclo do citrato, seguida do complexo I e II e da ATP-sintase são todos reduzidos no grupo D, no entanto o extrato de chá verde falhou em recuperar este desequilíbrio. Nos animais tratados com DOX, o grupo DCV apresentou via glicolítica foi menos ativada e a 3-OHADH foi maior que a do grupo D. É possível que o chá verde tenha se protegido o coração da remodelação e, portanto, não foi necessário recrutar intensamente a via glicolítica.

Considerando a expressão proteica relacionada ao metabolismo energético,

a AMPK e o PPAR aumentaram nos grupos C e CV, sem relação com a DOX. Estes dados mostraram o efeito potencial do extrato de chá verde na modulação de lipídios e metabolismo de glicose, não mostrando alterações dos grupos DOX. P-AKT / T-AKT foi menor nos dois grupos que receberam DOX, assim o chá verde não influenciou nessa proteína.

A DOX promove a liberação de citocinas inflamatórias que estão envolvidas em várias manifestações, incluindo a cardiotoxicidade. Em nosso estudo, foi possível observar a elevação da inflamação pelo aumento da expressão do CD-45 em ambos os grupos tratados com DOX. No entanto, o chá verde não teve influência nesses mediadores inflamatórios. A literatura corrobora esses dados, pois acredita-se que, devido ao estresse oxidativo causado pelo fármaco, o NF- κ B seja ativado, aumentando os mediadores inflamatórios, como MMP (YU, WANG, *et al.*, 2018). Por outro lado, a inflamação ativa enzimas como a NADPH-oxidase, que é uma fonte de EROs desencadeando um ciclo vicioso entre a inflamação e o estresse oxidativo.

Em relação à MMP, o DOX também está relacionado à degradação da MEC. A ativação da MMP-2, que é uma protease intracelular abundante no coração, pode estar relacionada à perda de proteínas sarcoméricas, ao comprometimento da homeostase do Ca^{2+} e à disfunção mitocondrial. (CHAN et al. 2018). De fato, uma dose única de DOX foi capaz de aumentar os níveis de MMP-2 em corações de ratos adultos (BAI, et al 2004).

No entanto, as MMP-2 são proteases dependentes de zinco relacionadas à defesa antioxidante. No presente estudo houve um aumento nas EROs nos animais que receberam DOX, sugerindo que a defesa antioxidante foi diminuída e consequentemente aumentando a atividade da MMP-2 nesses grupos. Quando o chá verde foi oferecido, houve uma tendência a atenuar a elevação da relação MMP ativo / inativo, causada pela DOX.

Em resumo, a administração aguda de doxorrubicina causou remodelação cardíaca, sugerindo a presença de remodelamento concêntrico, disfunção diastólica e sistólica. No presente estudo, os mecanismos evidenciados na cardiotoxicidade induzida pela DOX foram diminuição do Top2- β , aumento do

estresse oxidativo e inflamação e desbalanço do metabolismo energético. Animais previamente alimentados com ração enriquecida com extrato de chá verde e tratados com DOX (grupo DCV) apresentaram melhores parâmetros de remodelação e função cardíaca, quando comparados ao grupo D. Em relação aos mecanismos, Top2- β aumentou nos dois grupos alimentados com o extrato de chá verde. Além disso, DCV apresentou menor estresse oxidativo e recuperação do metabolismo energético próximo ao grupo controle. Portanto, este modelo experimental colaborou com os mecanismos de compreensão da cardiotoxicidade induzida pela DOX e sugere os potenciais benefícios do chá verde, reduzindo a citotoxicidade, o estresse oxidativo e melhorando o metabolismo energético.

6. CONCLUSÃO

Neste modelo foi possível evidenciar mecanismos importantes envolvidos na cardiotoxicidade induzido pela doxorubicina. O extrato de chá verde mostrou-se eficaz por sua provável ação na redução da citotoxicidade, inibindo da destruição celular, redução do estresse oxidativo e melhora do metabolismo energético, contribuindo para atenuação dos mecanismos de remodelação cardíaca.

REFERENCIAS

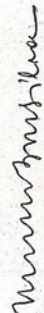
1. AKHLAGHI, M.; BANDY, B. Dietary green tea extract increases phase 2 enzyme activities in protecting against myocardial ischemia-reperfusion. **Nutrition Research**, v. 30, p. 32-39, January 2010.
2. AZEVEDO, P. S. et al. Energy Metabolism in Cardiac Remodeling and Heart Failure. **Cardiology in Review**, v. 21, p. 135-140, May/June 2013.
3. BASS, A. et al. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. **European J. Biochem.**, March/May 1969. 198-206.
4. BOLLIMPELLI, V. S. et al. Topoisomerase IIb and its role in different biological contexts.. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 633, p. 78-84, 2017.
5. CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. 1. Beneficial Effects of Green Tea: A Review. **J. of the Amer, Coll. of Nutrit**, v. 25, n. 2, p. 79–99, April 2006.
6. CAPPETTA, D. et al. Oxidative Stress and Cellular Response to Doxorubicin: A Common Factor in the Complex Milieu of Anthracycline Cardiotoxicity. **Oxid Med Cell Longev.**, p. 13, October 2017.
7. CARVALHO, F. S. et al. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. **Medicinal Research Reviews**, n. 34, p. 106-135, Jan. 2013.
8. DESAI, V. G. et al. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. **Arch Biochem Biophys**, v. 333, p. 145-151, September 1996.
9. ENG, Q. I.; THANIKACHALAM, P. V.; RAMAMURTHY, S. 1. Molecular understanding of Epigallocatechin gallate (EGCG) in cardiovascular and metabolic diseases.. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 296–310, August 2018.
10. EWING, J. F.; JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator., v. 232, p. 243-248. , December 1995.
11. GHIGO, A.; LI, M.; HIRSCH, E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1916–1925, July 2016.
12. GUO, Y. et al. Green tea and the risk of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis.. **Medicine (Baltimore)**, v. 13, p. 96, Mar 2017.
13. HERNÁNDEZ, T. Y. et al. The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: A focus on apoptotic mechanisms.. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 68, p. 154–182, Jun 2014.
14. HSIEH, S.; TSAI, D.; CHEN, J. Green tea extract protects rats against myocardial infarction associated with left anterior descending coronary artery ligation. *Eur J Physiol.* **Eur J Physiol**, v. 458, p. 631-642, April 2009.
15. HYDOCK, D. S. et al. 1. H Voluntary wheel running in rats receiving

- doxorubicin: effects on running activity and cardiac myosin heavychain.. **Anticancer research**, p. 429:440, November 2009.
16. JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidative of Fe³ in the presence of xylenol orange Lipids.. **Elsevier**, v. 26, p. 853-856, October 1991.
 17. JOCHMANN, N.; BAUMANN, G.; STANGL, V. Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.**, v. 11, p. 758–765, November 2008.
 18. KURIYAMA, S. The Relation between Green Tea Consumption and Cardiovascular Disease as Evidenced by Epidemiological Studies. **American Society Nutrition.** , v. 138, p. 1548 - 1553, August 2008.
 19. LAMBERTI, M. et al. Animal models in studies of cardiotoxicity side effects from antineoplastic drugs in patients and occupationally exposed workers. **Biomed Res Int**, p. 2406-2442., Feb 2014.
 20. LANG, R. M., et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **J Am Soc Echocardiogr.**, 18. p.1440–1463. 2005.
 21. LUSTOSA B. B. et al. Green tea (*Cammellia sinensis*) attenuates ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, 225.p 147–153. 2016.
 22. LOPASCHUK, G. D. et al. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. **Physiol Rev.**, v. 90, p. 207 - 258, January 2010.
 23. MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v. 79, p. 727 - 747, May 2004.
 24. MCGOWAN, J. V. et al. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 31, p. 63-75, Feb 2017.
 25. MOURA, R. A. **Técnicas de Laboratório**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1982.
 26. NAKAMURA, W.; HOJODA, S.; HAYASHI, K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochem Biophys Acta**, v. 358, p. 251-261, 1974.
 27. POLEGATO, B. F. et al. Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity is Associated with Matrix Metalloproteinase-2 Alterations in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 35, p. 1924-1933, MAR 2015.
 28. REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, v. 22, p. 659-661, MAR 2008.
 29. RENU, K.; ARUNACHALAM, S. Molecular Mechanism of Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy. **An Update Eur J Pharmacol**, v. 5, p. 241-253, JAN 2018.
 30. RIMBAUD, S. et al. Resveratrol Improves Survival, Hemodynamics and Energetics in a Rat Model of Hypertension Leading to Heart Failure. **Plos**

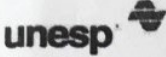
- one, v. 1813, p. 1360-1372, October 2011.
31. SHABALALA, S. et al. Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Life Sciences**, p. 160-180, MAY 2017.
 32. SHI, W. et al. Mitochondria-Targeting Small Molecules Effectively Prevent Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin.. **Molecules**, v. 23, p. 19-23, JUN 2018.
 33. TAKEMURA G.; FUJIWARA H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. Progress in cardiovascular diseases. v 49. p. 330-352. April 2007.
 34. VEJPONGSA, P.; YEH, E. T. Prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity: challenges and opportunities. **J Am Coll Cardiol.**, v. 64, p. 938-945, Sept 2014.
 35. WATSON, L. E. et al. Baseline echocardiographic values for adult male rats. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 1, p. 161-167, Feb 2004.
 36. WILKINSON JH. Introducción al diagnóstico enzimático. 3a. ed. Buenos Aires: Ediciones Toray, 1965; p. 310.
 37. WONG, J. et al. Small molecule Kinase inhibitors block the ZAK dependent inflammatory effects of doxorubicin. **Cancer boil ther**, v. 14, p. 56-63, JAN 2013.
 38. XIN, Y. F. et al. Alleviation of the acute doxorubicin induced cardiotoxicity by Lycium barbarum polysaccherides through the suppression of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 259-264, Jan 2011.
 39. XU, Y. Q. et al. Effect of extraction methods on the chemical components and taste quality of green tea extract.. **Food Chemistry**, v. 248, p. 146-154, May 2018.
 40. YU, J. et al. Recent progress in doxorubicin-induced cardiotoxicity and protective potential of natural products. **Phytomedicine**, v. 40, p. 125-139, Feb 2018.
 41. ZENG W. F., et al. C1qTNF-related protein-6 protects against doxorubicin-induced cardiac injury. **J Cell Biochem.** p 1 – 8. 2019.

ANEXOS

ANEXO A - CERTIFICADO APROVADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA FMB/UNESP, PROTOCOLO 898/2011

   UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA Comissão de Ética em Experimentação Animal Criada através da Portaria DFM nº 30 de 26/04/99	Certificado Certificamos que (Protocolo CEEA 898-2011) "Influência do extrato de chá verde na remodelação cardíaca induzida por administração de doxorubicina", a ser conduzido por Pâmela Nayara Modesto, orientada pela Profª Drª Paula Schmidt Azevedo Gaiolla, Co-orientada pelo Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério convencional, sem condições de atestar a Sanidade dos mesmos.	Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEEA em 25/08/2011  Profª Drª Maria Rosa Bet Moraes Silva Presidente da CEEA  Alberto Santos Capelluppi Secretário da CEEA Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143 e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
--	--	--

ANEXO B –AUTORIZAÇÃO APROVADA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA FMB/UNESP, PROTOCOLO 898/2011, PARA MUDANÇA DE TÍTULO.

 **Universidade Estadual Paulista**
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone: (14) 3880-1608/3880-1609
e-mail [secretaria: kieber@fmb.unesp.br](mailto:secretaria:kieber@fmb.unesp.br)
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética no Uso de Animais

Botucatu, 21 de Julho de 2016

OF. 19/2016-CEP

Ilustríssima Senhora
Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Galolla
Departamento de Clínica Médica da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Profa. Paula,

Em relação ao Projeto: **(Protocolo CEUA 898-2011)** Influência do extrato de chá verde na remodelação cardíaca induzida por administração de doxorubicina, conduzido por Pamela Nayara Modesto, orientada por Vossa Senhoria, aprovado em 25/08/2011, informo que as alterações solicitadas foram **AUTORIZADAS**, ficando na seguinte conformidade:

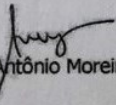
TÍTULO
Título alterado: "Influência do chá verde (Camellia Sinensis) no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos à Doxorubicina."

OBJETIVOS
Acrescentou: Avaliar o metabolismo energético, utilizando a mesma dosagem espectrofotométrica utilizada para o estresse oxidativo e também técnicas de Western blot.

OBJETIVO ACADÊMICO
Tese de Doutorado

Ao final da execução do projeto é necessário enviar o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,


Prof. Dr. Guilherme Antônio Moreira de Barros
Presidente da CEUA