



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

**MARIA ANGÉLICA MARTINS LOURENÇO REZENDE**

**EFEITO DO ADOÇANTE À BASE DE SUCRALOSE EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE CARDIOTOXICIDADE AGUDA  
INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA**

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

Orientador: Marcos Ferreira Minicucci

**Botucatu  
2021**

*Maria Angélica Martins Lourenço Rezende*

**EFEITO DO ADOÇANTE À BASE DE SUCRALOSE EM  
MODELO EXPERIMENTAL DE CARDIOTOXICIDADE  
AGUDA INDUZIDA PELA DOXORRUBICINA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci

Botucatu  
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lourenço, Maria Angélica Martins.

Efeito do adoçante à base de sucralose em modelo experimental de cardiotoxicidade aguda induzida pela Doxorubicina / Maria Angélica Martins Lourenço. - Botucatu, 2021

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

Orientador: Marcos Ferreira Minicucci  
Capes: 40101002

1. Adoçantes artificiais. 2. Adoçantes não calóricos. 3. Doxorubicina. 4. Cardiotoxicidade. 5. Doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: Adoçantes não nutritivos; Cardiotoxicidade; Doxorubicina; Sucralose.

Epígrafe

*“Santo Anjo do Senhor,  
Meu zeloso guardador  
Se a ti me confiou a piedade divina,  
Sempre me rege, me guarde,  
Me governe, me ilumine,  
Amém.”*

Dedicatória

Aos meus afilhados, Manuela (*in memorian*) e Francisco por me mostrarem o sentido da vida!

Ao meu companheiro de jornada, amor da minha vida, Vinicius, por ser minha fortaleza e estar ao meu lado em todos os momentos! Por não me deixar desistir e sempre me apoiar! Por me proporcionar o dom da maternidade e me dar a dádiva de gestar o nosso amor maior: Gael!

Aos meus pais Paulo e Mara por me incentivarem a voar alto, sem medo! Pelas tardes regadas a café e muita prosa, que foram e continuam sendo o meu combustível!

À minha irmã Mariana e meu cunhado Leonardo pelos meus tesouros Manuela e Francisco! Pela risada fácil e momentos eternizados na memória!

Às minhas avós Therezinha e Maria de Lourdes por pelo amor e carinho emanado em abraços e beijos!

Aos meus avôs Luiz (*in memorian*) e Benedito (*in memorian*) por terem sido à base da família que me sustenta! Saudades!

**Amo vocês!**

## **Agradecimento especial**

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos F. Minicucci que foi e sempre será meu exemplo. Obrigada por ter acreditado em mim e pela paciência e sabedoria em me conduzir neste percurso.



## Agradecimientos

Ao professor Dr. Leonardo A. M. Zornoff pela contribuição durante toda execução do projeto e no exame geral de qualificação.

À professora Dr. Bertha F. Polegato pelos conselhos e auxílio no estudo do coração isolado e pela colaboração no exame geral de qualificação.

Aos docentes do grupo de estudos Remodelação Cardíaca e Nutrição pelos ensinamentos.

À professora Silméia G. Z. Bazan pela valiosa colaboração na realização dos ecocardiogramas.

À professora Ana Angélica H. Fernandes pela colaboração com as análises bioquímicas.

À minha ex-aluna e amiga Marina Gaiato que com sua generosidade me ajudou em todas as etapas da execução deste projeto. Serei eternamente grata!

Aos demais pesquisadores do grupo de estudos Remodelação Cardíaca e Nutrição, envolvidos direta ou indiretamente neste projeto. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos funcionários da Comissão de Ética no Uso de Animais, Pós-Graduação, Departamento de Clínica Médica, Unidade de Pesquisa Experimental e Biblioteca por todo suporte prestado.

Às minhas companheiras do UNISAGRADO: Natália Baraldi Cunha, Maria Grossi Machado, Milene Peron R. Losilla e Roseli A. Claus. B. Pereira pelo incentivo e suporte para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus alunos e ex-alunos por me proporcionarem experiências únicas e contribuírem com a minha formação pessoal e profissional.

**Muito Obrigada!**

Resumo .....	1
Abstract .....	4
Introdução .....	7
Hipótese .....	13
Objetivo.....	15
Materiais e Métodos.....	17
Resultados .....	28
Discussão .....	44
Conclusão .....	50
Referências .....	52

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b>	Dados referentes ao peso corporal e consumo de ração .....	30
<b>Tabela 2.</b>	Frequência Cardíaca e variáveis estruturais do ecocardiograma .....	32
<b>Tabela 3.</b>	Variáveis funcionais do ecocardiograma .....	33
<b>Tabela 4.</b>	Resultados do estudo do coração isolado .....	35
<b>Tabela 5.</b>	Resultados morfométricos .....	37

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b>	Delineamento experimental .....	18
<b>Figura 2.</b>	Atividade da Catalase .....	39
<b>Figura 3.</b>	Atividade da Glutaciona Peroxidase .....	39
<b>Figura 4.</b>	Atividade da Superóxido Dismutase.....	40
<b>Figura 5.</b>	Concentração de Hidroperóxido de Lipídio .....	40
<b>Figura 6.</b>	Expressão de PGC-1 $\alpha$ .....	42
<b>Figura 7.</b>	Expressão de PPAR- $\alpha$ .....	42
<b>Figura 8.</b>	Expressão de Colágeno tipo 1 .....	43
<b>Figura 9.</b>	Expressão de Colágeno tipo 3.....	43

## Lista de abreviações



<b>% ENC</b>	Porcentagem de encurtamento
<b>+dP/dtmax</b>	Derivada positiva máxima de pressão
<b>-dP/dtmax</b>	Derivada negativa máxima de pressão
<b>AE</b>	Diâmetro do átrio esquerdo
<b>AE/PC</b>	Razão entre diâmetro do átrio esquerdo e peso corporal final
<b>AHA</b>	American Heart Associations
<b>ANNs</b>	Adoçantes não-nutritivos
<b>ÁREA AE</b>	Área do átrio esquerdo
<b>ÁREA AE/PC</b>	Razão entre área do átrio esquerdo e peso corporal final
<b>ASM</b>	Área da secção transversa dos miócitos
<b>A´</b>	Velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na telediástole
<b>CO</b>	Grupo controle + razão padrão
<b>CAT</b>	Catalase
<b>DC</b>	Débito Cardíaco
<b>DCV</b>	Doença Cardiovascular
<b>DDVE</b>	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
<b>DDVE/PC</b>	Razão entre DDVE e peso corporal final
<b>DOX</b>	Doxorrubicina
<b>DS35</b>	Grupo DOX + Sucralose 35mg/kg/dia
<b>DS100</b>	Grupo DOX + Sucralose 100 mg/kg/dia
<b>DSVE</b>	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
<b>E/A</b>	Razão entre ondas E e A do fluxo transmitral
<b>E/E´</b>	Razão entre onda E e E´
<b>E´</b>	Velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole
<b>EDPP</b>	Espessura diastólica da parede posterior do VE
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ET-1</b>	Endotelina 1
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>Esp. Rel. VE</b>	Espessura relativa do ventrículo esquerdo
<b>FC</b>	Frequência cardíaca
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FE</b>	Fração de ejeção
<b>GSH-Px</b>	Glutathiona peroxidase
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HL</b>	Hidroperóxido de lipídio

<b>IMVE</b>	Índice de massa do ventrículo esquerdo
<b>MVE</b>	Massa do ventrículo esquerdo
<b>NHANES</b>	Pesquisa Nacional de Saúde de Nutrição
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>P Desenvolvida</b>	Pressão desenvolvida
<b>PC</b>	Peso corporal final
<b>PGC-1 <math>\alpha</math></b>	Coativador 1- $\alpha$ do receptor $\gamma$ ativado por proliferador de peroxissoma
<b>PPARs</b>	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma
<b>PPAR- <math>\alpha</math></b>	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa
<b>PS</b>	Pressão sistólica
<b>SM</b>	Onda sistólica do anel mitral septal
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>TDE</b>	Tempo de desaceleração da onda E
<b>TRIV c</b>	Tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela FC
<b>VD</b>	Ventrículo direito
<b>VE</b>	Ventrículo esquerdo
<b>VS</b>	Volume sistólico

Resumo

**INTRODUÇÃO:** Apesar de a doxorrubicina (DOX) ser um dos fármacos antitumorais mais utilizados e eficientes, apresenta diversos efeitos colaterais, sendo a cardiotoxicidade a preocupação mais importante dos oncologistas no tratamento do câncer, além de ser fator limitante desta terapêutica. Diante disso, torna-se importante estudar os mecanismos na cardiotoxicidade da DOX, bem como medidas que possam atenuar ou agravar este processo. Ao mesmo tempo, é evidente o aumento do sobrepeso e obesidade, fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV). Tal dado pode ser explicado, em parte, devido ao aumento do consumo de alimentos ultracalóricos, em decorrência do consumo excessivo de açúcar. Desta forma, o consumo de açúcar vem sendo cada vez mais desencorajado, lançando-se mão de adoçantes não-nutritivos (ANNs). Dentre os ANNs, a sucralose se destaca, por ser o adoçante mais utilizado tanto para uso industrial quanto para uso pessoal. Embora seja aprovada pelos órgãos regulatórios e considerada segura, estudos mostram que a sucralose pode apresentar efeitos negativos. Deste modo, considerando que o consumo de ANNs vem crescendo exponencialmente, torna-se relevante o estudo dos efeitos do uso de ANNs na cardiotoxicidade induzida pela DOX com intuito de diminuir este agravo e, assim, melhorar a sobrevida destes pacientes. **OBJETIVO:** Avaliar a influência do adoçante à base de sucralose na cardiotoxicidade aguda induzida por DOX. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram utilizados 60 ratos Wistar machos adultos, distribuídos em 4 grupos, com 15 animais cada: Grupo Controle (CO), Grupo DOX (DOX), Grupo DOX + Sucralose 35 mg (DS35) e Grupo DOX + Sucralose 100 mg (DS100). Os ratos dos grupos DS35 e DS100, receberam durante 4 semanas a dieta suplementada com sucralose. O adoçante foi acrescido na ração padrão nas dosagens de 35 e 100 mg/kg de peso corporal por dia. Os ratos dos grupos CO e DOX receberam durante 30 dias a ração controle. Após o período de 4 semanas, os animais dos grupos DOX e DS35 e DS100 receberam injeção intraperitoneal de DOX a 20mg/kg, dose única. Os animais dos grupos CO receberam injeção intraperitoneal de salina estéril em volume equivalente ao da DOX. Quarenta e oito horas após a injeção de DOX ou salina, todos os animais foram submetidos ao ecocardiograma. Após a realização do ecocardiograma, foi realizada avaliação funcional “*ex vivo*” do coração de 8 animais de cada grupo. Após, os animais foram anestesiados e submetidos à decapitação, para coleta de material biológico. Foi realizada a avaliação da área seccional do miócito (ASM), do estresse oxidativo, a determinação da expressão das proteínas colágeno tipo I e III, PGC-1 $\alpha$  e PPAR-  $\alpha$ , por Western Blot. Análise estatística: ANOVA de 1 via e a significância estatística adotada para todas as análises foi de 5%.

**RESULTADOS:** Após 48h de aplicação da DOX, houve redução do peso corporal e do consumo de ração nos grupos DOX, DS35 e DS100. O adoçante à base de sucralose não interferiu nestes parâmetros. Não foram observadas alterações morfométricas em relação ao ventrículo esquerdo (VE), direito (VD), pulmão e fígado. Porém, houve aumento da área seccional do miócito (ASM) nos animais que receberam DOX. No ecocardiograma, a DOX promoveu aumento de câmaras cardíacas e disfunção sistólica e diastólica, dado que também foi observado na análise do coração isolado. Já o adoçante à base de sucralose diminuiu a frequência cardíaca (FC), piorou a função sistólica e diastólica, visto pela diminuição do débito cardíaco (DC) e do % de encurtamento (% ENC) e pelo aumento da razão entre onda E e velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole (E/E') e do tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado para a frequência cardíaca (TRIVc), mas não alterou as variáveis do estudo do coração isolado. Tanto a DOX quanto o adoçante à base de sucralose não interferiram no estresse oxidativo e na expressão das proteínas colágeno I e III, PGC-1 $\alpha$  e PPAR- $\alpha$ . **CONCLUSÃO:** A DOX gerou alterações estruturais e funcionais cardíacas. A suplementação com adoçante à base de sucralose, piorou as funções sistólica e diastólica após cardiotoxicidade aguda induzida por DOX.

Abstract

**INTRODUCTION:** Although doxorubicin (DOX) is one of the most used and efficient antitumor drugs, it has several side effects, with cardiotoxicity being the most important concern of oncologists in the treatment of cancer, in addition to being a limiting factor of this therapy. Given this, it is important to study the mechanisms in the cardiotoxicity of DOX, as well as measures that can mitigate or aggravate this process. At the same time, there is an evident increase in overweight and obesity, risk factors for cardiovascular diseases (CVD). This data can be explained, in part, due to the increase in the consumption of ultra-caloric foods, due to the excessive consumption of sugar. Thus, sugar consumption has been increasingly discouraged, using non-nutritive sweeteners (ANNs). Among the ANNs, sucralose stands out, as it is the most used sweetener for both industrial and personal use. Although approved by regulatory agencies and considered safe, studies show that sucralose can have negative effects. Thus, considering that the consumption of ANNs has been growing exponentially, it becomes relevant to study the effects of the use of ANNs on cardiotoxicity induced by DOX in order to reduce this problem and, thus, improve the survival of these patients. **OBJECTIVE:** To evaluate the influence of the sucralose-based sweetener on acute cardiotoxicity induced by DOX. **MATERIALS AND METHODS:** 60 adult male Wistar rats were used, distributed in 4 groups, with 15 animals each: Control Group (CO), DOX Group (DOX), DOX + Sucralose 35 mg (DS35) and DOX + Sucralose 100 mg Group (DS100). The rats in the DS35 and DS100 groups received a diet supplemented with sucralose for 4 weeks. The sweetener was added to the standard diet in dosages of 35 and 100 mg / kg of body weight per day. The rats in the CO and DOX groups received the control diet for 30 days. After a 4-week period, animals in the DOX and DS35 and DS100 groups received intraperitoneal injection of DOX at 20mg / kg, in a single dose. The animals in the CO groups received intraperitoneal injection of sterile saline in a volume equivalent to that of DOX. Forty-eight hours after the injection of DOX or saline, all animals were submitted to echocardiography. After the echocardiogram, a functional ex vivo evaluation of the heart of 8 animals in each group was performed. Afterwards, the animals were anesthetized and subjected to decapitation, to collect biological material. The evaluation of the sectional area of the myocyte (ASM), oxidative stress and the determination of the expression of collagen type I and III proteins, PGC-1 $\alpha$  and PPAR- $\alpha$ , by Western Blot. Statistical analysis: 1-way ANOVA and the statistical significance adopted for all analyzes was 5%. **RESULTS:** After 48 hours of DOX application, there was a reduction in body weight and feed consumption in the DOX, DS35

and DS100 groups. The sucralose-based sweetener did not interfere with these parameters. No morphometric changes were observed in relation to the left (LV), right (RV), lung and liver ventricles. However, there was an increase in the sectional area of the myocyte (ASM) in the animals that received DOX. On the echocardiogram, DOX promoted an increase in cardiac chambers and systolic and diastolic dysfunction, as it was also observed in the analysis of the isolated heart. The sucralose-based sweetener decreased heart rate (HR), worsened systolic and diastolic function, as seen by the decrease in cardiac output (CO) and the shortening% (% ENC) and the increase in the ratio between E wave and speed peak myocardial tissue Doppler in protodiastole ( $E / E'$ ) and isovolumetric relaxation time normalized to heart rate (TRIVc), but did not change the variables of the isolated heart study. Both DOX and the sucralose-based sweetener did not interfere with oxidative stress and the expression of collagen I and III, PGC-1 $\alpha$  and PPAR- $\alpha$  proteins. **CONCLUSION:** DOX generated cardiac structural and functional changes. Supplementation with sucralose-based sweetener worsened systolic and diastolic functions after acute DOX-induced cardiotoxicity.



# Introdução

O câncer é um importante problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morte no mundo, responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença <sup>(1)</sup>. Apesar dos dados apresentados, a taxa de mortalidade por câncer diminuiu nos últimos 30 anos, em grande parte devido a estratégias de detecção precoce, abordagens cirúrgicas aprimoradas e avanços na terapêutica do câncer, que incluem o uso de agentes quimioterápicos <sup>(2)</sup>.

As antraciclinas são agentes quimioterápicos comumente usados, isoladamente ou em combinação com outros agentes citotóxicos, que estão classificadas entre os quimioterápicos mais eficazes contra o câncer e foram listadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como medicamentos essenciais <sup>(3)</sup>. Desta forma, as antraciclinas são os agentes quimioterápicos mais utilizados mundialmente e são considerados componentes indispensáveis da quimioterapia moderna <sup>(4)</sup>.

Dentre elas, a doxorubicina (DOX) se destaca por sua potente atividade em várias formas de câncer, incluindo leucemia aguda, linfomas, sarcomas e tumores sólidos. A DOX foi aprovada para uso nos Estados Unidos em 1974 e continua sendo um agente importante em muitos protocolos quimioterápicos do câncer. As indicações atuais incluem tratamento de câncer de bexiga, mama, pulmão, estômago, ovário e tireoide, doença de Hodgkin, leucemia linfocítica aguda e não linfocítica, tumor de Wilms, neuroblastoma e sarcomas<sup>(5)</sup>. Os efeitos antineoplásicos da DOX ainda não são totalmente conhecidos, mas evidências sugerem que inibição da DNA topoisomerase II, inibição da síntese de macromoléculas, indução de apoptose e formação de radicais livres durante sua metabolização, constituem-se como mecanismos fisiopatológicos importantes <sup>(6)</sup>.

Apesar de a DOX ser um dos fármacos antitumorais mais utilizados e eficientes, apresenta diversos efeitos colaterais, sendo a toxicidade cardíaca a preocupação mais frequente dos oncologistas e, conseqüentemente, importante fator limitante desta terapêutica <sup>(7)</sup>. Dentre as conseqüências cardiovasculares do tratamento sistêmico do câncer, a disfunção cardíaca e a insuficiência cardíaca estão entre as mais graves. Sabe-se que o uso de quimioterápicos convencionais, como a DOX, pode induzir lesão nas células do miocárdio, levando a cardiotoxicidade aguda ou crônica <sup>(8)</sup>.

A cardiotoxicidade da DOX tem sido historicamente considerada dependente da dose, cumulativa e progressiva. Apesar da cardiotoxicidade crônica ser a

forma clínica mais frequente, sabe-se que o dano ao miocárdio, inclusive associado à disfunção ventricular esquerda, acontece muito precocemente<sup>(3)</sup>. A cardiotoxicidade aguda caracteriza-se por alterações súbitas da repolarização ventricular, alterações no intervalo QT, arritmias ventriculares e supraventriculares, síndromes coronarianas agudas, pericardite e miocardite. Estas alterações são geralmente observadas desde o início do tratamento <sup>(9)</sup>.

A progressão e o grau de cardiotoxicidade da DOX são variáveis entre indivíduos e deve-se à influência de diversos fatores de risco, como menor faixa etária, sexo feminino, método de administração, terapia combinada, quimioterapia prévia e presença de doenças cardiovasculares prévias<sup>(10)</sup>. Os mecanismos associados à cardiotoxicidade induzida por DOX envolvem inflamação, estresse oxidativo, apoptose, comprometimento da mitocôndria, desregulação da autofagia, modificações no metabolismo energético cardíaco, entre outros <sup>(10,11)</sup>.

O estresse oxidativo é a causa mais conhecida de cardiotoxicidade induzida por DOX <sup>(10)</sup>. Ocorre como resultado do desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas e o mecanismo antioxidante intrínseco nos cardiomiócitos<sup>(3)</sup>. A geração de EROs mediada pela DOX ocorre por via enzimática e não enzimática. Em relação à via enzimática, esta ocorre por meio do citocromo p450, com a redução da DOX pela NADPH redutase e formação de radical semiquinona, que em contato com O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gera os radicais livres superóxido e hidroxil. Em relação à via não enzimática, a geração de EROs ocorre durante as reações da DOX envolvendo o ferro <sup>(6)</sup>. Além disso, sabe-se que o miocárdio é mais susceptível a lesão oxidativa porque apresenta baixos níveis de catalase e superóxido dismutase em comparação a outros órgãos, além da glutathione peroxidase, importante enzima antioxidante, ser rapidamente inativada quando exposta a DOX <sup>(12,13)</sup>.

Outro mecanismo de cardiotoxicidade da DOX relevante é a modificação do metabolismo energético cardíaco. Neste sentido, cabe destacar o papel dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs), que são uma subfamília de receptores nucleares / fatores de transcrição ativados por ligante que pertencem à superfamília dos receptores nucleares <sup>(14)</sup>. O PPAR- $\alpha$  foi o primeiro membro dos isotipos PPARs a ser clonado e foi nomeado com base em sua capacidade de ser ativado por produtos químicos proliferadores de peroxissoma. O PPAR- $\alpha$  é expresso

predominantemente em tecidos que requerem alta energia, como o coração <sup>(15)</sup>. Após a administração de DOX, o PPAR- $\alpha$  é altamente expresso no coração e sua ativação leva a um aumento da oxidação de ácidos graxos cardíacos e necrose de cardiomiócitos, contribuindo com a cardiotoxicidade da DOX <sup>(16)</sup>.

Além disso, a disfunção mitocondrial é um elemento central no desenvolvimento da cardiotoxicidade induzida pela DOX <sup>(17)</sup>. Neste contexto, destaca-se o papel do coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ), responsável pela regulação de genes envolvidos no metabolismo energético e considerado o regulador mestre da biogênese mitocondrial, tanto em condições fisiológicas, quanto em patológicas <sup>(18)</sup>.

Diante disso, estratégias para prevenir ou mitigar os danos cardiovasculares decorrentes do tratamento com DOX são necessárias para fornecer o melhor atendimento ao paciente com câncer. Nos últimos anos, estudos mostraram a relação entre nutrientes e/ou alimentos e melhora da cardiotoxicidade induzida pela DOX <sup>(19-21)</sup>. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos deletérios de hábitos alimentares no desfecho cardíaco do tratamento com DOX.

Ao mesmo tempo, grande parcela da população mundial encontra-se, atualmente, com excesso de peso, importante fator de risco para doenças cardiovasculares (DCV)<sup>(22)</sup>. Tal dado epidemiológico pode ser explicado, em parte, devido a mudança no estilo de vida da população, como aumento do consumo de alimentos ultracalóricos, em decorrência do consumo excessivo de carboidratos, como o açúcar adicionado aos alimentos <sup>(23)</sup>. Sabe-se que a preferência pelo sabor doce é inata e favorece o consumo de tais alimentos <sup>(24)</sup>.

Assim, de acordo com a *American Heart Association* (AHA), para melhorar a densidade global de nutrientes da dieta, reduzir a ingestão de calorias em excesso e prevenir o ganho de peso, os indivíduos devem escolher alimentos e bebidas com baixo teor em açúcar<sup>(25)</sup>. Ao mesmo tempo, as diretrizes alimentares mais recentes recomendam que o açúcar adicionado represente menos de 10% das calorias diárias <sup>(26)</sup>.

Deste modo, é comum a restrição do consumo de açúcar, lançando-se mão de adoçantes não-nutritivos (ANNs), também chamados de adoçantes intensos, adoçantes

artificiais ou de baixa caloria, como alternativas para tornar os alimentos mais palatáveis, sendo comercializados como opções mais saudáveis (27).

O consumo de ANNs no mundo vem crescendo mais de 5% ao ano, o que significa que, neste ano, espera-se que os ANNs representem uma indústria de mais de US\$ 2 bilhões (28). Estudo com dados da Pesquisa Nacional de Saúde e Nutrição (NHANES) constatou que o consumo de ANNs nos Estados Unidos aumentou de 21,1% em 2003 para 24,9% em 2009-2010 entre adultos e, de 7,8% para 18,9% entre as crianças(29). O aumento do consumo de ANNs em todas as faixas etárias ocorreu, principalmente, pelo consumo de bebidas dietéticas. Aproximadamente 11% de eutróficos, 19% com excesso de peso e 22% dos adultos obesos consomem esse tipo de bebida(30). O consumo de bebidas dietéticas ou de ANNs aumenta com a idade e é mais comum entre mulheres com maior escolaridade e renda(31).

Desta forma, há muito interesse público e científico em saber se alimentos e bebidas que contêm ANNs podem ser recomendados como estratégia para reduzir o consumo de açúcar, principalmente em bebidas. No entanto, resultados inconsistentes de pesquisas e possíveis preocupações com a segurança dificultam a orientação oficial(32). Em recente revisão sistemática, o consumo de ANNs foi associado a desfechos negativos à saúde, incluindo aumento de peso e circunferência da cintura, maior incidência de obesidade, hipertensão, síndrome metabólica, diabetes tipo 2 e eventos cardiovasculares (33).

Estudos populacionais mostraram associação entre o consumo de bebidas dietéticas e o aumento do risco de DCV (34,35). Em estudo multicêntrico que envolveu 40 centros diferentes nos Estados Unidos e incluiu mulheres no período pós-menopausa, observou-se associação entre a ingestão diária de 2 ou mais bebidas dietéticas (*Diet*) e aumento da ocorrência de eventos cardiovasculares (IAM, acidente vascular cerebral ou morte vascular) e mortalidade. De modo que, mulheres que consumiam 2 ou mais bebidas *Diet* por dia tiveram um risco ajustado 30% maior de apresentarem eventos cardiovasculares, bem como a mortalidade global, em comparação com aquelas que consumiam 0-3 bebidas *Diet* por mês (36). No entanto, permanece obscura a relação causal entre consumo de ANNs e bebidas dietéticas e o aumento do risco de DCV (37).

Atualmente, nos Estados Unidos, seis ANNs (acesulfame de potássio, aspartame, neotame, advantame, sacarina e sucralose) são aprovados pelo *Food and Drug*

*Administration* (FDA), além do açúcar não-calórico, derivado da planta rebaudiosídeo A (Stevia)<sup>(38)</sup>.

A sucralose (1,6-Dicloro-1,6-didesoxi- $\beta$ -D-fructofuranosil-4-cloro-4-desoxi- $\alpha$ -D-galactopiranosídeo) é atualmente o adoçante artificial mais utilizado tanto para fins industriais quanto para uso pessoal. Embora inicialmente considerada segura para uso<sup>(39)</sup>, estudos mostram efeitos biológicos negativos da sucralose<sup>(40-43)</sup>. De fato, estudos recentes mostram que a sucralose está envolvida com modificação da microbiota intestinal<sup>(40)</sup>, alteração da homeostase da glicose e insulina<sup>(41)</sup> e de vias inflamatórias<sup>(42)</sup> e modulação de parâmetros fisiológicos envolvidos na regulação do peso corporal<sup>(43)</sup>. Estes achados não suportam dados anteriores que a sucralose é biologicamente inerte. No entanto, a análise desses estudos deve ser feita com cautela, visto que até o momento, os estudos são contraditórios <sup>(39)</sup>.

Deste modo, considerando que o consumo de ANNs vem crescendo exponencialmente, em todas as faixas etárias<sup>(30)</sup> e, que da mesma forma, a incidência de câncer também é alarmante<sup>(1)</sup>, torna-se relevante o estudo dos efeitos do uso de ANNs, em especial da sucralose, na cardiotoxicidade induzida pela DOX com o objetivo de elaborar estratégias para diminuir este agravo e, assim, melhorar a sobrevida destes pacientes. Entretanto, ainda não há estudos que avaliam a influência do adoçante à base de sucralose na cardiotoxicidade induzida por DOX.

Hipótese

Diante do exposto, acreditamos que o adoçante à base de sucralose possa piorar o quadro de cardiotoxicidade aguda induzida pela DOX.



Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do adoçante à base de sucralose na cardiotoxicidade aguda induzida pela DOX.

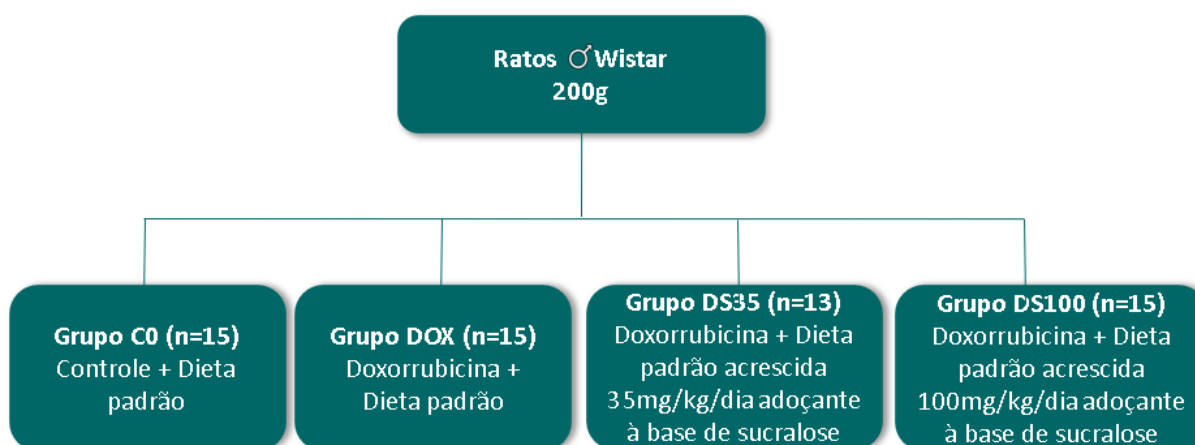
## Materiais e Métodos

## Delineamento

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu (CEUA-1291/2019) previamente ao início do experimento.

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos adultos, com peso corporal de, aproximadamente, 200g, que foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com umidade e temperatura controladas, ciclo claro-escuro de 12 horas e tiveram livre acesso à água. O peso foi monitorado semanalmente e o consumo de ração a cada dois dias, por meio da diferença entre a ração ofertada e o restante nas gaiolas.

Foram constituídos 4 grupos, com 15 animais cada: Grupo Controle (CO), Grupo DOX (DOX), Grupo DOX + Sucralose 35 mg/kg/dia (DS35) e Grupo DOX + Sucralose 100 mg/kg/dia (DS100). Devido a problemas técnicos no momento da aplicação da DOX foram excluídos 2 animais do grupo DS35. O delineamento experimental é mostrado na Figura 1.



**Figura 1.** Delineamento experimental

Os ratos dos grupos DS35 e DS100, receberam durante 4 semanas a dieta suplementada com adoçante à base de sucralose. O adoçante foi acrescido à ração padrão nas dosagens de 35 e 100 mg/kg de peso corporal por dia. Os ratos dos grupos CO e DOX receberam durante 30 dias a ração controle.

Após o período de 4 semanas, os animais dos grupos DOX e DS35 e DS100 receberam injeção intraperitoneal de DOX 20mg/kg, dose única. Os animais do grupo CO receberam injeção intraperitoneal de salina estéril em volume equivalente ao da DOX. Essa dose de DOX se mostrou efetiva para provocar lesão cardíaca em estudos anteriores<sup>(44,45)</sup>.

Quarenta e oito horas após a injeção de DOX ou salina, todos os animais foram submetidos ao ecocardiograma sob anestesia leve (descrita a seguir). Após o ecocardiograma, uma parcela desses animais foi utilizada somente para o estudo do coração isolado (n=8 por grupo, exceto grupo DS35, que apresentou n=6). Nessa técnica (descrita a seguir), a utilização da perfusão retrógrada do coração com solução de Krebs por tempo prolongado pode induzir alterações na bioquímica cardíaca e interferir com as análises posteriores. Portanto, os animais do estudo do coração isolado não foram utilizados para outras análises.

Os demais animais foram anestesiados com dose excessiva de tiopental sódico (120 mg/kg) e submetidos à decapitação. Esse método de coleta de sangue permite a aquisição de maior volume, com menos risco de hemólise e menos contaminação biológica que a coleta por punção venosa ou cardíaca. Neste caso, o uso da guilhotina constituiu método secundário de eutanásia, uma vez que os animais estavam sob anestesia profunda e não sentiram dor ou desconforto durante o procedimento.

O tórax foi aberto, o coração foi retirado, dissecado e armazenado a -80°C para posteriores análises. Também foram retirados fígado e pulmão, cujos pesos foram mensurados e posteriormente descartados, e coletado sangue, que foi centrifugado para obtenção de soro.

### **Administração do Adoçante à base de Sucralose**

O adoçante à base de sucralose (Splenda®) foi comprado de uma única vez e do mesmo lote e foi homogeneizado a fim de garantir uma suplementação uniforme de sucralose para todos os animais. Após este processo o adoçante foi acrescido na ração padrão nas dosagens de 35 e 100 mg/kg de peso corporal por dia, o que equivale a 0,4 e 1,1 mg/kg de peso corporal por dia de sucralose<sup>(46)</sup>.

A dosagem de 35 mg/kg/dia foi calculada a partir da fórmula proposta por Reagan-Shaw e colaboradores<sup>(47)</sup>, em que é possível fazer a equivalência da suplementação em humanos para ratos, considerando o consumo usual de ½ colher de sopa/dia (3 sachês) de adoçante para homem de 60kg. Já a dosagem de 100 mg/kg de peso corporal por dia foi baseada no estudo realizado por Abou-Donia e colaboradores<sup>(46)</sup> e equivale a 1 e ½ colher de sopa (9 sachês) de adoçante por dia para homem de 60kg.

### **Avaliação Funcional "in vivo" – Estudo Ecocardiográfico**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e xilazina (5mg/kg) por via intraperitoneal. Após a tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em aparato de madeira próprio e colocados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma, utilizando-se equipamento Vivid S6 da General Electric Medical Systems (Tirat Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz.

As medidas das estruturas cardíacas foram efetuadas no modo-M, obtidas com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional, na posição paraesternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M entre os músculos papilares, logo abaixo do plano da valva mitral. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor, com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional (velocidade: 100mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co.

Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas de acordo com as recomendações da *American Association of Echocardiograph*<sup>(48)</sup> e já validadas.

Foram avaliadas as seguintes variáveis estruturais:

- Diâmetro do átrio esquerdo (AE)
- Razão diâmetro do átrio esquerdo (AE) e peso corporal final (AE/PC);
- Diâmetro diastólico do VE (DDVE);
- Razão DDVE e peso corporal final (DDVE/PC);
- Diâmetro sistólico do VE (DSVE);

- Área do átrio esquerdo (ÁREA AE);
- Razão da ÁREA AE e peso corporal final (Área AE/PC);
- Espessura diastólica da parede posterior (EDPP) do VE;
- Espessura relativa do VE (Esp. Rel. VE):  $2 \times \text{EDPP} / \text{DDVE}$ ;
- Massa do VE (MVE):  $[(\text{DDVE} + \text{EDPP} + \text{EDSIV})^3 - \text{DDVE}^3] \times 1,04$ ;
- Índice de massa do VE (IMVE):  $\text{MVE} / \text{PC}$

A função do VE foi avaliada pelas seguintes variáveis:

- Débito cardíaco (DC)
- Volume sistólico (VS)
- Onda sistólica do anel mitral septal (SM);
- Fração de ejeção ( $\text{FE} = [(\text{DSVE}^3 - \text{DDVE}^3) / \text{DDVE}^3] \times 100$ );
- % de encurtamento ( $\% \text{ ENC} = [(\text{DDVE} - \text{DSVE}) / \text{DDVE}] \times 100$ );
- Razão de onda E/A do fluxo transmitral (E/A);
- Velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole (E')
- Velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na telediástole (A')
- Razão entre onda E e velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole (E/E');
- Tempo de desaceleração da onda E (TDE);
- Tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado para a frequência cardíaca ( $\text{TRIV}_c = \text{TRIV} / \text{RR} \times 0,5$ , onde RR é a distância de um batimento a outro).

Além destes parâmetros, foi avaliada a Frequência cardíaca (FC) dos animais.

### **Avaliação Funcional "ex-vivo" - Estudo do Coração Isolado**

Após a realização do ecocardiograma, 8 animais de cada grupo (exceto grupo DS35, n=6), receberam tiopental (80 mg/kg) e heparina (2000 UI) por via intraperitoneal e foram ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir, o tórax foi aberto e a aorta cateterizada com cânula de metal número 15, e foi iniciada a perfusão miocárdica retrógrada, com solução nutriente de Krebs-Henseleit, com a

seguinte composição, em mmol/l: 115 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO<sub>4</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,15 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 11 glicose. Os corações foram removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado, tamanho 3 tipo 830 (Hugo Sacks Eletronic-Germany), com pressão de perfusão constante de 75 mmHg. A solução nutriente foi continuamente oxigenada com mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5% de CO<sub>2</sub>, mantendo-se a pressão parcial de oxigênio entre 500-600 mmHg, à temperatura de 37 °C, pH entre 7,3 e 7,4. A avaliação foi realizada conforme método previamente descrito e padronizado em nosso laboratório.

Por meio da técnica descrita, foram obtidas curvas de *Starling* com infusão de líquido no balão, que permite variar a pressão diastólica no ventrículo esquerdo de 0 a 25 mmHg, por meio de incrementos graduais de 5 mmHg, registrando-se a pressão sistólica correspondente a cada variação de volume. Nesta técnica em que o coração opera em condições isovolumétricas, a pressão desenvolvida (pressão sistólica menos a pressão diastólica) será utilizada como indicadora da capacidade contrátil. Foram registradas também a primeira derivada positiva de pressão (+dP/dtmax) e a derivada negativa de pressão (-dP/dtmax). Esses índices foram utilizados, respectivamente, como parâmetros de função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo.

## **Eutanásia e Coleta do Material Biológico**

Após o estudo funcional, os animais foram anestesiados com dose excessiva de tiopental para a eutanásia. Logo após, os animais foram decapitados e o coração foi coletado e dissecado em VE e ventrículo direito (VD). O sangue dos animais também foi coletado e centrifugado para a obtenção do soro. As amostras de VE e soro foram armazenadas a -80°C para as posteriores análises.

## **Estudo Morfométrico**

Os corações foram retirados, dissecados e os ventrículos direito (VD) e o esquerdo (VE), incluindo o septo interventricular, foram separados e pesados. Em seguida, um fragmento de 3 mm de espessura foi fixado em solução de formol a 10% por período de 24 horas. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se,



a seguir, cortes coronais para posterior análise histológica. A base e a ponta do VE foram congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posteriores dosagens bioquímicas. Cortes histológicos foram corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição de áreas da secção transversa dos miócitos (ASM).

Foram mensuradas de 30 a 50 células por ventrículo analisado empregando-se microscópio *LEICA DMLS* acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador dotado de programa de análise de imagens *Image Pro-plus* (*Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA*). Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente e apresentaram forma redonda e núcleo visível no centro da célula. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

### **Análise das Enzimas Antioxidantes e Hidroperóxido de Lipídio**

As amostras do ventrículo esquerdo foram descongeladas e homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 5ml de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a  $-4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi utilizado para análise do estresse oxidativo. As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro Pharmacia Biotech (com software Swift II, England) e em leitor de microplaca ( $\mu$ Quant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-TecInstruments, USA).

A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GSH-Px, E.C. 1.11.1.9) foi determinada por meio da oxidação da glutathiona em presença de peróxido de hidrogênio e hidroperóxido.

A atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi determinada por meio da alteração na redução do nitroblue-tetrazólio (NBT) por radicais superóxido gerados pela mistura NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido) e fenazina metassulfato em pH fisiológico.

A atividade enzimática da catalase (CAT, 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%).

A concentração de hidroperóxido de lipídeo (HL) foi medida por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal ( $\text{Fe}^{2+}$ ) medida por hidroperóxido, com 100 $\mu\text{l}$  da amostra e 900 $\mu\text{l}$  de mistura reagente de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) 250 $\mu\text{M}$ , ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 25mM, xilenolorange 100 $\mu\text{M}$  e butil-hidroxitolueno (BHT) 4mM em 90% (v/v) metanol.

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

### **Determinação da expressão proteica por Western Blot**

Foi realizada a determinação da expressão das proteínas: colágeno tipo I e III, PGC- 1 $\alpha$  e PPAR-  $\alpha$  pela técnica Western Blot.

#### **a) Extração do lisado celular total**

Para determinação de todas as proteínas estudadas, a extração de proteína foi realizada utilizando-se amostras de 80 mg do ventrículo esquerdo homogeneizadas com 1ml de tampão de extração RIPA contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1%(v/v), de oxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (pH7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax TM T25 Basic, Wilmington USA). A seguir, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 12.000 rpm e a 4° C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

## **b) Eletroforese em gel**

Após a quantificação da concentração de proteína, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul debromofenol 0,02% e  $\beta$ -mercaptoetanol 200mM) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras (contendo 50  $\mu$ g de proteína total) foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 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 concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 10% e a concentração do gel de resolução variou de acordo com o peso molecular da proteína determinada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) e nos poços seguintes os grupos foram pipetados de maneira alternada. A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2 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%).

## **c) Transferência e Bloqueio**

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - TransBlot (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.

## **d) Incubação com os anticorpos primário e secundário**

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos em solução de 3% de leite em

pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20). As membranas permaneceram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e incubadas com os anticorpos secundários específicos, diluídos em solução de 1% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0. As membranas permaneceram incubadas por 1 hora e 30 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, ThermoScientific, USA.

Os anticorpos primários utilizados foram:

- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233), diluição 1:10.000.
- Colágeno 1, mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 293182), diluição 1:200.
- Colágeno 3, mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 271249), diluição 1:100.
- PGC-1 $\alpha$ , mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 517380), diluição 1:115.
- PPAR- $\alpha$ , rabbit monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 9000), diluição 1:200.

Os anticorpos secundários utilizados foram:

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005).
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2357).

As imagens foram fotografadas no analisador de imagens ImageQuant LAS 4000 (General Electric Medical Systems, USA).

A expressão de todas as proteínas analisadas foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). A análise das imagens foi realizada no programa de análise de imagens Gel Pro

Image32 versão 3.1.00 (*Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA*), que mede as bandas escuras em fundo claro do *blot* em unidade de imagem denominada pixel.

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 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), e assim, foi obtido o resultado da expressão por Western Blot.

### **Análise estatística**

Para as variáveis paramétricas, foi realizado o teste de análise de variância de 1 via (ANOVA) com pós-teste de Tukey e os valores obtidos foram apresentados em média  $\pm$  desvio padrão. Para as variáveis não paramétricas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartil.

O nível de significância adotado foi de 5%. Para análise dos dados e construção dos gráficos foi utilizado o pacote estatístico GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc).

Resultados

## **Peso Corporal e Consumo de Ração**

Os dados de peso corporal e consumo de ração são apresentados na Tabela 1. Não foi observada diferença estatística em relação ao peso inicial dos animais, dado que se manteve até a aplicação da DOX. Após 48h de aplicação do fármaco, houve redução do peso corporal nos grupos DOX, DS35 e DS100.

Já em relação ao consumo de ração, observa-se que o mesmo foi semelhante durante o período de suplementação com adoçante à base de sucralose, porém, logo após a aplicação da DOX, os grupos DOX, DS35 e DS100 apresentaram consumo de ração inferior em relação ao grupo CO.

Além disso, foi possível observar que o adoçante à base de sucralose não interferiu nestes parâmetros.

**Tabela 1.** Dados referentes a peso corporal e consumo de ração

Variáveis	Grupo CO (n=15)	Grupo DOX (n=15)	Grupo DS35 (n=13)	Grupo DS100 (n=15)	Valor de p
<b>Peso inicial (g)</b>	166,1 ± 12,06	164,5 ± 11,64	165,1 ± 12,00	164,6 ± 13,87	0,9851
<b>Peso antes da aplicação de DOX (g)</b>	313,4 ± 18,32	308,7 ± 23,43	318,5 ± 26,09	325,7 ± 22,66	0,2417
<b>Peso 48h após aplicação de DOX (g)</b>	315,4 (307,0-331,0)	287,0 (268,4-300,2)*	300,1 (268,5-305,6)*	298,8 (287,4-302,8)*	<b>0,0004</b>
<b>Consumo de ração antes da aplicação de DOX (g)</b>	21,29 ± 1,694	20,84 ± 1,161	21,19 ± 1,005	21,34 ± 1,493	0,7531
<b>Consumo de ração após 48h da aplicação de DOX (g)</b>	24,25 (21,25-25,00)	11,65 (10,50-13,00)*	10,10 (8,800-11,75)*	10,75 (8,950-12,85)*	<b>&lt; 0,0001</b>

Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Valor de p em negrito representa diferença significativa. \* = diferente de CO



## **Avaliação funcional "in vivo" – Estudo ecocardiográfico**

No ecocardiograma, a DOX promoveu diminuição da frequência cardíaca (FC) e aumento das câmaras cardíacas visto pelas seguintes alterações morfológicas: maiores valores do diâmetro do átrio esquerdo (AE) e AE corrigido pelo peso corporal final (AE/PC), área do átrio esquerdo (Área AE), área do AE corrigida pelo peso corporal (Área AE/PC), espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e espessura relativa do VE, quando comparados ao grupo controle, como mostrado na Tabela 2.

Com relação às variáveis funcionais, a DOX alterou a função sistólica dos animais, visto pela diminuição do débito cardíaco (DC), do volume sistólico (VS), da fração de ejeção (FE%) e da onda sistólica do anel mitral septal (SM). Houve também alteração da função diastólica visto pela diminuição da razão onda E/A no fluxo transmitral (E/A) e da velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole (E') e pelo aumento da velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na telediástole (A'), no tempo de desaceleração da onda E (TDE) e do tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca (TRIVc), em comparação com o grupo controle. Os dados funcionais do ecocardiograma estão representados na Tabela 3.

Já o adoçante à base de sucralose na dosagem de 100 mg/kg diminuiu a frequência cardíaca (FC) em comparação com o grupo DS35 e alterou variáveis estruturais, visto pelo aumento do diâmetro do átrio esquerdo (AE) em comparação com o grupo DOX. Além disso, o adoçante à base de sucralose teve influência na função sistólica e diastólica, visto pela diminuição do débito cardíaco (DC) e % ENC e também pelo aumento da razão entre onda E e velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole (E/E') e do tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado para a frequência cardíaca (TRIVc), sendo que a dosagem de 100 mg/kg apresenta maiores alterações em comparação com a dosagem 35mg/kg.

**Tabela 2.** Frequência Cardíaca e Variáveis Estruturais do Ecocardiograma

Variáveis	Grupo CO (n=15)	Grupo DOX (n=15)	Grupo DS35 (n=13)	Grupo DS100 (n=15)	Valor de p
<b>FC</b>	427,0 (369,0-451,0)	386,0 (338,0-406,0)*	406,0 (369,0-427,0)*	331,5 (277,8-369,0)*#	<b>0,0010</b>
<b>PC (g)</b>	315,4 (307,0-331,0)	287,0 (268,4-300,2)*	300,1 (268,5-305,6)*	298,8 (287,4-302,8)*	<b>0,0004</b>
<b>AE (mm)</b>	4,380 (4,300-4,500)	4,930 (4,820-5,260)*	5,110 (4,850-5,260)*	5,360 (5,290-5,470)*&	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>AE/PC (mm/g)</b>	0,014 ± 0,002	0,018 ± 0,001*	0,018 ± 0,002*	0,018 ± 0,001*	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>DDVE (mm)</b>	6,055 ± 0,337	5,364 ± 0,462*	5,275 ± 0,333*	5,576 ± 0,646*	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>DDVE/PC(mm/g)</b>	0,019 ± 0,001	0,019 ± 0,002	0,018 ± 0,001	0,019 ± 0,002	0,3466
<b>DSVE(mm)</b>	2,040 (1,790-2,300)	2,200 (1,850-2,300)	2,190 (1,920-2,645)	2,300 (1,913-2,850)	0,3464
<b>AREA AE (cm<sup>2</sup>)</b>	12,29 ± 1,563	16,48 ± 3,895*	16,18 ± 1,812*	17,79 ± 2,598*	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>AREA AE/PC (cm<sup>2</sup>/g)</b>	0,038 (0,035-0,043)	0,063 (0,047-0,067)*	0,055 (0,049-0,058)*	0,056 (0,052-0,066)*	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>EDPP (mm)</b>	1,450 (1,450-1,500)	1,600 (1,530-1,700)*	1,600 (1,530-1,750)*	1,565 (1,530-1,700)*	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>Esp. Rel. VE</b>	0,484 ± 0,028	0,608 ± 0,075*	0,622 ± 0,058*	0,582 ± 0,072*	<b>&lt; 0,0001</b>
<b>MVE (g)</b>	532,3 ± 56,88	526,5 ± 68,39	512,2 ± 67,44	555,0 ± 121,5	0,5662
<b>IMVE(g/kg)</b>	1,681 ± 0,182	1,863 ± 0,216	1,753 ± 0,184	1,871 ± 0,405	0,1524

Nota: Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina (dosagem); Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). FC= frequência cardíaca; PC = peso corporal final; AE = diâmetro do átrio esquerdo; AE/PC = razão AE/PC; DDVE = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DDVE/PC = razão DDVE/PC; DSVE = diâmetro sistólico do VE; ÁREA AE = área do átrio esquerdo; ÁREA AE/PC = razão ÁREA AE/PC; EDPP= espessura diastólica da parede posterior do VE; Esp. Rel. VE = espessura relativa do VE; MVE = massa do VE; IMVE = índice de MVE. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Valor de p em negrito representa diferença significativa. \* = diferente de CO; & = diferente de DOX. # = diferente de DS35.

**Tabela 3.** Variáveis Funcionais do ecocardiograma

Variáveis	Grupo CO (n=15)	Grupo DOX (n=15)	Grupo DS35 (n=13)	Grupo DS100 (n=15)	Valor de p
DC	1644 ± 3606	1202 ± 2656*	1383 ± 3430*	1001 ± 4371*#	< 0.0001
VS	40,28 ± 9,975	32,39 ± 5,563*	33,58 ± 5,905*	32,38 ± 6,341*	0,0109
SM	5,800 (5,700-6,000)	5,100 (4,800-5,500)*	5,000 (4,500-5,500)*	4,850 (4,300-5,400)*	< 0.0001
FE (%)	96,28 (95,34-97,30)	94,45 (92,10-94,89)*	92,56 (87,57-94,49)*	93,03 (87,48-94,97)*	0,0002
% ENC	66,45 ± 3,801	60,46 ± 5,051	56,56 ± 6,014*	57,09 ± 9,950*	0,0004
E/A	1,335 (1,287-1,388)	0,7905 (0,6898-1,329)*	0,8154 (0,5500-1,296)*	1,246 (0,7324-1,481)*	0,0209
E´	6,400 (6,200-7,100)	3,800 (3,500-5,800)*	3,900 (2,700-5,600)*	3,300 (3,000-4,100)*	< 0.0001
A´	4,000 (3,500-4,500)	6,000 (4,800-6,500)*	5,600 (4,500-7,400)*	6,250 (5,150-7,025)*	0,0012
E/E´	15,77 (13,86-16,31)	15,97 (14,11-17,88)	16,78 (14,87-24,76)	22,53 (17,27-25,45)*	0,0077
TDE	44,00 (42,00-44,00)	52,00 (47,00-59,00)*	52,00 (44,00-57,00)*	53,00 (46,25-57,25)*	0,0001
TRIVc	0,054 ± 0,007	0,095 ± 0,028*	0,084 ± 0,024*	0,110 ± 0,033*#	< 0.0001

Nota: Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). DC = débito cardíaco; VS = volume sistólico; SM = onda sistólica do anel mitral septal; FE (%) = fração de ejeção; %ENC = percentual de encurtamento; E/A = razão da onda E/A do fluxo transmitral; E´ = velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole; A´ = velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na telediástole; E/E´ = razão entre onda e E´; TDE = tempo de desaceleração da onda E; TRIVc = tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Valor de p em negrito representa diferença significativa. \* = diferente de CO; # = diferente de DS35.

## **Avaliação funcional "ex-vivo" - Estudo do Coração Isolado**

A DOX alterou a função sistólica (PS e + dp/dt max) e diastólica (- dp/dt max) do VE e a capacidade contrátil, avaliada pela pressão desenvolvida. O adoçante à base de sucralose não interferiu nestas variáveis, conforme observado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Resultados do estudo do coração isolado

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo CO (n=8)</b>	<b>Grupo DOX (n=8)</b>	<b>Grupo DS35 (n=6)</b>	<b>Grupo DS100 (n=8)</b>	<b>Valor de p</b>
<b>PS (mmHg)</b>	140,9 ± 21,83	100,6 ± 23,75*	93,33 ± 10,68*	94,06 ± 27,15*	<b>0,0006</b>
<b>+dp/dt max (mmHg)</b>	3125 ± 651,2	2094 ± 507,8*	2113 ± 336,8*	2081 ± 541,3*	<b>0,0010</b>
<b>- dp/dt max (mmHg)</b>	2125 (1906-2438)	1313 (875,0-1500)*	1188 (968,8-1281)*	1000 (1000-1563)*	<b>0,0018</b>
<b>P Desenvolvida</b>	110,6 ± 24,34	68,44 ± 23,98*	63,75 ± 10,81*	63,44 ± 23,71*	<b>0,0005</b>

Nota: Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). PS = pressão sistólica; +dp/dt max (mmHg) = derivada positiva de pressão; - dp/dt max (mmHg)= derivada negativa de pressão e P desenvolvida = pressão desenvolvida. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Valor de p em negrito representa diferença significativa.\* diferente de CO.

## **Estudo Morfométrico**

Não foram observadas alterações morfométricas em relação ao VE, VD e pulmão. O peso do fígado dos animais dos grupos DOX, DS35 e DS100 foi estatisticamente menor em comparação com os animais do grupo CO. Entretanto, quando normalizado pelo peso corporal final, não foram observadas diferenças entre os grupos.

Já em relação a área seccional do miócito, identificou-se aumento da mesma nos grupos DOX, DS35 e DS100 em comparação com o grupo CO, conforme mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5.** Resultados morfométricos

Variáveis	Grupo CO (n=15)	Grupo DOX (n=15)	Grupo DS35 (n=13)	Grupo DS100 (n=15)	Valor de p
VE (g)	0,656 ± 0,056	0,606 ± 0,112	0,572 ± 0,094	0,586 ± 0,096	0,0868
VD (g)	0,169 (0,151-0,189)	0,147 (0,123-0,186)	0,155 (0,139-0,180)	0,147 (0,113-0,178)	0,3150
VE/PC	2,060 ± 0,190	2,140 ± 0,350	1,950 ± 0,250	1,980 ± 0,340	0,2834
VD/PC	0,510 (0,420-0,640)	0,510 (0,440-0,710)	0,540 (0,460-0,610)	0,470 (0,370-0,590)	0,4097
PULMÃO(g)	1,381 ± 0,152	1,355 ± 0,246	1,480 ± 0,473	1,386 ± 0,291	0,7123
PULMÃO/PC	0,004 ± 0,0005	0,005 ± 0,0006	0,005 ± 0,0015	0,004 ± 0,0007	0,4007
FÍGADO(g)	11,36 ± 1,056	9,917 ± 0,734*	10,07 ± 0,819*	9,690 ± 1,585*	<b>0,0004</b>
FÍGADO/PC	0,036 ± 0,003	0,035 ± 0,004	0,034 ± 0,003	0,032 ± 0,004	0,1109
ASM (µm <sup>2</sup> )	280,1 ± 35,17	306,9 ± 18,50*	308,8 ± 26,57*	306,4 ± 19,76*	<b>0,0360</b>

Nota: Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); PC = peso corporal; VE = peso do ventrículo esquerdo; VE/PC = VE ajustado pelo PC; VD = peso do ventrículo direito; VD/PC = VD ajustado pelo PC; Pulmão = peso do pulmão; Pulmão/PC = peso do pulmão ajustado pelo PC; Fígado = peso do fígado. Fígado/PC = peso do fígado ajustado pelo PC; ASM = área seccional do miócito. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). Valor de p em negrito representa diferença significativa. \* = diferente de CO.

## **Análise das Enzimas Antioxidantes e Hidroperóxido de Lipídio**

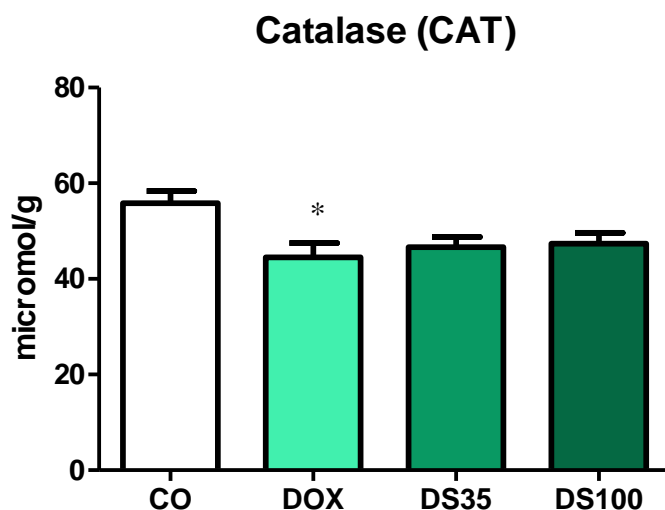
Na análise das enzimas antioxidantes, a DOX diminuiu as concentrações cardíacas de catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px).

Já o adoçante a base de sucralose, não alterou as concentrações cardíacas de CAT. Porém, aumentou a concentração cardíaca da enzima superóxido dismutase (SOD).

Em relação ao hidroperóxido de lipídio não foi observada diferença estatística na comparação entre os grupos.

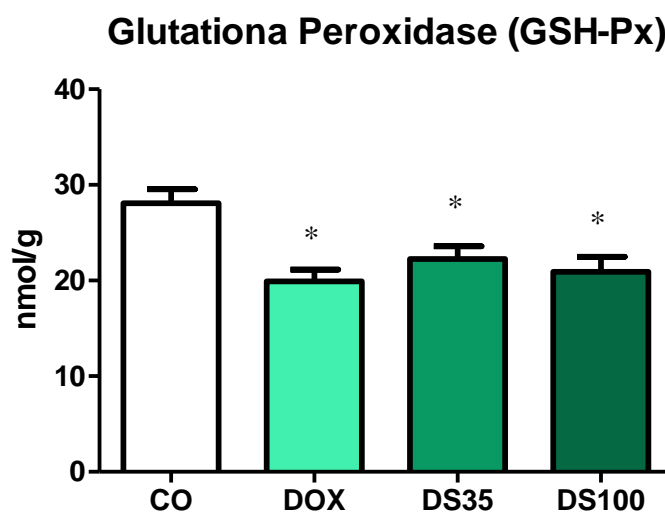
Os dados referentes à análise das enzimas antioxidantes e hidroperóxido de lipídio estão demonstrados nas Figuras 2, 3, 4 e 5.





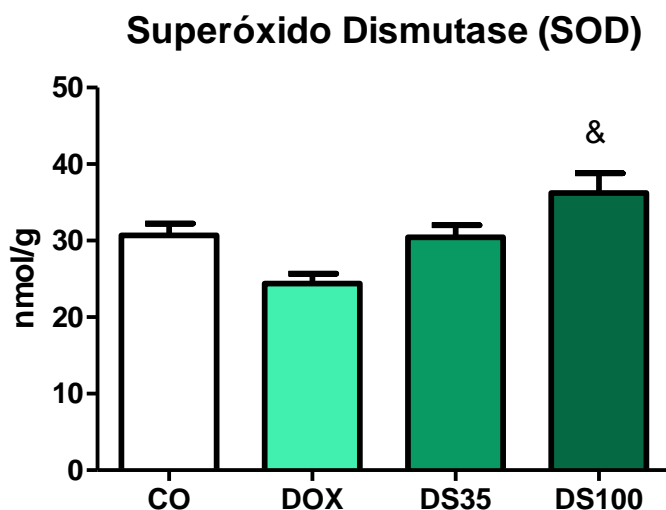
**Figura 2:** Atividade da Catalase (micromol/g). Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de  $p=0,0206$ .

\* = diferente de CO.



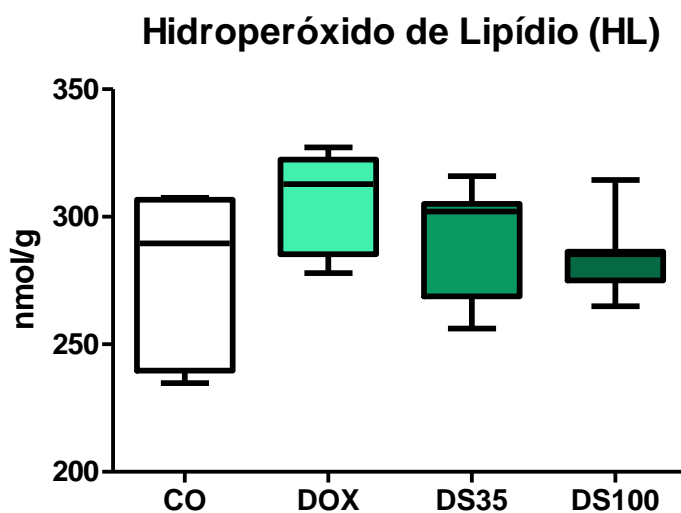
**Figura 3:** Atividade da Glutathiona Peroxidase (nmol/g). Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de  $p=0,0018$ .

\* = diferente de CO.



**Figura 4:** Atividade da Superóxido Dismutase (nmol/g). Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de  $p= 0,0014$ .

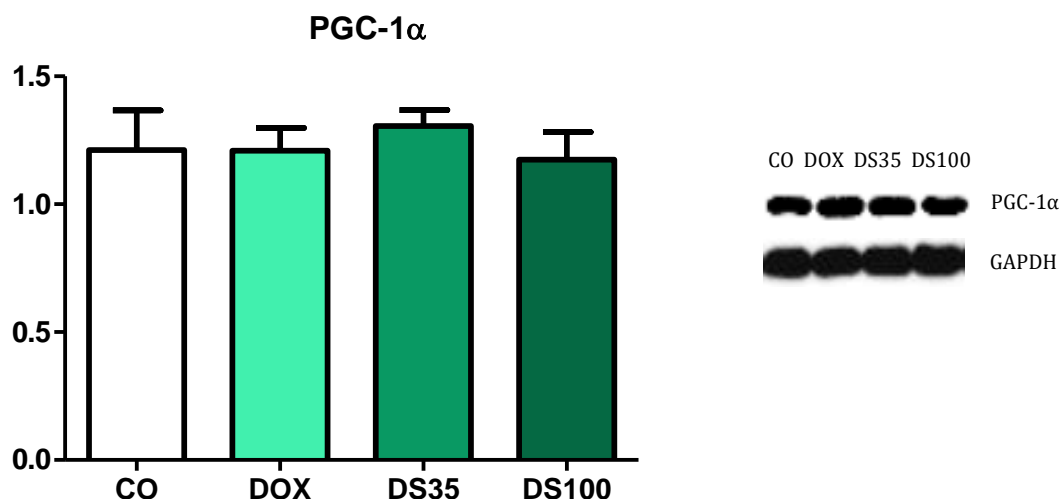
& = diferente de DOX.



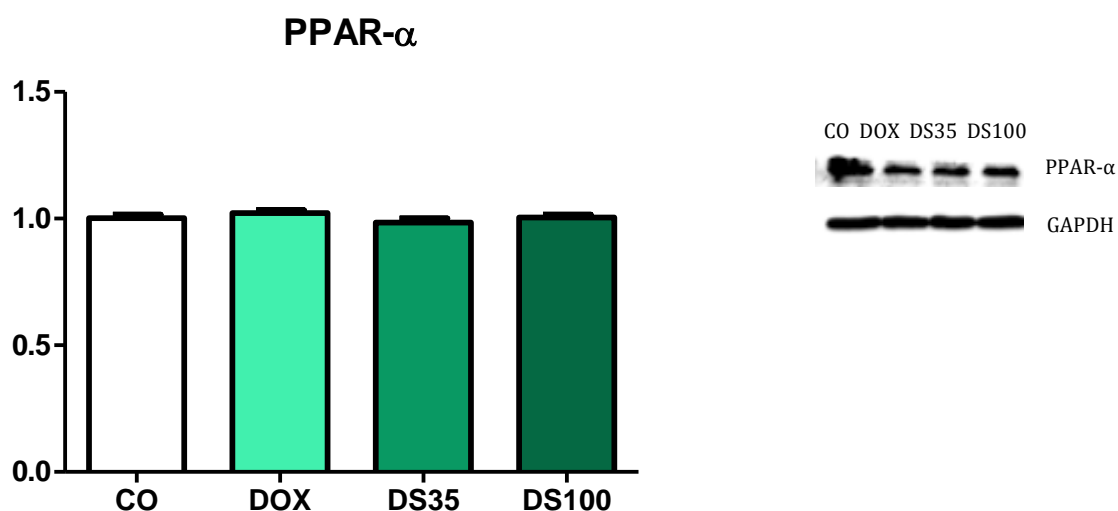
**Figura 5:** Concentração de Hidroperóxido de Lipídio (nmol/g). Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. Valor de  $p= 0,2034$ .

## **Determinação da expressão proteica por Western Blot**

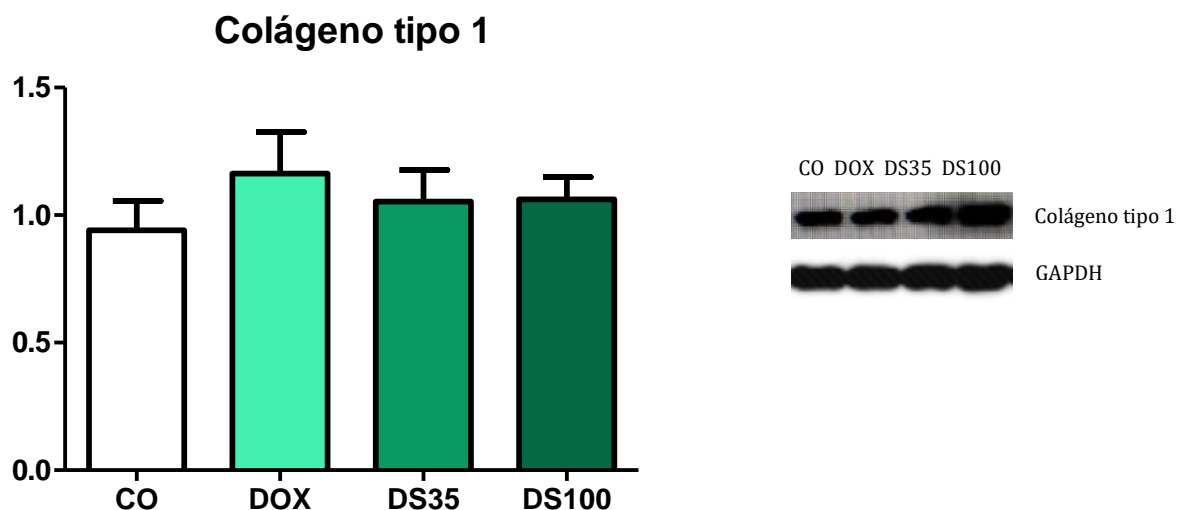
Não houve diferença estatística na comparação entre os grupos em relação a expressão proteica de PGC-1 $\alpha$ , PPAR- $\alpha$ , Colágeno tipo 1 e tipo 3, conforme mostrado nas figuras 6, 7, 8 e 9, respectivamente.



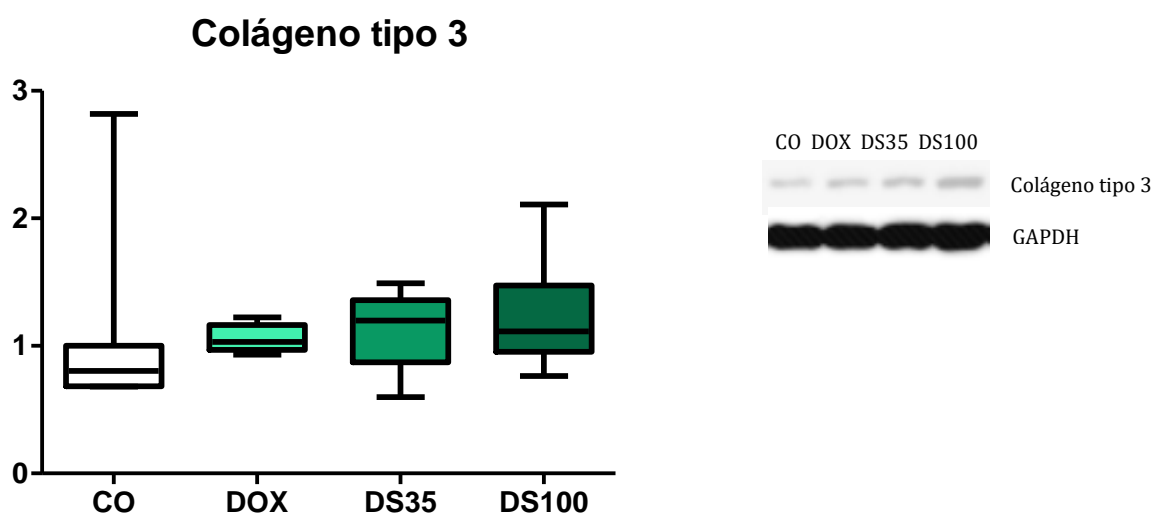
**Figura 6:** Expressão de PGC-1 $\alpha$ . Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p= 0,847.



**Figura 7:** Expressão de PPAR- $\alpha$ . Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de p= 0,298



**Figura 8:** Expressão de Colágeno Tipo 1. Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de  $p=0,661$ .



**Figura 9:** Expressão de Colágeno Tipo 3. Grupo CO= animais alimentados com ração padrão que receberam aplicação de solução salina; Grupo DOX= animais alimentados com ração padrão que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS35= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 35mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg); Grupo DS100= animais alimentados com ração padrão acrescida de adoçante à base de sucralose a 100mg/kg/dia que receberam dose única de DOX (20mg/kg). Dados expressos em média e desvio padrão. Valor de  $p=0,252$ .

Discussão

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do adoçante à base de sucralose na cardiotoxicidade aguda induzida por DOX. Nosso estudo mostrou que a DOX induziu cardiotoxicidade aguda, evidenciada por alterações morfológicas e funcionais cardíacas, após 48h de administração. Já a suplementação com adoçante à base de sucralose, piorou as funções sistólica e diastólica, apesar de não lesar diretamente o miocárdio.

Sabe-se que a DOX pode gerar inúmeros efeitos colaterais, como desidratação, caquexia, náuseas e vômitos frequentes<sup>(49)</sup>. Neste estudo, evidenciou-se a diminuição do peso corporal dos animais e menor consumo de ração após a administração da DOX. Como a perda de peso ocorreu num curto período (48h), provavelmente a diminuição do peso corporal se deu pela diminuição da ingestão hídrica e pelo aumento da atividade diurética, acarretando em diminuição da volemia dos animais, dado este observado em outros estudos<sup>(50,51)</sup>.

Uma das consequências da hipovolemia é a diminuição da perfusão tecidual, o que pode levar a vasoconstrição periférica e ao aumento da pós-carga, influenciando negativamente na função cardíaca<sup>(19)</sup>. Segundo Licata *et al.*, a cardiotoxicidade aguda induzida por DOX surge durante ou imediatamente após o tratamento e, envolve, entre outros fatores, a hipovolemia e, consequentes mecanismos compensatórios<sup>(52)</sup>.

De fato, os animais que receberam DOX apresentaram disfunção sistólica, visto pelo menor débito cardíaco (DC), volume sistólico (VS), fração de ejeção (FE%) e onda sistólica do anel mitral septal (SM). Houve também alteração da função diastólica visto pela diminuição da razão onda E/A no fluxo transmitral (E/A) e da velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole (E') e pelo aumento da velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na telediástole (A'), no tempo de desaceleração da onda E (TDE) e do tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca (TRIVc).

Além disso, a avaliação isolada do coração confirma a disfunção sistólica e diastólica, observadas pelas alterações na pressão sistólica, na derivada positiva máxima e mínima de pressão e na capacidade contrátil.

Do ponto de vista morfológico e estrutural, a DOX culminou em aumento das câmaras cardíacas e da área seccional do miócito (ASM), apesar de não influenciar no peso do VE e VD.

Os mecanismos moleculares precisos pelos quais a DOX induz a disfunção cardíaca ainda não estão completamente elucidados. Postula-se que a DOX atua por múltiplos mecanismos de ação. Muitos autores apoiam a visão de que a geração de EROs após o tratamento com DOX e sua consequente peroxidação lipídica, desregulação do cálcio e intervenção no metabolismo energético são vias fisiopatológicas importantes<sup>(53-55)</sup>.

No presente estudo, houve diminuição das enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px), porém não houve aumento da peroxidação lipídica após a administração de DOX, assim como não houve alterações na expressão das proteínas PGC-1 $\alpha$  e PPAR- $\alpha$ , demonstrando que, neste estudo, tais vias não foram afetadas.

Sabendo que a elevação da incidência de neoplasia é uma tendência mundial devido a vários fatores, incluindo aumento da expectativa de vida, hábitos de vida modernos e poluição ambiental e, que a DOX é um dos principais agentes quimioterápicos utilizados em diversas neoplasias<sup>(50)</sup>, torna-se de fundamental importância o estudo acerca dos mecanismos envolvidos neste processo fisiopatológico, bem como dos fatores que podem alterar positivamente ou não, o prognóstico destes pacientes.

Ao mesmo tempo que a incidência de câncer aumenta, é evidente o aumento do consumo de ANNs como uma alternativa ao consumo de adoçantes calóricos, como o açúcar<sup>(28)</sup>. Dentre estes ANNs, a sucralose é o mais amplamente utilizado<sup>(56)</sup>. Apesar de ser considerada segura, estudos recentes apontam que o seu consumo pode apresentar efeitos adversos, entretanto a literatura ainda não apresenta um consenso sobre o assunto<sup>(57-64)</sup>.

No presente estudo, a suplementação com adoçante à base de sucralose piorou a função sistólica e diastólica após a administração com DOX, o que mostra que esta não pode ser considerada biologicamente inerte.

No que se refere a função sistólica, o adoçante à base de sucralose na dosagem de 100 mg/kg de peso por dia diminuiu o DC, apesar de não influenciar no VS, o que pode ser explicado pela redução da FC. Cabe ressaltar, que também foi observada



diminuição no percentual de encurtamento, o que reforça o dado de piora da função sistólica. Além disso, mesmo havendo diminuição na FC, houve alteração da função diastólica, visto pelo aumento da razão E/E' e do TRIV corrigido pela FC, o que demonstra que o adoçante à base de sucralose piora tanto a função sistólica quanto diastólica.

Os mecanismos pelos quais o adoçante à base de sucralose interferiu na disfunção cardíaca causada pela DOX ainda não foram totalmente elucidados, mas os dados deste estudo revelam que podem estar relacionados com alterações de mecanismos neuro-humorais, uma vez que não foi observada piora da função cardíaca no estudo do coração isolado e, que estes são os únicos fatores que diferem as duas avaliações funcionais utilizadas<sup>(51)</sup>.

Além disso, o adoçante à base de sucralose não alterou a área seccional do miócito (ASM) e a expressão de colágeno 1 e 3, evidenciando que o adoçante não agrediu diretamente o coração, mas acentuou alterações neuro-humorais acarretadas pela DOX.

Por não ser metabolizada pelo organismo, grande parte da sucralose é excretada pela urina, o que pode estimular a diurese osmótica e contribuir com a hipovolemia observada após administração de DOX, propiciando a diminuição do débito cardíaco<sup>(65)</sup>.

Sabe-se que a redução do débito cardíaco ativa uma série de adaptações na tentativa de manter a homeostasia cardiovascular. Uma das mais importantes é a ativação do sistema nervoso simpático (adrenérgico)<sup>(66)</sup>.

De fato, estudo demonstrou hiperatividade simpática em animais tratados com DOX<sup>(67)</sup>. Uma das vias envolvidas neste processo é a produção de endotelina 1 (ET-1). A ET-1 induz hiperatividade simpática e secreção de vasopressina, que são reguladas pelo barorreflexo arterial, tipicamente prejudicado na insuficiência cardíaca<sup>(68)</sup>.

Foi demonstrado que as concentrações plasmáticas de ET-1 estão aumentadas em pacientes tratados com DOX<sup>(69)</sup>. A ET-1 é produzida por muitos tipos de células, incluindo células endoteliais vasculares, de músculo liso e cardiomiócitos. No coração, a ET-1 contribui para a contratilidade miocárdica, cronotropia, arritmogênese e remodelação cardíaca após insuficiência cardíaca congestiva<sup>(70)</sup>. Estudos sugerem que ET-1 induz disfunção mitocondrial e está envolvida no desenvolvimento de cardiomiopatia induzida por DOX<sup>(69,71)</sup>.

Além disso, o óxido nítrico cardíaco também está aumentado durante o desenvolvimento da cardiomiopatia induzida pela DOX<sup>(71)</sup>. Em estudos anteriores, foi observado que o aumento patológico de radicais livres, como o óxido nítrico, estimula a produção de ET-1 por células endoteliais em tecidos cardíacos<sup>(72)</sup>.

No que se refere aos efeitos da sucralose na função endotelial, pouco se sabe. Porém, em estudo recente os ratos que consumiram sucralose na concentração da ingestão diária aceitável revelaram uma disfunção endotelial vascular significativa em comparação com outros grupos<sup>(73)</sup>. Um mecanismo provável seria o aumento de substâncias vasoconstritoras que levaria ao aumento da pós-carga e, conseqüentemente, a piora da função ventricular.

Outras hipóteses que explicariam a piora da função cardíaca nos animais que receberam adoçante à base de sucralose são que o adoçante pioraria o estresse oxidativo e o metabolismo energético cardíaco que, como já foi mencionado anteriormente, são mecanismos fisiopatológicos importantes da DOX<sup>(53-55)</sup>.

Segundo Kundu *et al.*, a sucralose promove o acúmulo de EROS e adipogênese em células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano<sup>(74)</sup>. Em estudo com carpas, a sucralose, foi capaz de gerar alterações no DNA, apoptose e estresse oxidativo<sup>(75)</sup>.

Já do ponto de vista metabólico, estudos associam o consumo de sucralose com alterações no metabolismo de macronutrientes, em especial, da glicose<sup>(76,77)</sup>.

Porém, os resultados deste estudo não comprovam tais hipóteses, uma vez que, mesmo o adoçante tendo aumentado SOD e CAT, o que poderia sugerir uma resposta antioxidante adaptativa, não houve alteração na produção de hidroperóxido de lipídio, indicando não haver correlação com estresse oxidativo. Da mesma forma, o adoçante à base de sucralose não interferiu na expressão de proteínas envolvidas com metabolismo energético cardíaco, PPAR- $\alpha$  e PGC-1 $\alpha$ . Tais achados, reforçam ainda mais que não houve lesão direta ao miocárdio após a suplementação com adoçante à base de sucralose.

É importante mencionar que a estimativa confiável da ingestão de ANNs é complexa, depende da forma de apresentação (líquida ou em pó) e do modo de utilização (sachê, colher de sopa, esguicho, entre outras)<sup>(78)</sup>. No entanto, a quantidade de adoçante à base de sucralose utilizada neste estudo é facilmente ingerida pela população, uma vez que a média de consumo de ANNs é de um sachê por bebida, e que indivíduos que

substituem o açúcar pelos ANNs o fazem em todas as bebidas ingeridas ao longo do dia, além de optarem por consumir alimentos com baixo teor em açúcar, que também apresentam ANNs em sua composição<sup>(79)</sup>.

Considerando os resultados encontrados neste estudo, torna-se relevante o aprofundamento do estudo acerca dos mecanismos envolvidos na piora da função cardíaca, após o consumo de adoçante à base de sucralose na cardiotoxicidade aguda induzida por DOX.

Conclusão

A DOX gerou alterações estruturais e funcionais cardíacas. A suplementação com adoçante à base de sucralose, piorou as funções sistólica e diastólica após cardiotoxicidade aguda induzida por DOX, apesar de não lesar diretamente o miocárdio. Logo, alterações neuro-humorais podem estar envolvidas nesse processo.

## Referências

1. OPAS/OMS Brasil. Câncer [Internet]. Brasília: OPAS/OMS Brasil; 2018 [citado 9 Dez 2020]. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094)
2. Curigliano G, Cardinale D, Dent S, Criscitiello C, Aseyev O, Lenihan D, et al. Cardiotoxicity of anticancer treatments: epidemiology, detection, and management. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2016 [citado 4 Maio 2020];66(4):309–25. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21341>
3. Nebigil CG, Désaubry L. Updates in anthracycline-mediated cardiotoxicity. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018[citado 4 Maio 2020];9(12):1262-75. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30483123>
4. Corremans R, Adão R, De Keulenaer GW, Leite-Moreira AF, Brás-Silva C. Update on pathophysiology and preventive strategies of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2019 [citado 4 Maio 2020];46(3):204-15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30244497/>
5. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Doxorubicin. In: *LiverTox: clinical and research information liver injury* [Internet]. Bethesda: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease; 2012 [Atualizada em Jan 2018; citado 4 Maio 2020]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/?term=doxorubicin%20livertox>
6. Ferreira ALA, Matsubara LS, Matsubara BB. Anthracycline-induced cardiotoxicity. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008 [citado 8 Nov 2019];6(4):278-81. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18855640>
7. Zhang YW, Shi J, Li YJ, Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2009 [citado 8 Nov 2019];57(6):435-45. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19866340>
8. Swain SM, Whaley FS, Ewer MS. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*. 2003;97(11):2869–79.
9. Adão R, Keulenaer G, Leite-Moreira A, Brás-Silva C. Cardiotoxicity associated with cancer

- therapy: Pathophysiology and prevention. *Rev Port Cardiol* [Internet]. 2013 [citado 8 Nov 2019];32(5):395–409. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2174204913000895>
10. Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, Janssens S, Crijns HJ, Moens AL. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2012 [citado 8 Nov 2019];52(6):1213–25. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.03.006>
  11. Prathumsap N, Shinlapawittayatorn K, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Effects of doxorubicin on the heart: from molecular mechanisms to intervention strategies *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2020 [citado 9 Dez 2020];866(1):9-19. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31758940/>
  12. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev.* 2004;56(2):185–229.
  13. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Med Res Rev.* 2014;34(1):106–35.
  14. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2006 [citado 9 Dez 2020];58(4):726-41. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17132851/>
  15. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs [Internet]. *Annu Rev Med.* 2002 [citado 9 Dez 2020];53(4):409–35. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11818483/>
  16. Rahmatollahi M, Baram SM, Rahimian R, Saeedi Saravi SS, Dehpour AR. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  inhibition protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Cardiovasc Toxicol* [Internet]. 2016 [citado 9 Dez 2020];16(3):244–50. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26082188/>
  17. Govender J, Loos B, Marais E, Engelbrecht AM. Melatonin improves cardiac and mitochondrial function during doxorubicin-induced cardiotoxicity: a possible role for



- peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha and sirtuin activity? *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2018 [citado 9 Dez 2020];358(1):86–101. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29966675/>
18. Di W, Lv J, Jiang S, Lu C, Yang Z, Ma Z, et al. PGC-1: the energetic regulator in cardiac metabolism. *Curr Issues Mol Biol*. 2018 [citado 9 Dez 2020];28:29-46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29388552/>
  19. Mathias LMBS, Alegre PHC, Santos IOF, Bachiega T, Figueiredo AM, Chiuso-Minicucci F, et al. Euterpe oleracea Mart. (Açaí) supplementation attenuates acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53(2):388–99.
  20. Ma Y, Yang L, Ma J, Lu L, Wang X, Ren J, Yang J. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017 [citado 4 Maio 2020];1863(8):1904-911. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28069395/>
  21. He H, Luo Y, Qiao Y, Zhang Z, Yin D, Yao J, et al. Curcumin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via suppressing oxidative stress and preventing mitochondrial dysfunction mediated by 14-3-3 $\gamma$ . *Food Funct*. 2018;9(8):4404–18.
  22. Blüher M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 [citado 9 Dez 2020];15(5):288-98. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30814686/>
  23. Mooradian AD, Smith M, Tokuda M. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: a narrative review. *Clin Nutr ESPEN*. 2017 [citado 4 Maio 2020];18:1-8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29132732>
  24. Tan HE, Sisti AC, Jin H, Vignovich M, Villavicencio M, Tsang KS, et al. The gut-brain axis mediates sugar preference. *Nature*. 2020 [citado 4 Maio 2020];580(7804):511-6. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32322067>
  25. Krauss RM, Eckel RH, Howard B, Appel LJ, Daniels SR, Deckelbaum RJ, et al. AHA Dietary Guidelines: revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Stroke*. 2000 [citado 4 Maio 2020];31(11):2751-66. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11056107/>
  26. U.S. Department of Health and Human Services, Department of Agriculture. Dietary

- Guidelines for Americans 2015-2020 [Internet]. 8th ed. Washington: Department of Agriculture; 2015 [citado 8 Nov 2019]. Disponível em: <https://health.gov/dietaryguidelines/2015/>
27. Pepino MY, Bourne C. Non-nutritive sweeteners, energy balance, and glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2011 [citado 8 Nov 2019];14(4):391-5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21505330/>
  28. Sylvetsky AC, Rother KI. Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiol Behav* [Internet]. 2016 [citado 8 Nov 2019];164 (1):446-50. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27039282/>
  29. Piernas C, Ng SW, Popkin B. Trends in purchases and intake of foods and beverages containing caloric and low-calorie sweeteners over the last decade in the United States. *Pediatr Obes*. 2013;8(4):294-306.
  30. Sylvetsky AC, Welsh JA, Brown RJ, Vos MB. Low-calorie sweetener consumption is increasing in the United States. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(3):640-6.
  31. Drewnowski A, Rehm CD. Socio-demographic correlates and trends in low-calorie sweetener use among adults in the United States from 1999 to 2008. *Eur J Clin Nutr*. 2015;69(9):1035-41.
  32. Malik VS. Non-sugar sweeteners and health: The weight of evidence hints at benefits, but the full picture has yet to emerge. *BMJ* [Internet]. 2019 [citado 8 Nov 2019];364 (1):1-2. Disponível em: <https://www.bmj.com/content/364/bmj.k5005>
  33. Azad MB, Abou-Setta AM, Chauhan BF, Rabbani R, Lys J, Copstein L, et al. Nonnutritive sweeteners and cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials and prospective cohort studies. *CMAJ*. 2017;189(28):929-39.
  34. Fowler SP, Williams K, Resendez RG, Hunt KJ, Hazuda HP, Stern MP. Fueling the obesity epidemic? Artificially sweetened beverage use and long-term weight gain. *Obesity (Silver Spring)* [Internet]. 2008 [citado 8 Nov 2019];16(8):1894-900. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18535548>
  35. Lutsey PL, Steffen LM, Stevens J. Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the atherosclerosis risk in communities study. *Circulation* [Internet]. 2008

- [citado 8 Nov 2019];117(6):754–61. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18212291>
36. Vyas A, Rubenstein L, Robinson J, Seguin RA, Vitolins MZ, Kazlauskaite R, et al. Diet drink consumption and the risk of cardiovascular events: a report from the women’s health initiative. *J Gen Intern Med* [Internet]. 2015 [citado 8 Nov 2019];30(4):462–8. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s11606-014-3098-0>
  37. Sylvetsky AC. Metabolic effects of low-calorie sweeteners: a brief review. *Obesity* [Internet]. 2018 [citado 9 Dez 2020];26:25–31. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30070039/>
  38. U.S Food and Drug Administration. Adoçantes de alta intensidade [Internet]. Silver Spring: FDA; 2014 [citado 9 Dez 2020]. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/high-intensity-sweeteners>
  39. Magnuson BA, Roberts A, Nestmann ER. Critical review of the current literature on the safety of sucralose. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2017 [citado 9 Dez 2020];106:324–55. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28558975/>
  40. Plaza-Diaz J, Pastor-Villaescusa B, Rueda-Robles A, Abadia-Molina F, Ruiz-Ojeda FJ. Plausible biological interactions of low- and non-calorie sweeteners with the intestinal microbiota: an update of recent studies. *Nutrients* [Internet]. 2020 [citado 5 Maio 2020];12(4):1153. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32326137>
  41. Bueno-Hernández N, Esquivel-Velázquez M, Alcántara-Suárez R, Gómez-Arauz AY, Espinosa-Flores AJ, de León-Barrera KL, et al. Chronic sucralose consumption induces elevation of serum insulin in young healthy adults: a randomized, double blind, controlled trial. *Nutr J*. 2020;19(1):32.
  42. Sylvetsky AC, Sen S, Merkel P, Dore F, Stern DB, Henry CJ, et al. Consumption of diet soda sweetened with sucralose and acesulfame-potassium alters inflammatory transcriptome pathways in females with overweight and obesity. *Mol Nutr Food Res* [Internet]. 2020 [citado 5 Maio 2020];64(11):1901166. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32281732/>
  43. de-la-Cruz M, Millán-Aldaco D, Soriano-Nava DM, Drucker-Colín R, Murillo-Rodríguez E. The artificial sweetener Splenda intake promotes changes in expression of c-Fos and NeuN

- in hypothalamus and hippocampus of rats. *Brain Res* [Internet]. 2018 [citado 5 Maio 2020];1700:181–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30201258>
44. Carvalho PB, Gonçalves ADF, Alegre PHC, Azevedo PS, Roscani MG, Bergamasco CM, et al. Pamidronate attenuates oxidative stress and energetic metabolism changes but worsens functional outcomes in acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40(3–4):431–42.
  45. Polegato BF, Minicucci MF, Azevedo PS, Carvalho RF, Chiuso-Minicucci F, Pereira EJ, et al. Acute doxorubicin-induced cardiotoxicity is associated with matrix metalloproteinase-2 alterations in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2015;35(5):1924–33.
  46. Abou-Donia MB, El-Masry EM, Abdel-Rahman AA, McLendon RE, Schiffman SS. Splenda alters gut microflora and increases intestinal P-glycoprotein and cytochrome P-450 in male rats. *J Toxicol Environ Heal A*. 2008;71(21):1415–29.
  47. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB Journal* [Internet] 2008 [citado 5 Maio 2020];22(3):659–61. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17942826/>
  48. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. [Internet]. 2015 [citado 5 Maio 2020];28(1):1-39. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25559473/>
  49. Barbosa RR, Bourguignon TB, Torres LD, Arruda LS, Jacques TM, Serpa RG, et al. Anthracycline-associated cardiotoxicity in adults: systematic review on the cardioprotective role of beta-blockers. *Rev Assoc Med Bras*. 2018;64(8):745–54.
  50. Wojtacki J, Lewicka-Nowak E, Lesniewski-Kmak K. Anthracycline-induced cardiotoxicity: clinical course, risk factors, pathogenesis, detection and prevention - Review of the literature. *Med Sci Monit*. 2000;6(2):411–20.
  51. Melo IM, Oliveira MS. Avaliação das alterações cardiotóxicas decorrentes do uso da doxorubicina : estudo experimental em ratos. *Rev Med Minas Gerais*. 2012;22:9–13.

52. Licata S, Saponiero A, Mordente A, Minotti G. Doxorubicin metabolism and toxicity in human myocardium: role of cytoplasmic deglycosidation and carbonyl reduction. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2000 [citado 14 Dez 2020];13(5):414–20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10813659/>
53. Wenningmann N, Knapp M, Ande A, Vaidya TR, Ait-Oudhia S. Insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: molecular mechanisms, preventive strategies, and early monitoring. *Mol Pharmacol* [Internet]. 2019 [citado 14 Dez 2020];96(2):219–32. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31164387/>
54. Cappetta D, De Angelis A, Sapio L, Prezioso L, Illiano M, Quaini F, et al. Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: a common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2017 [citado 14 Dez 2020];2017:1-13. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29181122/>
55. Renu K, Abilash VG, Tirupathi TP, Arunachalam S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy – An update. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2018 [citado 14 Dez 2020];818:241–53. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29074412/>
56. Chern C, Tan S-Y. Energy expenditure, carbohydrate oxidation and appetitive responses to sucrose or sucralose in humans: a pilot study. *Nutrients*. 2019;11(8):1782.
57. Schiffman SS, Rother KI. Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues. *J Toxicol Environ Heal B Crit Rev*. 2013;16(7):399–451.
58. Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res*. 2002;519(1-2):103–19.
59. Vamanu E, Pelinescu D, Gatea F, Sârbu I. Altered in vitro metabolomic response of the human microbiota to sweeteners. *Genes (Basel)*. 2019;10(7):535.
60. Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Sáez-Lara MJ, Gil A. Effects of sweeteners on the gut microbiota: a review of experimental studies and clinical trials. *Adv Nutr* [Internet]. 2019 [citado 8 Nov 2019];10:31–48. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30721958/>
61. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Brito-Cordova GX, Diaz RAG, Valentin DV, Almeda-Valdes P. Effects of the non-nutritive sweeteners on glucose metabolism and appetite

regulating hormones: systematic review of observational prospective studies and clinical Trials. PLoS One. 2016;11(8):1-17.

62. Mace OJ, Lister N, Morgan E, Shepherd E, Affleck J, Helliwell P, et al. An energy supply network of nutrient absorption coordinated by calcium and T1R taste receptors in rat small intestine. *J Physiol* [Internet]. 2009 [citado 8 Nov 2019];587(1):195–210. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001049>
63. Mace OJ, Affleck J, Patel N, Kellett GL. Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J Physiol*. 2007;582(1):379–92.
64. Wang X, Guo J, Liu Y, Yu H, Qin X. Sucralose increased susceptibility to colitis in rats. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2019 [citado 8 Nov 2019];25(2):e3–4. Disponível em: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/25/2/e3/5006491>
65. Magnuson BA, Carakostas MC, Moore NH, Poulos SP, Renwick AG. Biological fate of low-calorie sweeteners. *Nutr Rev* [Internet]. 2016 [citado 15 Nov 2020];74(11):670–89. Disponível em: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1093/nutrit/nuw032>
66. Floras JS. Sympathetic activation in human heart failure: diverse mechanisms, therapeutic opportunities. *Acta Physiol Scand* [Internet]. 2003 [citado 14 Dez 2020];177(3):391–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12609011/>
67. Potočník N, Perše M, Cerar A, Injac R, Finderle Ž. Cardiac autonomic modulation induced by doxorubicin in a rodent model of colorectal cancer and the influence of fullereneol pretreatment. Lesnefsky EJ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 [citado 15 Dez 2020];12(7):1-17. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0181632>
68. Rossi NF, Maliszewska-Scislo M, Chen H. Central endothelin: effects on vasopressin and the arterial baroreflex in doxorubicin heart failure rats. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2008 [citado 15 Dez 2020];86(6):343–52. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18516097/>
69. Miyagawa K, Emoto N, Widyantoro B, Nakayama K, Yagi K, Rikitake Y, et al. Attenuation of doxorubicin-induced cardiomyopathy by endothelin-converting enzyme-1 ablation through prevention of mitochondrial biogenesis impairment. *Hypertension* [Internet]. 2010 [citado 15 Dez 2020];55(3):738–46. Disponível em:

<https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.141903>

70. Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2001 [citado 15 Dez 2020];41:851-76. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11264479/>
71. Sayed-Ahmed MM, Khattab MM, Gad MZ, Osman A-MM. Increased plasma endothelin-1 and cardiac nitric oxide during doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2001 [citado 15 Dez 2020];89(3):140-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11589785/>
72. Love MP, McMurray JJV. Endothelin in chronic heart failure: current position and future prospects. *Cardiovasc Res* [Internet]. 1996 [citado 15 Dez 2020];31(5):655-74. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8763394/>
73. Risdon S, Meyer G, Marziou A, Riva C, Roustit M, Walther G. Artificial sweeteners impair endothelial vascular reactivity: preliminary results in rodents. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* [Internet]. 2020 [citado 15 Dez 2020];30(5):843-6. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32278610/>
74. Kundu N, Domingues CC, Patel J, Aljishi M, Ahmadi N, Fakhri M, et al. Sucralose promotes accumulation of reactive oxygen species (ROS) and adipogenesis in mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2020 [citado 15 Dez 2020];11(1):250. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32586409/>
75. Heredia-García G, Gómez-Oliván LM, Orozco-Hernández JM, Luja-Mondragón M, Islas-Flores H, SanJuan-Reyes N, et al. Alterations to DNA, apoptosis and oxidative damage induced by sucralose in blood cells of *Cyprinus carpio*. *Sci Total Environ* [Internet]. 2019 [citado 15 Dez 2020];692:411-21. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31351285/>
76. Ahmad SY, Friel JK, MacKay DS. Effect of sucralose and aspartame on glucose metabolism and gut hormones. *Nutr Rev* [Internet]. 2020 [citado 15 Dez 2020];78(9):725-46. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32065635/>
77. Romo-Romo A, Aguilar-Salinas CA, Brito-Córdova GX, Gómez-Díaz RA, Almeda-Valdes P. Sucralose decreases insulin sensitivity in healthy subjects: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2018;108(3):485-91.

78. Tennant DR. Estimation of exposures to non-nutritive sweeteners from consumption of tabletop sweetener products: a review. *Food Addit Contam - Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2019;36(3):359-65.
79. Geraldo APG, Pinto-e-Silva MEM. Nonnutritive sweeteners in brazil: current use and associated factors. *J Hum Growth Development.* 2016;26(3):297-306.