



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

MARINA GAIATO MONTE

**Influência da suplementação do ácido graxo ômega 3 na atenuação
da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em ratos: papel da
via da ceramida**

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

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu
2021

MARINA GAIATO MONTE

Influência da suplementação do ácido graxo ômega 3 na atenuação da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em ratos: papel da via da ceramida

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

Orientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

**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

Monte, Marina Gaiato.

Influência da suplementação do ácido graxo ômega 3 na
atenuação da cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina em
ratos : papel da via da ceramida / Marina Gaiato Monte. -
Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Bertha Furlan Polegato
Capes: 40101002

1. Estresse oxidativo. 2. Cardiotoxicidade.
3. Doxorubicina. 4. Esfingomielinas. 5. Ácidos graxos Ômega-3.

Palavras-chave: Ácidos graxos ômega 3; Cardiotoxicidade
crônica; Doxorubicina; Esfingomielinas; Estresse oxidativo.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

O período de maior ganho em
conhecimento e experiência é o
período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Jorge Luiz e Maria Zenaide, pelo apoio e amor incondicional proporcionado a mim. Vocês são meu exemplo de caráter e força. Serei eternamente grata!

Ao André, meu parceiro de jornada pessoal. Você se tornou meu aconchego nos dias difíceis e transformou os ventos fortes em brisas suaves.

Aos meus irmãos, Guilherme e Gustavo, pelo elo inquebrável que formamos desde nossa infância.

À minha cunhada, Daiane, pelo carinho e atenção sempre. E por, junto ao Gui, me dar a felicidade de conhecer o Lucas. Irei sempre interceder por você, meu afilhado.

Aos meus avós paternos, Afonso (*in memoriam*) e Ermelinda (*in memoriam*), os quais sempre sentirei vontade de ter conhecido.

Aos meus avós maternos, José Natal (*in memoriam*) e Thereza de Jesus, por terem participado da minha educação, pela fé em Deus e na vida, e pelo amor depositado em mim.

Aos meus tios e primos pelo amor e união que mantemos em nosso círculo.

Às minhas amigas, Débora C. Spirandelli, Thais C. P. dos Santos, Thainara Ferla, Daiane Ribeiro, Nayane M. Vieira e Julia Souto, vocês são especiais para mim.

Amo muito vocês!

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

À minha orientadora, **Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato**, por ter sido tão presente em cada etapa da minha jornada até aqui. Por acreditar na minha capacidade e por ter me ensinado tanto. Você é meu exemplo de humanidade e profissionalismo. Obrigada por lapidar minhas asas e me permitir alçar voos mais altos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da minha bolsa de mestrado (processo nº 2018/25677-7).

Aos docentes do grupo Remodelação Cardíaca e Nutrição (RECAN), Prof. Dr. Leonardo A. M. Zornoff, Prof. Dr. Marcos F. Minicucci, Profa. Dra. Paula S. A. Gaiolla e, em especial, Prof. Dr. Sergio A. R. de Paiva, integrante da banca do meu exame geral de qualificação, pela contribuição no desenvolvimento desse estudo.

À Profa Dra. Silméia G. Z. Bazan e Prof. Dr. Katashi Okoshi pela colaboração na análise do ecocardiograma.

Ao professor Luis Fernando Barbisan pela parceria no desenvolvimento da análise do cometa alcalino e pela contribuição no exame geral de qualificação.

Às minhas ex-professoras e amigas, Natália B. Cunha e Maria Angélica M. L. Rezende, vocês me guiaram até aqui.

Ao meu amigo de graduação e pós-graduação, Anderson S. Fujimori, pela indicação à Bertha e pelos ensinamentos no laboratório.

Aos integrantes e ex-integrantes do RECAN, em especial, Nara A. Costa, Amanda G. Pereira, Ana Paula Dantas, Matheus A. Callegari, Mariana Dorna e Bárbara C. Damasceno pela parceria e amizade que desenvolvemos durante esse tempo. Vocês foram essenciais para realização desse estudo.

Aos funcionários da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), em especial, Paulo C. Geogerte, José C. Georgete, Isabela Santos e Sara R. S. Sampaio pelo suporte e amizade desenvolvida.

Aos funcionários da pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

Muito obrigada!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
HIPÓTESE.....	24
OBJETIVO	26
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS	38
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS	60

Lista de tabelas

Tabela 1. Peso dos órgãos e tecidos dos animais	40
Tabela 2. Variáveis estruturais cardíacas	41
Tabela 3. Frequência cardíaca e variáveis ecocardiográficas funcionais.....	42
Tabela 4. Medida da pressão intraventricular esquerda e derivadas pressão-tempo	43
Tabela 5. Dosagens bioquímicas	44
Tabela 6. Ensaio do cometa alcalino.....	45
Tabela 7. Marcadores do dano oxidativo	46
Tabela 8. Expressão de proteínas no coração dos animais.....	48

Lista de figuras

Figura 1. Representação do delineamento do estudo	30
Figura 2. Escore para análise de imuno-histoquímica no coração dos animais.....	37
Figura 3. Consumo de ração e evolução de peso corporal	39
Figura 4. Atividade da enzima nSMase no soro e no tecido cardíaco.....	44
Figura 5. Representação do ensaio cometa por grupo de animais.....	45
Figura 6. Quantificação de MDA e carbonilação de proteínas no coração dos animais	46
Figura 7. Representação das espécies reativas de oxigênio por grupo de animais	47
Figura 8. Expressão das proteínas por western blot no coração dos animais	48
Figura 9. Marcação da nSMase por imuno-histoquímica por grupos de animais	49

Lista de quadros

Quadro 1. Composição do ácido graxo ômega 3	29
---	----

RESUMO

Introdução: a cardiotoxicidade é o efeito colateral mais grave do tratamento com o quimioterápico doxorrubicina. A identificação dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da cardiotoxicidade permite a descoberta de estratégias de atenuação dessa complicação. As ceramidas são formadas a partir da degradação dos esfingolipídeos das membranas celulares e tem importante papel na sinalização e modulação de processos biológicos, incluindo estresse oxidativo. Há evidências que a administração de ácidos graxos ômega 3 possa atuar junto às membranas e interferir com essa via de dano celular. **Objetivo:** avaliar a influência da suplementação de ácidos graxos ômega 3 na atenuação da cardiotoxicidade crônica induzida pela doxorrubicina em ratos. Adicionalmente, avaliamos o envolvimento da via da ceramida na patofisiologia da lesão cardíaca e no possível efeito protetor dos ácidos graxos ômega 3. **Material e Métodos:** 60 ratos Wistar machos foram alocados em 4 grupos: Controle (C), Doxorrubicina (D), Ômega 3 (W), Doxorrubicina + Ômega 3 (DW). Os grupos receberam ácidos graxos ômega 3 (400 mg/kg/dia, via gavagem) ou água por 6 semanas e doxorrubicina (3,5 mg/kg, intraperitoneal, 1x/semana) ou salina por 4 semanas. Ao final de 6 semanas, foi realizado ecocardiograma e eutanásia para coleta do material biológico. Foram avaliadas a atividade da enzima esfingomielinase (SMase), as concentrações séricas de lipídeos e creatinina, ensaio Cometa, estresse oxidativo, nSMase1 por imuno-histoquímica e determinação da expressão de nSMase1 (esfingomielinase neutra 1) e I κ B (inibidor do fator kappa B) por Western Blot. Análise estatística: ANOVA de 2 vias. **Resultados:** houve menor ingestão de ração e perda de peso nos animais que receberam doxorrubicina. Nos animais tratados com o quimioterápico observamos aumento do átrio esquerdo e o ventrículo esquerdo (VE), dos triglicerídeos e colesterol séricos, do malonaldeído (marcador do dano oxidativo aos lipídeos), da carbonilação de proteínas (marcador do dano oxidativo às proteínas), diminuição da fração de encurtamento do VE e menor expressão da enzima nSMase1 no coração. A suplementação de ômega 3 atenuou as alterações estruturais e funcionais provocadas pela doxorrubicina e diminuiu a carbonilação de proteínas. O ômega 3 também diminuiu a intensidade e o momento da cauda no ensaio cometa e aumentou a atividade da nSMase neutra tanto nos animais que receberam quanto nos que não receberam a doxorrubicina. **Conclusão:** a suplementação de ácido graxo ômega 3 atenuou a cardiotoxicidade crônica provocada pela doxorrubicina em ratos. Possivelmente, a via da ceramida está envolvida na fisiopatologia da cardiotoxicidade, mas não é o mecanismo pelo qual o ácido graxo ômega 3 atenuou a disfunção cardíaca.

Palavras-chave: Estresse Oxidativo; Esfingomielinas; Dislipidemia; Doxorrubicina; Cardiotoxicidade crônica; Ácidos graxos ômega 3.

ABSTRACT

Introduction: cardiotoxicity is the most serious side effect of treatment with the chemotherapy drug doxorubicin. The identification of mechanisms involved in the pathophysiology of cardiotoxicity allows the discovery of mitigation strategies for this complication. Ceramides are formed from the degradation of sphingolipids in cell membranes and play an important role in signaling and modulating biological processes, including oxidative stress. There is evidence that the administration of omega 3 fatty acids can act with the membranes and interfere with this cellular damage pathway. **Objective:** To evaluate the influence of omega 3 fatty acid supplementation in the attenuation of chronic cardiotoxicity induced by doxorubicin in rats. Additionally, we evaluated the involvement of the ceramide pathway in the pathophysiology of cardiac injury and the possible protective effect of omega 3 fatty acids. **Material and Methods:** 60 male Wistar rats were divided into 4 groups: Control (C), Doxorubicin (D), Omega 3 (W), Doxorubicin + Omega 3 (DW). The groups received omega 3 fatty acids (400 mg/kg/day, via gavage) or water for 6 weeks and doxorubicin (3.5 mg/kg, intraperitoneally, 1x/week) or saline for 4 weeks. At the end of 6 weeks, an echocardiogram and euthanasia were performed to collect the biological material. The activity of the sphingomyelinase enzyme (SMase), serum concentrations of lipids and creatinine, Comet assay, oxidative stress, nSMase1 were evaluated by immunohistochemistry and determination of the expression of nSMase1 (neutral sphingomyelinase 1) and I κ B (inhibitor of kappa factor B) by Western Blot. Statistical analysis: 2-way ANOVA. **Results:** there was less feed intake and weight loss in animals that received doxorubicin. In animals treated with chemotherapy, we observed an increase in the left atrium and left ventricle (LV), serum triglycerides and cholesterol, malonaldehyde (a marker of oxidative damage to lipids), protein carbonylation (a marker of oxidative damage to proteins), a decrease of the LV shortening fraction and lower expression of the nSMase1 enzyme in the heart. Omega 3 supplementation attenuated the structural and functional changes caused by doxorubicin and decreased protein carbonylation. Omega 3 also decreased the intensity and moment of the tail in the comet assay and increased the neutral nSMase activity in both animals that received and those that did not receive doxorubicin. **Conclusion:** Omega 3 fatty acid supplementation attenuated chronic cardiotoxicity caused by doxorubicin in rats. Possibly, the ceramide pathway is involved in the pathophysiology of cardiotoxicity, but it is not the mechanism by which omega 3 fatty acid attenuated cardiac dysfunction.

Keywords: Oxidative stress; Sphingomyelin; Dyslipidemia; Doxorubicin; Chronic cardiotoxicity; Omega 3 fatty acids.

INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as neoplasias foram responsáveis por quase 10 milhões de mortes no mundo em 2020 (1). São vistos muitos avanços na terapêutica oncológica, que cursam com melhora da qualidade de vida e aumento da sobrevida dos pacientes (2). Entretanto, as doenças cardiovasculares nos pacientes com câncer têm se demonstrado mais frequentes, devido, principalmente, aos efeitos colaterais advindos de terapêuticas como a quimioterapia (3).

A doxorubicina é um quimioterápico da classe das antraciclinas, extraído do fungo *Streptomyces peucetius*, amplamente utilizado para o tratamento de neoplasias malignas desde 1969, incluindo tumores sólidos, leucemias e linfomas (4,5). O efeito antitumoral é atribuído à interação da droga com o DNA celular, por meio da ligação e consequente inibição das enzimas topoisomerase 2, cuja função é reajustar a dupla hélice durante os processos de replicação e transcrição, levando à morte da célula neoplásica (6).

Embora seja altamente efetiva contra o câncer, a ação da doxorubicina não se limita às células neoplásicas. Estudos têm sugerido que os complexos resultantes da agressão do quimioterápico às enzimas topoisomerase 2 (top 2 α / top 2 β), são os agentes causadores do efeito colateral mais grave da droga, a cardiotoxicidade (7). Essa complicação ocorre em 5 a 26% dos pacientes a depender da dose administrada, levando a alterações no tratamento quimioterápico, que podem limitar sua efetividade, ou até mesmo, sua interrupção. Atualmente, o limite de dose para uso clínico da doxorubicina é de 450 mg/m² de superfície corporal (8).

A cardiotoxicidade pode ocorrer de forma aguda, subaguda, crônica ou tardia. A toxicidade aguda é considerada rara, ocorrendo em menos de 1% dos pacientes e manifesta-se, predominantemente, com arritmias supraventriculares, disfunção transitória do ventrículo esquerdo e alterações eletrocardiográficas inespecíficas (ECG), que se desenvolvem logo após a infusão da droga (dois a três dias). Já a toxicidade crônica ou tardia se manifesta meses ou anos após a conclusão do tratamento quimioterápico e se apresenta como cardiomiopatia dilatada e hipocinesia ventricular, levando à insuficiência cardíaca, sendo a forma mais frequentes de cardiotoxicidade e com repercussões clínicas mais importantes. (9,10). A presença de insuficiência cardíaca não só interfere com o prognóstico desses pacientes, como também diminui a qualidade de vida do paciente e leva a relevantes limitações das atividades habituais da vida diária.

A cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina foi identificada logo após o início de sua utilização na prática clínica, contudo, apesar dos esforços para detectar os fatores de risco, desenvolver derivados menos tóxicos e identificar a toxicidade subclínica precocemente, ainda não há uma abordagem clara para prevenir ou tratar adequadamente essa grave complicação (8). Por isso, a busca por estratégias de prevenção se faz necessária, sendo que para isso o entendimento da sua patofisiologia é fundamental.

Mesmo após 40 anos de pesquisa, os mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina ainda não foram completamente elucidados (11). Atualmente, diversos estudos têm destacado o papel do estresse oxidativo no mecanismo de lesão da toxicidade. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) durante o metabolismo da droga, associadas à baixa concentração miocárdica de enzimas antioxidantes, podem favorecer o dano ao tecido cardíaco. (12,13).

Existem diversas vias progenitoras de espécies reativas já identificadas na cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina, com destaque para a lesão e disfunção mitocondrial induzida por essa droga. A lesão mitocondrial é favorecida pela elevada quantidade de cardiolipina presente nas membranas mitocondriais e à sua elevada afinidade pela doxorubicina, resultando na diminuição da atividade dos complexos enzimáticos, interrupção da cadeia transportadora de elétrons e acúmulo de elétrons desemparelhados, aumentando, assim, a formação de EROs, além de diminuir a produção de ATP (adenosina trifosfato) (14). Outra via de formação de espécies reativas é por meio da ligação da doxorubicina com o domínio redutase da enzima óxido nítrico sintase, sendo essa uma via produtora de ERNs (3).

O aumento do estresse oxidativo está intimamente ligado a apoptose. A mitocôndria, principal sítio formador de EROs, é também importante reguladora da apoptose, uma vez que é responsável pela liberação de citocromo c e ativação da via das caspases. Assim, a administração de doxorubicina, além de aumentar o estresse oxidativo, também aumenta as taxas de apoptose no miocárdio (15), interferindo na expressão de Bcl-2 e Bax, proteínas relacionadas à sobrevivência e morte celular (16), inibe a serina/treonina quinase (Akt), proteína citosólica que fornece sinal antiapoptótico (17) e ativa caspase-3, conhecida indutora de apoptose (18).

Apesar do conhecimento da participação do estresse oxidativo na fisiopatologia da cardiotoxicidade, observamos insucesso dos estudos clínicos em demonstrar efeito

cardioprotetor dos antioxidantes neste contexto. Sendo assim, compreender outros mecanismos moleculares envolvidos na cardiotoxicidade se faz necessário para investigar possíveis estratégias de prevenção (19).

As membranas celulares são responsáveis pela manutenção da integridade celular, controlam o fluxo de substâncias entre o interior e exterior da célula e alojam uma infinidade de receptores que regulam todos os processos biológicos celulares (20). São constituídas de colesterol, esfingolipídeos e outros fosfolipídeos. O principal esfingolipídeo da membrana é a esfingomielina. O ciclo da esfingomielina é dependente das atividades das esfingomielinases (SMases) – família de enzimas conhecidas como esfingomielinase ácida (aSMase), esfingomielinase alcalina (alcSMase) e esfingomielinases neutras (nSMases) –, que, quando ativadas, convertem a esfingomielina à ceramida (21,22).

As SMases são ativadas por uma grande variedade de estímulos, como radiação, agentes infecciosos (vírus, bactérias e parasitas), citocinas inflamatórias (Interleucina-1 β , fator de necrose tumoral- α), aumento do estresse oxidativo e quimioterápicos, como a doxorubicina (23, 24). Por sua vez, a ceramida e demais metabólitos formados (ceramida-1-fosfato, glicosilceramida e esfingosina-1-fosfato) são importantes mediadores intracelulares na regulação da inflamação, apoptose, proliferação, diferenciação celular e também estão envolvidos na homeostase oxidativa (25).

O aumento do estresse oxidativo celular induzido pela ceramida está relacionado com ativação da NADPH oxidase, disfunção mitocondrial e diminuição das enzimas antioxidantes (26). Outra via interessante possivelmente envolvida no papel deletério das ceramidas, mas ainda controversa, é a via que envolve a ativação do NF- κ B (fator nuclear kappa B) mediada por TNF (fator de necrose tumoral). A ceramida induziria ativação do receptor TNF-R55, degradação do fator I κ B, inibidor do NF- κ B, e permitiria a ativação do NF- κ B. No entanto alguns estudos posteriores não conseguiram associar a sinalização via TNF com a ativação de NF- κ B (23).

Em relação a apoptose, a ceramida é capaz de ativar a catepsina D, que é um gatilho para desencadeamento de lesão e morte mitocondrial e liberação de citocromo c. Também parece desregular a função de proteínas da família Bcl-2, que previnem a formação de poros mitocondriais e a consequente liberação de citocromo c (26) além de aumentar Bax, relacionada a aumento de formação de poros mitocondriais e aumento da apoptose (23). A lesão mitocondrial causada pela ceramida contribui para

o aumento do estresse oxidativo, como já citado anteriormente, e contribui para formação de um ciclo vicioso de lesão celular.

O ácido graxo ômega 3 é um conjunto de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPLs), cuja nomenclatura deriva da primeira instauração (ligação dupla) da molécula, que ocorre entre o terceiro e o quarto carbono ao contar do grupo metilo terminal. Os principais ácidos graxos do conjunto são o ácido alfa-linolênico (ALA 18:3), ácido eicosapentanóico (EPA 20:5) e ácido docosahexaenóico (DHA 22:6) (27). O ALA está presente em nozes, sementes (linhaça e chia) e óleos vegetais (soja, azeite e canola), enquanto o EPA e o DHA podem ser obtidos por meio do consumo de peixes oleosos e frutos do mar. Entretanto, peixes selvagens apresentam concentrações mais elevadas de ácidos graxos essenciais quando comparados aos peixes cultivados e alimentados com grãos, pois a presença desses ácidos graxos está diretamente relacionada ao consumo de fitoplâncton e algas marinhas (28,29). Mesmo o ALA sendo precursor de EPA e DHA, todos são considerados ácidos graxos essenciais (adquiridos pela dieta), pois o nível dessa conversão é menor que 5% no organismo humano (30).

Sabe-se que os ácidos graxos ômega 3 constituem os fosfolípidios da membrana celular, que podem ser retirados e utilizados como substrato para formação de eicosanoides anti-inflamatórios pelas vias lipoxigenase e ciclooxigenase. Da mesma forma, os ácidos graxos ômega 6 e o ácido araquidônico (AA 20:4), por exemplo, são utilizados como substratos para formação de eicosanoides pró-inflamatórios. Apesar de competirem pelas vias enzimáticas de conversão, o ácido graxo ômega 3 possui maior afinidade quando comparado ao ácido graxo ômega 6. Por isso, é indicado o consumo de ácidos graxos ômega 6 e 3 na proporção 3:1, respectivamente. Atualmente, nas dietas ocidentais, o consumo excessivo de ácidos graxos essenciais pró-inflamatórios e deficiência na ingestão de ácidos graxos essenciais anti-inflamatórios pode se relacionar ao aumento de inflamação mesmo entre indivíduos saudáveis (31,32).

Alguns estudos observaram efeitos benéficos associando o consumo alimentar de ácidos graxos ômega 3 e a diminuição de complicações relacionadas às doenças cardiovasculares, como prevenção de arritmias, diminuição da agregação plaquetária, atenuação da placa aterosclerótica, melhora do relaxamento vascular, menor variabilidade da frequência cardíaca diurna (preditor de morte súbita), normalização de triglicerídeos plasmáticos e da pressão arterial. Esses efeitos podem ser explicados

por modulação de função proteica de vias sinalizadoras e modificações na expressão gênica, entretanto o papel que os ácidos graxos ômega 3 desempenham no organismo ainda não são totalmente compreendidos (33,34,35,36,37,38). Nesse contexto, a relação do ácido graxo ômega 3 e da ceramida permanece por ser elucidada.

Há alguma evidência que o ácido graxo ômega 3 poderia atuar na regulação da via da ceramida. Em cultura de células, a exposição ao DHA, antagonizou o efeito do TNF- α , atuando na diminuição do estresse oxidativo e na formação de ceramidas (39). Junfei et al. (2018), verificaram que o DHA inibiu o efeito sinérgico de lipopolissacarídeo e ácido palmítico na expressão genica pró-inflamatória, devido diminuição da atividade transcricional do NF- κ B, estimulou a expressão gênica de IL-10 (anti-inflamatória) e inibiu a produção de ceramidas na via de síntese de ceramida *de novo* (40).

Outro estudo suplementou ácido graxo ômega 3 (EPA e DHA) em camundongos inférteis devido ao defeito da espermatogênese de esfingomielina sintase 1, a qual restaurou a espermatogênese e a fertilidade em 50% dos mutantes previamente inférteis (41). Kasbi-Chadli et al. (2015) observaram que a suplementação de ácido ômega 3 em hamsters reduziu a esfingosina, esfinganina e ceramidas no fígado e no músculo, aumentou a tolerância à glicose, diminuiu a secreção hepática de triglicerídeos e expressão hepática de TNF α (42).

Dong et al. (2017), estudaram o efeito da suplementação de ácido ômega 3 na esteatose hepática induzida por hiper-homocisteinemia em camundongos, mostrando que após seis semanas de tratamento, houve a diminuição na produção de metabólitos relacionados à ceramida, decorrente da menor expressão dos genes de síntese de ceramida, serina palmitoiltransferase subunidade 3 de base de cadeia longa (Sptlc3) e Delta (4)-desaturase, esfingolipídeo 2 (Degs2) e assim, menor acúmulo de lipídios hepáticos (43).

Em relação à atenuação da cardiotoxicidade, alguns estudos já avaliaram o efeito da suplementação de ácido graxo ômega 3 na prevenção da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina. No modelo *in vitro* de cultura de células tratadas com o quimioterápico e expostas ao DHA, houve diminuição da expressão proteica de TNF- α , IL-1 β (interleucina 1 β) e IL-6 (interleucina 6), além de ser observado inibição da ativação da via do NF- κ B, por diminuição da expressão de I κ B- α e NF- κ B/p65 (44). No modelo de cardiotoxicidade aguda *in vivo* utilizando ratos, a administração de ômega

3 diminuiu a concentração de malondialdeído (MDA), um marcador do dano lipídico, além de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes glutathione peroxidase e superóxido dismutase (15).

No entanto, em revisão recente e ampla sobre o tema, os autores mostraram que os resultados dos estudos relacionados à administração de ácido graxo ômega 3 na cardiotoxicidade são ainda bastante díspares, sendo que há estudos que mostram piora da cardiotoxicidade com a suplementação de ácido graxo ômega 3 (45). Até o presente momento, não identificamos nenhum estudo que avaliou a relação das vias da ceramida com o possível efeito cardioprotetor do ácido graxo ômega 3.

Interessantemente, além da perspectiva de atenuar a cardiotoxicidade, a suplementação de ácido graxo ômega 3 poderia constituir estratégia para prevenção e até mesmo tratamento adjuvante contra o câncer. O ácido graxo ômega 3 teria a habilidade de modificar a estrutura química e as propriedades físicas das membranas plasmáticas, o que poderia modular importantes vias de sinalização do desenvolvimento tumoral. Além disso, a incorporação do ácido graxo ômega 3 nas membranas celulares e fosfolípidos mitocondriais poderia sensibilizar a célula tumoral às EROs, uma vez que é sabido que os produtos da peroxidação lipídica interferem diretamente com a síntese de DNA, crescimento celular e índice de morte da célula tumoral (45).

HIPÓTESE

Diante do exposto, elaboramos a hipótese que a suplementação de ácido graxo ômega 3 pode atenuar a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em ratos por sua atuação junto aos lipídeos das membranas e na via da ceramida.

OBJETIVO

Avaliar a influência da suplementação de ácido graxo ômega 3 na atenuação da cardiotoxicidade crônica induzida pela doxorrubicina em ratos. Adicionalmente, avaliamos o envolvimento da via da ceramida na fisiopatologia da lesão cardíaca e no possível efeito protetor do ácido graxo ômega 3.

MATERIAL E MÉTODOS

Cálculo do tamanho amostral

O número de animais necessários para este estudo foi determinado por cálculo do tamanho amostral utilizando programa SigmaPlot 12.0. Foi considerada a fração de encurtamento do ventrículo esquerdo, com resultados obtidos em estudo prévio. Considerando a existência de 4 grupos, uma diferença das médias de 0,09, desvio-padrão de 0,06, poder do teste de 0,90 e erro alfa de 0,05, obtivemos o resultado de 14 animais por grupo. A mortalidade durante tratamento crônico com a doxorrubicina variou de 10 a 20% de acordo com estudo prévio de nosso grupo (dados ainda não publicados), por isso foi acrescentado dois animais nos grupos que receberam doxorrubicina no delineamento experimental, sendo n=16 nesses grupos.

Ácido graxo ômega 3

O ácido graxo ômega 3 comercial utilizado nesse estudo foi o da marca Essential Nutrition® e é constituído por EPA (ácido eicosapentaenoico), DHA (ácido docosahexaenoico), vitamina E (dl-alfa-tocopherol) e outros ácidos graxos. As concentrações das substâncias estão descritas no quadro 1.

Quadro 1. Composição do ácido graxo ômega 3

Composição Ácidos Graxos Ômega 3	Quantidade em 1 g do produto
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	360 mg
Ácido docosahexaenoico (DHA)	240 mg
Outros ácidos graxos	350 mg
DI-alfa-tocopherol (vitamina E)	1,6 mg

Fonte: Essential Nutrition. Informações descritas no rótulo do produto.

Delineamento experimental

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp previamente à sua realização (CEUA 1295/2019). Foram utilizados 60 ratos Wistar machos, com peso aproximado de 300g, que ficaram alocados em caixas coletivas (41x34x17,8 cm), com 2 animais por caixa, em ambiente enriquecido com tubos de PVC e papel toalha amassado, com temperatura controlada (25°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas.

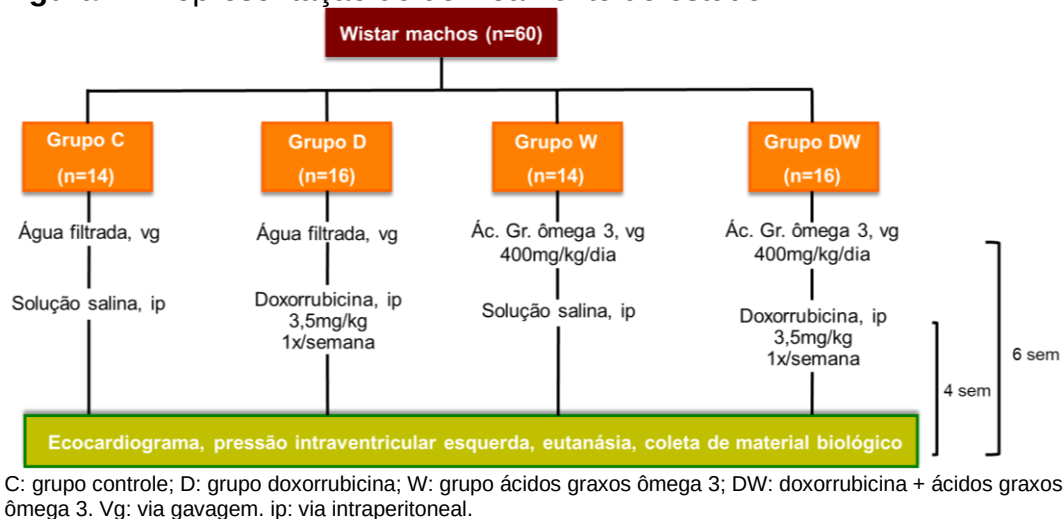
Os animais receberam água e ração comercial padrão à vontade durante todo o experimento. O peso e a ingestão de ração foram mensurados semanalmente. Os animais foram alocados em 4 grupos: C (controle; n=14), W (administração de ácidos

graxos ômega 3; n=14), D (administração de doxorrubicina; n=16) e DW (administração de doxorrubicina e ácidos graxos ômega 3; n=16). A diferença entre o número inicial de animais nos grupos se deve ao fato da possibilidade de perdas de animais nos grupos tratados com doxorrubicina. Os animais dos grupos W e DW receberam durante 6 semanas 400mg/kg por dia de ácidos graxos ômega 3, via gavagem. Já os animais dos grupos C e D receberam água filtrada via gavagem, em volume e frequência equivalente aos grupos W e DW.

Após 2 semanas do início da suplementação de ômega 3, iniciou-se a administração de doxorrubicina nos grupos D e DW, por meio de injeção intraperitoneal (ip) de doxorrubicina 3,5mg/kg uma vez por semana, durante 4 semanas, chegando à dose cumulativa de 14mg/kg. Os animais dos grupos C e W receberam injeção de salina em volume e frequência equivalente aos demais grupos. A suplementação de ácidos ômegas 3 foi mantida durante todo o período de administração de doxorrubicina.

Ao final de 6 semanas, todos os animais foram submetidos ao ecocardiograma e à medida da pressão intraventricular esquerda. A seguir, foram submetidos à eutanásia, que foi realizada com dose excessiva de tiopental (120mg/kg, ip) seguida de decapitação com guilhotina para coleta do sangue (método secundário de eutanásia). O sangue foi coletado e armazenado para análises posteriores. O fígado, rins e coração foram pesados e armazenados a -80°C até o momento das análises bioquímicas. O pulmão foi pesado e desprezado em seguida. A figura 1 ilustra de maneira resumida o delineamento experimental acima descrito.

Figura 1. Representação do delineamento do estudo



Ecocardiograma

Para a realização do ecocardiograma, os ratos receberam anestesia leve com quetamina (50 mg/kg, ip) xilazina (10 mg/kg, ip), tiveram a região anterior do tórax tricotomizada e foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. O exame foi realizado utilizando o equipamento Vivid S6 (General Electric Medical Systems), com transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz. Todos os exames foram feitos pelo mesmo examinador que desconhecia os grupos dos animais.

As variáveis estruturais do coração foram obtidas por análise bidimensional, com o transdutor em posição paraesternal, eixo menor. As variáveis mensuradas foram: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo (EDPP) e do septo interventricular (EDSIV); diâmetro diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do ventrículo esquerdo (VE), da aorta e do átrio esquerdo. A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula $[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$, sendo 1,04 a densidade específica do miocárdio. Já o índice de MVE (IMVE) é resultante da MVE dividida pelo peso corporal.

As variáveis funcionais foram mensuradas com o auxílio do doppler tissular. A função sistólica do VE foi verificada pela fração de encurtamento miocárdico $[(DDVE - DSVE) / DDVE]$, fração de ejeção do VE $[(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3]$ e deslocamento sistólico (S'). Já a função diastólica, foi avaliada pelo pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E), pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e tempo de desaceleração da onda E (TDE). Em complemento, foram observados o deslocamento sistólico (S'), diastólico inicial (E') e tardio (A') do anel mitral na parede lateral e septal. Ainda, foi calculada a relação E/A, tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca e relação E/E'.

Medida invasiva da pressão intraventricular esquerda

Para a realização da medida invasiva da pressão intraventricular esquerda, o animal foi posicionado em decúbito dorsal e realizada punção transcutânea na linha hemiclavicular, no rebordo costal esquerdo, utilizando agulha 21G, na inclinação de 15 graus, direcionada para fúrcula. Um cateter heparinizado foi acoplado a essa agulha e ligado ao polígrafo (Windograf, GOULD, Ohio, USA) para registro da pressão sistólica, da pressão diastólica e das derivadas pressão-tempo positiva e negativa (+dP/dt e -dP/dt), que se relacionam à função sistólica e diastólica, respectivamente.

Atividade das enzimas esfingomielinases neutras

A atividade das enzimas nSMases foi avaliada no soro e no coração dos animais, por kit comercial ensaio *Amplex Red* (Amplex™ Red Sphingomyelinase Assay Kit, cat. nº A12220; Invitrogen). Para análise, as amostras de soro foram diluídas em água pura na concentração [1:2] e as amostras de coração (50mg de tecido ventricular esquerdo) foram homogeneizadas com 500 µl de tampão de extração (NaCl 1M, Triton 1%, Deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, Tris base, PIC 1%, Orvanadato de sódio 1%, NaF 1M-1%), cujos homogenatos foram utilizados para quantificação da atividade enzimática. O ensaio permitiu analisar a atividade enzimática pela conversão da fosfo-colina gerada pela esfingomielinase em colina com fosfatase alcalina, e colina tobetaína e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) com colina oxidase. H₂O₂ mais horseradish peroxidase age para oxidar o Amplex Red não fluorescente para resofurina fluorescente. A análise foi realizada de acordo com as instruções do fabricante (46).

Dosagens Bioquímicas

Foram dosadas as concentrações séricas de colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicérides (TG) e creatinina dos animais. Utilizando kit comercial, o CT, HDL e TG foram quantificados por método enzimático calorimétrico (Bioclin, Minas Gerais, BR) e a creatinina por método cinético calorimétrico (Bioclin, Minas Gerais, BR).

Ensaio do cometa alcalino

Para o ensaio do cometa, foram coletados 5 µL de sangue do plexo periorbital dos animais utilizando um tubo microcapilar, quatro horas após a última administração da doxorubicina. As amostras foram homogeneizadas em 100 µL agarose de baixo ponto de fusão, colocadas em lâminas previamente recobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%), cobertas com lamínulas e conservadas a 4°C por, no mínimo, 5 minutos para a solidificação da agarose. Após, as lamínulas foram removidas e as lâminas mergulhadas em solução de lise recém-preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10; Triton X-100 a 1% e DMSO a 10%). Depois, as lâminas foram transferidas para cuba horizontal de eletroforese contendo tampão alcalino gelado (1mM EDTA e 300 mM NaOH, pH>13). A eletroforese foi feita a 25 V e 300 mA por 30 minutos. Ao término, as lâminas foram colocadas em solução de

neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5). A ausência de exposição direta à luz foi necessária durante os processos. Para a análise, as lâminas foram coradas com solução 1:10,000 de SYBR GOLD (Life Technologies, EUA) sendo necessário 80 µl por lâmina. Os “nucleóides” foram visualizados em microscópio de fluorescência (Olympus BX60, EUA) acoplado ao sistema de análise de imagem *Comet Assay IV* (Perceptive Instruments, Reino Unido). Foram analisados 50 nucleóides por lâmina, sendo considerados como parâmetros para avaliação a intensidade de DNA na “cauda” do cometa (*Tail Intensity*) e o produto do DNA na “cauda” pela distância média da migração da cauda (*Tail Moment*).

Análise de estresse oxidativo

Peroxidação lipídica no coração

A peroxidação lipídica foi determinada pela concentração de MDA (malondialdeído) no tecido cardíaco dos animais, pelo método TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances) descrito por Flemming Nielse et al. (1997). Para quantificação, foram diluídos 200 µl de sobrenadante do homogenato de cada amostra com 500 µl de solução (TBA 0,67%, TCA 10%, HCl 0,25 N) e centrifugados por 5 minutos a 10000 rpm. Após, as amostras foram incubadas, em banho maria, com água fervente (aproximadamente 100 °C) por 45 minutos e, posteriormente, transferidas para microplaca (200 µl). A leitura foi realizada a 532 nm e 600 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA). Os resultados foram expressos como concentração de MDA-TBA2 [µmol/L] corrigida por miligrama (mg) de proteína (47).

Carbonilação de proteínas no coração

A carbonilação foi analisada pelo método adaptado de Mesquita et al. (2014). Foi quantificada em 100 µl de sobrenadante de tecido cardíaco para 100 µl 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (10 mM em HCl 2 M). As amostras foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente, depois foram adicionados 50 µl de NaOH (6 M) e incubadas por mais 10 minutos em temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em leitor de microplaca Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, EUA) e o resultado obtido da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar (22000 M⁻¹ cm⁻¹). O resultado final foi expresso em nmol/mg de proteínas (48).

Análise das espécies reativas *in situ* no coração

A determinação da produção *in situ* de espécies reativas de oxigênio no coração foi realizada por imunofluorescência, utilizando dihidroetídio (DHE; Sigma). Cortes seccionais do ventrículo esquerdo foram coletados no momento da eutanásia, incubados em formol e, posteriormente, em bloco de parafina até o momento das análises. Foram utilizados cortes de 5 μ m, cuja parafina foi retirada e as lâminas reidratadas com xilol e álcool etílico. Os cortes foram circulados com a caneta PAP Pen (Biotium Super HT PAP Pen) e incubados em DHE e WGA (aglutinina de germe de trigo) diluídos em tampão fosfato-salino (PBS) por 30 minutos em temperatura de 37°C. A seguir, foram lavados 3 vezes com PBS e incubado o DAPI (6-diamidino-2-fenilindol) por 5 minutos. Os cortes foram novamente lavados com PBS e secos para fixação das lamínulas com agarose. As imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX51, com câmera DP72 e software cell) no aumento de 40x e analisadas no programa ImageJ (National Institutes of Health).

Determinação de expressão proteica por Western blot

A técnica de Western blot foi utilizada para quantificar a expressão proteica das proteínas nSMase, p-IKB e IKB no tecido cardíaco. O método foi constituído das seguintes etapas:

- Extração: amostras do VE (50 mg) foram homogeneizadas com 500 μ l de tampão de extração (NaCl 1M, Triton 1%, Deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, Tris base, PIC 1%, Orvanadato de sódio 1%, NaF 1M-1%) no equipamento Bullet Blender Standard® (disrupt or homogenize cells and tissue BBX24, made in EUA), durante 5 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 4°C e 12.000 rpm. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C. Para a quantificação da concentração proteica de cada amostra, foi realizado o método de Bradford utilizando a curva padrão de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).
- Eletroforese em gel: após a quantificação da concentração de proteína, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris – HCL 240mM, SDS 0,8%, glicerol 40%, azul debromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e aquecidas a 100°C por 5 min. Posteriormente, as amostras (contendo 30 μ g de proteína total) foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de

resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4°C. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 5% e a concentração do gel de resolução variou de 10 a 15%, de acordo com o peso molecular da proteína determinada. Em um dos poços de cada gel foi pipetado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e nos demais poços foram pipetadas as amostras de todos os grupos 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, EUA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

- Transferência e Bloqueio: após a corrida, os géis foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) 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% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 60 min à temperatura ambiente sob constante agitação.

- Incubação com os Anticorpos e análise: após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos em solução de 3% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), dissolvido em solução basal pH 8,0. 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% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), dissolvido em solução basal pH 8,0. As membranas permaneceram incubadas por 90 min, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando mmobilon® Classico Western HRP Substrate (Millipore, made in the EUA). As imagens foram fotografadas no ImageQuant™ LAS 4000, GE Healthcare. 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 Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EUA).

Anticorpos primários utilizados:

- GAPDH, mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-32233), diluição [1:10000];
- nSMase, rabbit monoclonal (Abcam plc, Inc, Massachusetts, EUA, ab131330), diluição [1:500];
- IκB total, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-1643), diluição [1:200]
- p-IκB, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-8404), diluição [1:200]

Anticorpos secundários utilizados:

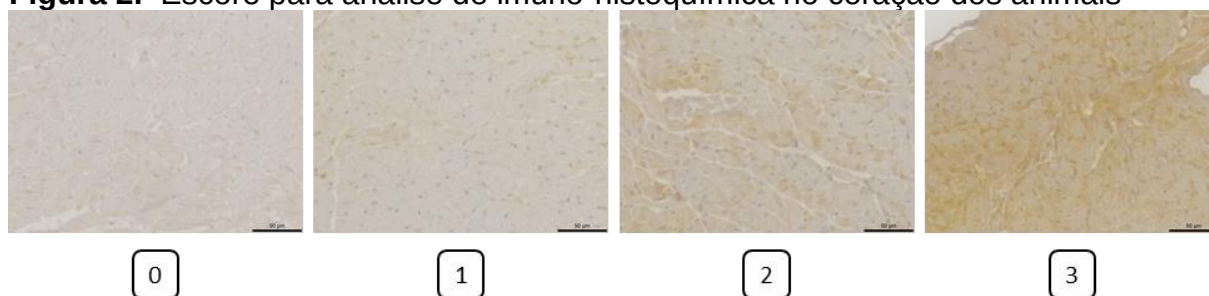
- Anti-mouse goat IgG-HRP (Boster, Valley Ave, Pleasanton, Califórnia, BA1050), diluição [1:10000] para GAPDH e [1:1000] para IκB total e p-IκB;
- Anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc-2357), diluição [1:1000] para nSMase.

Análise esfingomielinase neutra por imuno-histoquímica

A análise foi realizada para marcar a nSMase no coração dos animais. Para isso, foram obtidos cortes seccionais do ventrículo esquerdo a partir de 5 mm do ápice do ventrículo, que foram incubados em formol e, posteriormente, em bloco de parafina até o momento das análises. Foram utilizados cortes de 5 µm, cuja parafina foi retirada e as lâminas reidratadas usando xilol e álcool etílico. Foi realizada a recuperação antigênica utilizando tampão citrato pH 6,0 em panela de pressão por 20 min. Após, as lâminas foram lavadas em água destilada e os cortes foram contornados com a caneta PAP Pen (Biotium Super HT PAP Pen) já secos. Foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena (Hydrogen Peroxide Block, Spring Bioscience, Pleasanton, Califórnia) por 30 minutos em temperatura ambiente e depois, os cortes foram lavados três vezes com tampão PBS. A seguir, foi realizado o bloqueio de proteína (Protein Block, Spring Bioscience, Pleasanton, Califórnia) por 30 minutos em temperatura ambiente e, após, foi realizada a incubação do anticorpo primário overnight em geladeira (4°C). As lâminas foram lavadas três vezes com tampão PBS para incubação do anticorpo secundário (anti-mouse and –rabbit primary antibodies, Histofine® Simple Stain MAX PO, Tokyo, Japão) que foi por 30 minutos em temperatura ambiente. Foram realizadas mais três lavagens com tampão PBS, incubado por cinco minutos o

cromógeno DAB (diaminobenzidina, Scytek Laboratories, Logan, Utah, EUA) e lavadas novamente. Por fim, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina e a desidratação das lâminas em álcool e xilol. As imagens foram capturadas no aumento de 40x no microscópio LEICA DMLB acoplado à câmera DFC 295 e software LAS 4.2. A análise das imagens foi feita por três observadores, que desconheciam os grupos, utilizando escore de 0 a 3 referente a presença de marcações, sendo: 0 ausência de marcação; 1 pouca presença de marcação; 2 presença de marcação; 3 muita presença de marcação. O escore pode ser visto na figura 2.

Figura 2. Escore para análise de imuno-histoquímica no coração dos animais



Cortes histológicos do coração dos animais utilizando técnica de imuno-histoquímica. Escore: 0: ausência de marcação. 1: pouca presença de marcação. 2: presença de marcação. 3: muito presença de marcação. Imagens no aumento de 40x.

Análise estatística

As variáveis com distribuição normal foram apresentadas em média $\pm$ desvio-padrão. As variáveis com distribuição não normal foram submetidas à transformação matemática para normalização e apresentadas em média $\pm$ desvio-padrão. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguida de pós-teste de *Holm-Sidak*. As variáveis com distribuição não normal que após as tentativas de transformações matemáticas não passaram no teste de normalidade, foram analisadas por *test t* ou *Mann-Whitney* e realizada a correção do valor de *p* por *Bonferroni*. Quando houve interação entre os fatores (doxorrubicina e ácidos graxos ômega 3) foram analisadas as comparações grupo a grupo. Quando não houve interação entre os fatores, foram apresentados os dados marginais (efeito isolado da doxorrubicina ou do ácido graxo ômega 3). A análise qualitativa da imuno-histoquímica foi avaliada pelo teste qui-quadrado. Para todas as análises foi considerada significância estatística de 5%.

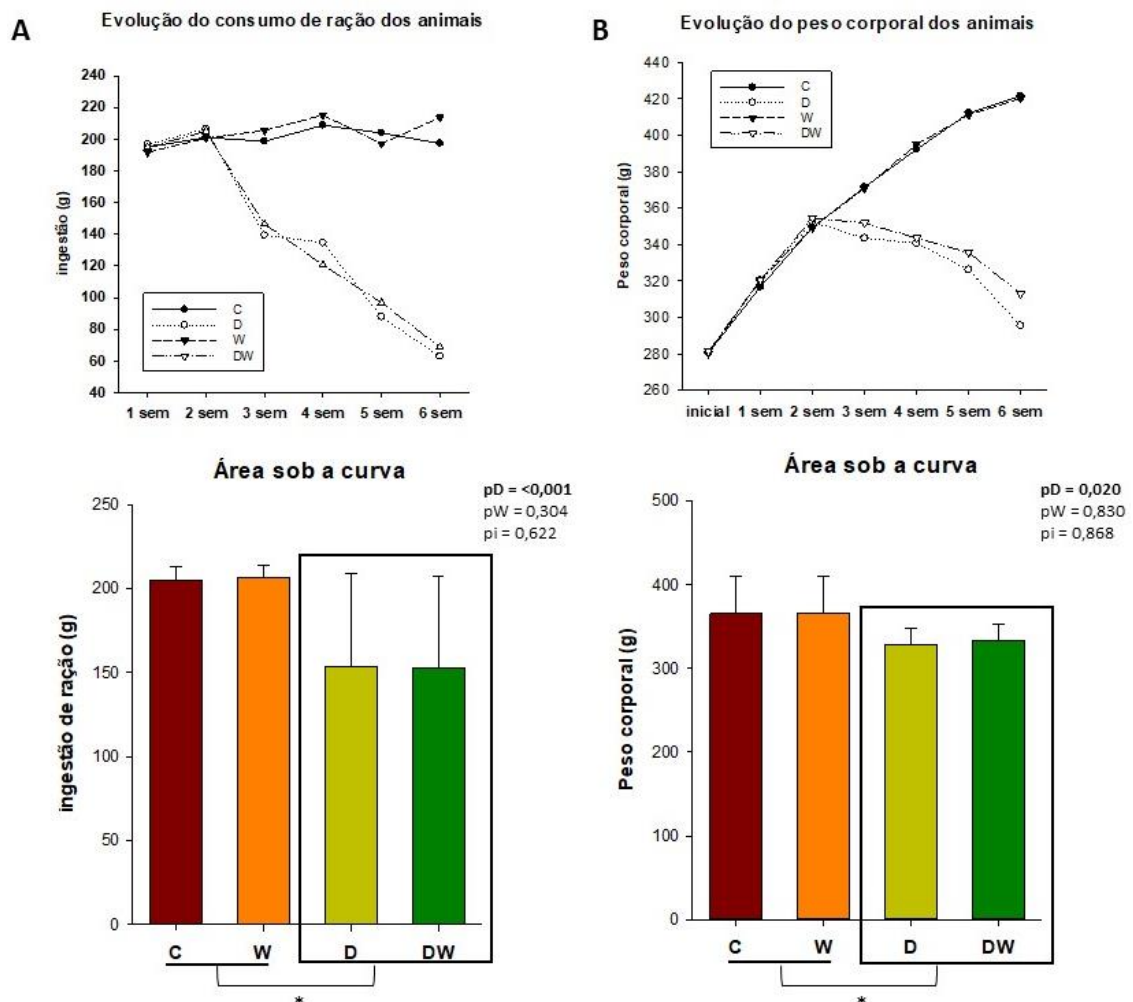
RESULTADOS

Durante o experimento, houve perda de um animal do grupo D e um animal do grupo DW. O animal do grupo D foi a óbito após anestesia para realização do ecocardiograma, e o animal do grupo DW foi a óbito após a terceira dose de doxorrubicina.

Consumo de ração, evolução de peso e peso dos órgãos dos animais

Inicialmente, todos os animais apresentaram comportamento semelhante na evolução de peso e consumo de ração. Entretanto, vimos que os animais tratados com doxorrubicina obtiveram perda de peso e redução do apetite ao longo do experimento. Esse comportamento está representado na figura 3.

Figura 3. Consumo de ração e evolução de peso corporal



Painel A: evolução de peso corporal durante as seis semanas de experimento. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão ou mediana. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. * animais tratados com doxorrubicina foram diferentes estatisticamente dos animais que não receberam o quimioterápico, portanto, pD < 0,05. **Painel B:** consumo de ração dos animais durante as seis semanas de experimento. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. * animais tratados com doxorrubicina foram diferentes estatisticamente dos animais que não receberam o quimioterápico, portanto, pD < 0,05.

Na Tabela 1 podemos verificar que o peso do fígado e do pulmão corrigidos pelo peso corporal dos animais foram maiores nos animais tratados com doxorrubicina do que nos animais que não receberam o quimioterápico. Já o ventrículo esquerdo e direito apresentaram-se mais leves nos animais tratados com doxorrubicina do que nos animais não tratados com a droga, porém não observamos diferenças tanto no peso do ventrículo esquerdo quanto do ventrículo direito quando esses foram normalizados pelo peso corporal dos animais.

Tabela 1. Peso dos órgãos e tecidos dos animais

Órgãos	C (n = 14)	D (n = 15)	W (n = 14)	DW (n = 15)	pD	pW	pi
Fígado (g) *	14,0 ± 1,24	11,7 ± 2,81	14,3 ± 1,49	13,1 ± 1,25	0,005	0,275	0,045
Fígado/peso*	32,7(32,1-34,9)	39,3 ± 5,81	34,0 ± 2,24	42,1 ± 4,07	<0,001	0,141	0,069
Rim D (g) *	1,44 ± 0,11	1,10 (0,97-1,40)	1,35 ± 0,14	1,20 (1,11-1,37)	0,013	0,061	0,601
Rim D/peso *	3,52 ± 0,38	4,41 (3,59-5,21)	3,24 ± 0,20	3,88 (3,60-4,23)	0,030	0,027	0,372
Rim E (g)*	1,47 (1,30-1,61)	1,12 (0,97-1,39)	1,38 (1,17-1,45)	1,23 (1,11-1,43)	0,018	0,170	0,340
Rim E/peso *	3,48 (3,35-3,60)	4,39 (3,57-5,17)	3,15 (3,05-3,37)	3,83 (3,68-4,41)	0,036	0,022	0,479
Pulmão (g) *	1,97 (1,81-2,31)	1,61 (1,53-1,94)	1,87 (1,78-2,13)	1,59 (1,46-1,87)	0,014	0,909	0,561
Pulmão/peso	4,94 ± 0,91	6,14 ± 1,52	4,90 ± 1,13	5,69 ± 1,93	0,006	0,307	0,574
VE (g)	0,81 ± 0,78	0,57 ± 0,09	0,79 ± 0,10	0,57 ± 0,07	<0,001	0,695	0,696
VE/peso *	1,89 ± 2,01	1,95 ± 0,24	1,88 ± 0,21	1,83 ± 0,17	0,810	0,265	0,087
VD (g)	0,26 ± 0,05	0,16 ± 0,05	0,26 ± 0,10	0,17 ± 0,03	<0,001	0,392	0,171
VD/peso *	0,58 (0,55-0,67)	0,49 (0,45-0,63)	0,54 (0,51-0,70)	0,53 (0,49-0,60)	0,025	0,161	0,369

C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3; D: direito; E: esquerdo; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (1º-3º quartil). Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. *Variáveis com distribuição não normal foram analisadas por teste-t ou Mann-Whitney; nessa situação, foi considerado p<0,008 como significância estatística, segundo correção de Bonferroni.

Ecocardiograma

Ao ecocardiograma, observamos aumento da massa do ventrículo esquerdo e do índice de massa do ventrículo esquerdo nos animais tratados com doxorrubicina. Também houve aumento do diâmetro da aorta corrigido pelo peso corporal, do diâmetro do átrio esquerdo, do diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal, do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo nos animais que receberam doxorrubicina. Interessantemente, a administração de ácidos graxos ômega associada à doxorrubicina melhorou o diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo corrigidos pelo peso corporal e

o diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal e pelo diâmetro da aorta (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis estruturais cardíacas

Variáveis estruturais	C (n=14)	D (n=15)	W (n=14)	DW (n=15)	pD	pW	pi
EDPP (mm) *	1,40 (1,29-1,50)	1,21 (1,13-1,45)	1,44 (1,25-1,53)	1,45 (1,16-1,50)	0,159	0,543	0,559
EDSIV (mm) *	1,34 (1,26-1,50)	1,21 (1,13-1,53)	1,40 (1,26-1,54)	1,50 (1,16-1,53)	0,639	0,620	0,818
DSVE (mm)	3,17 ± 0,90	3,91 ± 0,67	3,34 ± 0,83	3,32 ± 0,72	0,040	0,377	0,055
DSVE/peso	7,50 ± 1,82	13,5 ± 2,71	7,94 ± 1,82 %	10,6 ± 2,17 % #	<0,001	0,043	0,006
DDVE (mm)	7,23 ± 0,92	7,26 ± 0,67	7,44 ± 0,67	7,06 ± 0,60	0,368	0,984	0,290
DDVE/peso	17,2 ± 1,85	25,0 ± 3,90 &	17,8 ± 1,47	22,7 ± 2,24 % #	<0,001	0,354	0,046
Massa VE (g)	0,66 ± 0,11	0,61 ± 0,09	0,68 ± 0,08	0,61 ± 0,13	0,024	0,644	0,608
IMVE (g/kg)	1,56 ± 0,25	2,10 ± 0,43	1,63 ± 0,20	1,94 ± 0,39	<0,001	0,751	0,183
AE (mm)	4,96 ± 0,50	5,18 ± 0,30	5,16 ± 0,63	4,75 ± 0,37 % #	0,448	0,347	0,013
AE/peso	11,8 ± 1,03	17,9 ± 3,00 &	12,3 ± 1,49	15,3 ± 1,50 % #	<0,001	0,083	0,004
Ao (mm)	3,78 ± 0,15	3,58 ± 0,23	3,77 ± 0,20	3,75 ± 0,20	0,044	0,111	0,091
Ao/peso	9,02 ± 0,67	12,3 ± 1,64	9,02 ± 0,64	12,1 ± 1,21	<0,001	0,752	0,747
AE/Ao	1,31 ± 0,11	1,45 ± 0,11 &	1,36 ± 0,11	1,27 ± 0,11 % #	0,467	0,028	<0,001

C: grupo controle; D: grupo doxorubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorubicina + ácidos graxos ômega 3. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (1º-3º quartil). EDPP: espessura diastólica da parede posterior; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (VE); DDVE: diâmetro diastólico do VE; IMVE: índice de massa do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Ao: diâmetro da aorta. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. *Variáveis com distribuição não normal, foram analisadas por teste-t ou Mann-Whitney; nessa situação, foi considerado p<0,008 como significância estatística, segundo correção de Bonferroni. &: p <0,05 quando comparado com grupo controle (C). %: p <0,05 quando comparado com grupo doxorubicina (D). # p<0,05 quando comparado com grupo ácidos graxos ômega 3 (W).

Na análise das variáveis funcionais diastólicas (Tabela 3), a doxorubicina foi capaz de diminuir a onda E, prolongar o tempo de desaceleração (TDE) desta e o tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo (TRIV), mesmo quando corrigido pela frequência cardíaca (TRIV-c), evidenciando prejuízo da função diastólica. No entanto, quando ácidos graxos ômega 3 foram administrados junto com a doxorubicina, observamos melhora da onda E quando comparado ao grupo que recebeu apenas o medicamento, indicando melhora discreta da função diastólica.

Quanto às variáveis funcionais sistólicas (Tabela 3), os grupos tratados com o quimioterápico mostraram piora em todos os parâmetros avaliados: onda S', fração de ejeção do ventrículo esquerdo e fração de encurtamento do ventrículo esquerdo. Porém, o grupo de tratamento associado (DW) apresentou melhora na fração de encurtamento quando comparado com o grupo D e valores de fração de encurtamento semelhantes ao grupo C, indicando atenuação importante da disfunção sistólica causada pela doxorrubicina.

Tabela 3. Frequência cardíaca e variáveis ecocardiográficas funcionais

Variáveis funcionais	C (n=14)	D (n=15)	W (n=14)	DW (n=15)	pD	pW	pi
FC (bpm)	324,21±57,31	253,53±53,85	292,93±47,08	275,67±77,35	0,007	0,774	0,097
E (cm/s)	89,73±10,12	66,14±12,73 &	86,04±8,89	74,62±13,3 % #	<0,001	0,402	0,036
A (cm/s) *	60,68±14,50	44,0 (29,0-72,0)	55,29±12,11	49,98±13,33	0,336	0,148	0,747
E/A *	1,52 (1,30-1,73)	1,42 (0,78-2,41)	1,61±0,30	1,57±0,35	0,556	0,566	0,357
TDE (ms) *	46,5 ± 2,17	50,0 (39,5-60,5)	48,00±4,57	49,80±6,56	0,644	0,139	0,950
TRIV (ms) *	23(22-26)	35,5±8,75	24 (22-26)	29,1±5,71	<0,001	0,481	0,012
TRIVc *	55,34±4,99	71,37±14,76	54,75±6,90	61,18±12,70	<0,001	0,398	0,026
E'm (cm/s) *	4,87(3,74-6,54)	3,87±0,80	4,96±1,31	4,90±1,29	0,027	0,836	0,012
A'm (cm/s)*	3,80 ± 0,10	3,90 (3,55-5,3)	3,94±0,58	3,73±0,59	0,356	0,215	0,220
E/E' média *	18,6±3,76	17,6±4,43	18,0(14,7-21,8)	14,5(13,2-20,2)	0,264	0,765	0,369
E'/A' média	1,33±0,33	0,99±0,42	1,28±0,35	1,33±0,36	0,157	0,155	0,057
FEVE *	0,93 (0,93-0,90)	0,84±0,06	0,93 (0,85-0,94)	0,89±0,05	<0,001	0,890	0,01
FENC	0,57±0,07	0,46±0,07 &	0,56±0,08	0,53±0,08 %	0,002	0,164	0,046
S'm (cm/s) *	4,95 (3,54-5,95)	3,05 (2,75-4,65)	4,57 (3,47-5,85)	3,20 (2,95-5,30)	0,014	0,679	0,337

C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. FC: frequência cardíaca; onda E: obtida pelo fluxo transmitral precoce do enchimento ventricular; onda A: obtida pelo fluxo transmitral tardio do enchimento ventricular; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo; TRIVc: TRIV corrigido pela FC; E'm: média da onda E' lateral e septal, obtidas pelo doppler tissular; A': média da onda A' lateral e septal obtidas pelo doppler tissular; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; FENC: fração de encurtamento do ventrículo esquerdo; S'm: média da onda S' lateral e septal, obtida pelo doppler tissular durante a sístole do ventrículo esquerdo. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (1º-3º quartil). Valor. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. *Variáveis com distribuição não normal, foram analisadas por teste-t ou Mann-Whitney; nessa situação, foi considerado p<0,008 como significância estatística, segundo correção de Bonferroni. &: p <0,05 quando comparado com grupo controle (C). %: p <0,05 quando comparado com grupo doxorrubicina (D).

Medida da pressão intraventricular esquerda

Segundo os dados obtidos nas aferições de pressão intraventricular (Tabela 4), a administração de doxorrubicina alterou a pressão sistólica (PS) e diastólica (Pd2), como também, a derivada pressão-tempo positiva (+ Dp/dt) que está diretamente ligada a função sistólica. Não foi observado qualquer efeito do tratamento com ácidos graxos ômega 3 nessas variáveis.

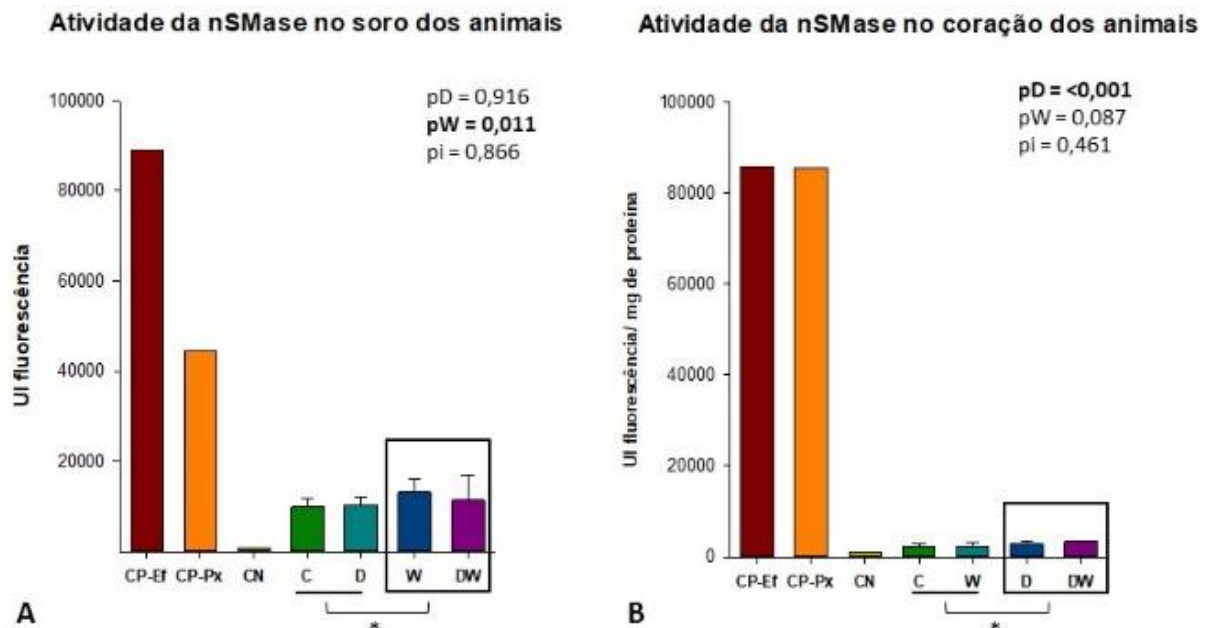
Tabela 4. Medida da pressão intraventricular esquerda e derivadas pressão-tempo

Variáveis	C (n = 14)	D (n = 15)	W (n = 14)	DW (n = 15)	pD	pW	pi
PS (mmHg)	124,0 ± 20,7	102,8 ± 15,5	117,3 ± 9,53	102,6 ± 18,7	0,011	0,604	0,615
Pd2 (mmHg)	9,92 ± 2,08	8,91 ± 3,75	10,12 ± 3,54	5,18 ± 2,94	0,049	0,227	0,180
+ dP/dt (mmHg/s)	6078 ± 1165	4165 ± 1145	5930 ± 943,9	5115 ± 1240	0,006	0,378	0,232
- dP/dt (mmHg/s)	2819 ± 532,8	2388 ± 458,4	3468 ± 850,7	2737 ± 1023	0,085	0,135	0,644

C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. PS: pressão sistólica; Pd2: pressão diastólica final do ventrículo esquerdo; +dP/dt: derivada positiva pressão-tempo; -dP/dt: derivada negativa pressão-tempo. Dados expressos em média ± desvio padrão. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores.

Atividade das esfingomielinases neutras

Na análise da atividade das nSMases por meio do estudo *Amplex Red®* observamos que no soro dos animais, a suplementação de ácidos graxos ômega aumentou a atividade da enzima, tanto em animais saudáveis como em animais tratados com doxorrubicina, quando comparada aos animais que não receberam os ácidos graxos ômega 3 (C: 10727 ± 1922; D: 10767 ± 2059; W: 13305 ± 3433; DW: 13257 ± 4506 unidades de fluorescência. pD=0,916; pW=0,011; pi=0,866). No tecido cardíaco, observamos aumento da atividade da enzima nos animais que receberam doxorrubicina independentemente da administração do ácido graxo ômega 3 (C: 2283 ± 412; D: 2879 ± 680; W: 2461 ± 639; DW: 3319 ± 284 unidades de fluorescência corrigidas por miligrama de proteína. pD=<0,001; pW=0,087; pi=0,461). Os resultados podem ser vistos na figura 5.

Figura 4. Atividade da enzima nSMase no soro e no tecido cardíaco

Painel A: atividade da nSMase no soro. CP-Ef: controle positivo para a esfingomielinase; CP-Px: controle positivo para a peroxidase; CN: controle negativo; C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. *Animais tratados com ácidos graxos ômega 3 foram diferentes estatisticamente dos animais que não o receberam, portanto, pW <0,05. **Painel B:** atividade da nSMase no tecido cardíaco. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. *Animais tratados com doxorrubicina foram diferentes estatisticamente dos animais que não receberam o quimioterápico, portanto, pD <0,05.

Dosagens bioquímicas

Foram quantificadas as concentrações séricas de colesterol total, HDL colesterol e triglicérides no soro dos animais. De acordo com os resultados encontrados, pudemos observar que a administração de doxorrubicina levou a aumento das concentrações séricas de todas as variáveis de perfil lipídico e a administração de ácido graxos ômega 3 não teve qualquer efeito no perfil lipídico. Não vimos diferença estatística na dosagem de creatinina no soro dos animais (tabela 5).

Tabela 5. Dosagens bioquímicas

Variáveis (mg/dL)	C (n = 14)	D (n = 15)	W (n = 14)	DW (n = 15)	pD	pW	pi
Colesterol total	60,0 ± 7,72	188 ± 108	58,8 ± 12,2	251 ± 76,8	<0,001	0,372	0,088
HDL-colesterol	27,3 ± 3,37	45,1 ± 17,8	27,2 ± 5,15	55,9 ± 18,0	<0,001	0,241	0,200
Triglicérides	124 ± 33,0	350 ± 253	118 ± 53,0	601 ± 375	<0,001	0,170	0,050
Creatinina *	0,35 (0,32-0,06)	0,27 (0,06-0,33)	0,38 (0,07-0,02)	0,00 (0,00-0,08)	0,015	0,615	0,019

C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. Dados expressos em média ± desvio padrão ou mediana (1º-3º quartil). Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. * Variável com distribuição não normal foi avaliada por Mann-Whitney nessa situação. Nesse caso, foi considerado p<0,008 como significância estatística, segundo correção de Bonferroni.

Ensaio do cometa alcalino para avaliação do dano ao DNA periférico

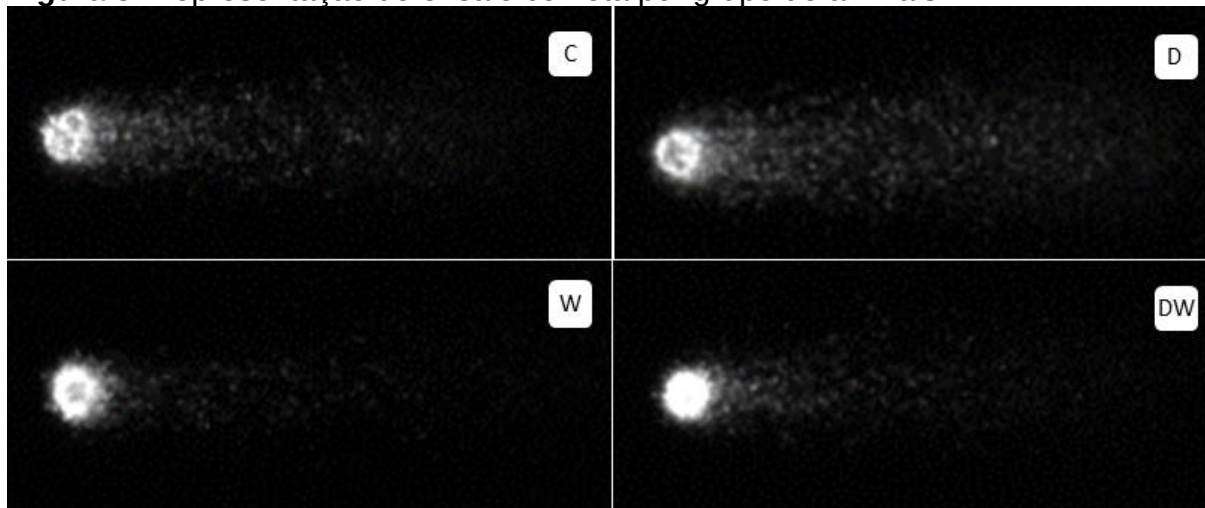
De acordo com as variáveis analisadas pelo ensaio cometa (Tabela 6), verificamos que os animais tratados com ácidos graxos ômega 3 (grupos W e DW) apresentaram menor intensidade e momento da cauda do que os grupos não suplementados (grupo C e D). Isso indica que a suplementação de ácidos graxos ômega 3 diminuiu o dano ao DNA das células periféricas desses animais. Imagens representativas da análise podem ser observadas na figura 5.

Tabela 6. Ensaio do cometa alcalino

Variáveis	C (n = 14)	D (n = 15)	W (n = 14)	DW (n = 15)	Pd	pW	pi
Intensidade da cauda	42,72 ± 16,53	52,66 ± 11,75	35,50 ± 13,26	36,08 ± 14,15	0,709	0,037	0,790
Momento da cauda	36,72 ± 22,83	52,94 ± 15,36	25,64 ± 15,33	26,97 ± 19,05	0,398	0,017	0,510

C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. Dados expressos em média ± desvio padrão. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores.

Figura 5. Representação do ensaio cometa por grupo de animais



Imagens do ensaio cometa capturadas em microscópio de fluorescência no aumento de 40x. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3.

Análise do estresse oxidativo

Ao estresse oxidativo no coração, vimos que os animais tratados com doxorrubicina mostraram aumento da produção de subproduto da peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA), quando comparados aos animais que não receberam o quimioterápico. Entretanto, observamos diminuição da carbonilação de proteínas no

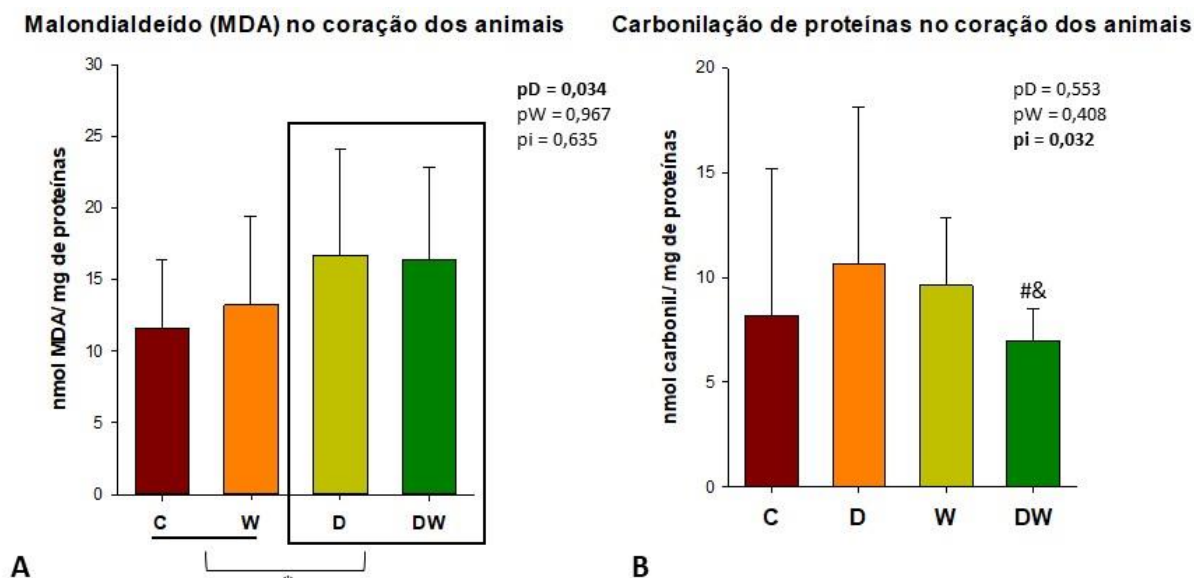
grupo com tratamento associado (DW) quando comparado aos grupos D e W. Resultados apresentados na tabela 7 e figura 6.

Tabela 7. Marcadores do dano oxidativo

Variáveis (nmol/mg proteína)	C (n = 6)	D (n = 10)	W (n = 9)	DW (n = 8)	pD	pW	pi
MDA	12,13 ± 4,27	17,82 ± 6,23	13,06 ± 6,32	16,72 ± 6,12	0,034	0,967	0,635
Carbonilação total	9,95 ± 5,61	12,27 ± 5,87	10,28 ± 2,59	7,15 ± 1,37 ^{#&}	0,553	0,408	0,032

C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. Dados expressos em média ± desvio padrão. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. #: p <0,05 quando comparado com grupo D. &: p <0,05 quando comparado com grupo W.

Figura 6. Quantificação de MDA e proteínas carboniladas no coração dos animais



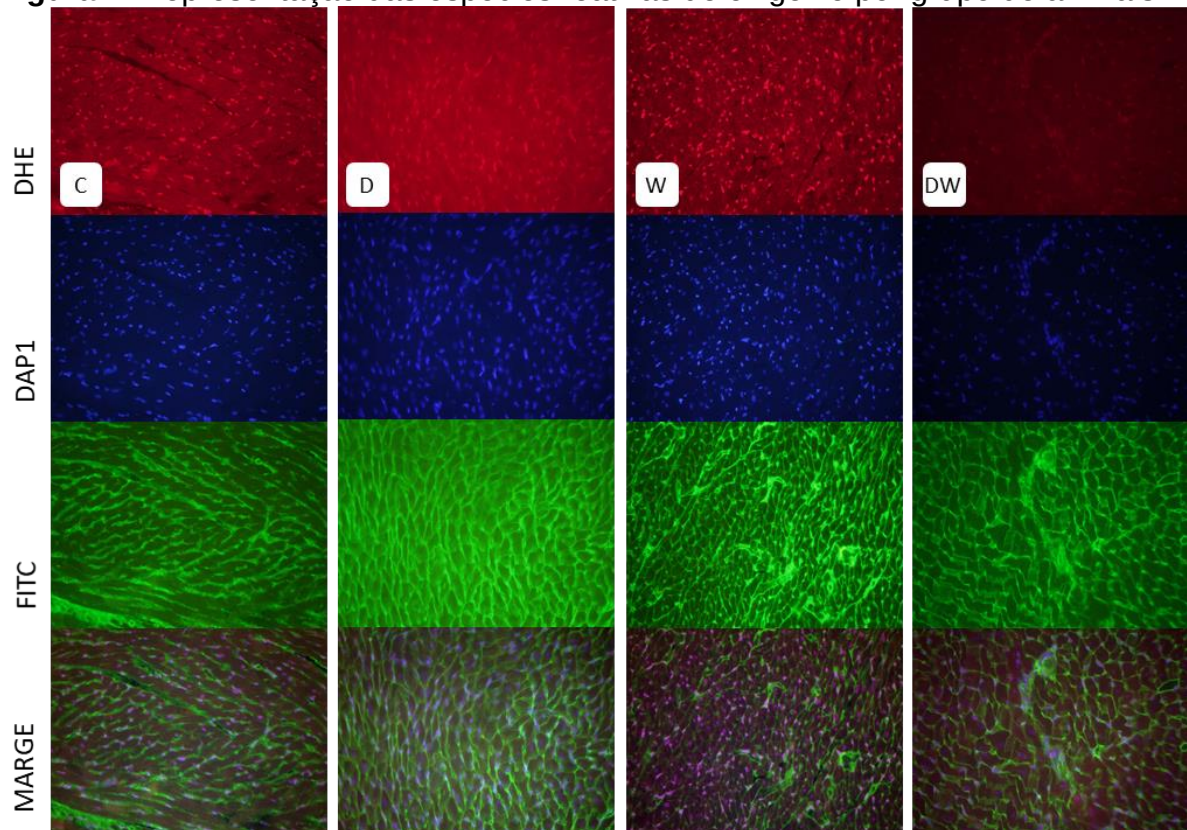
Painel A: quantificação de MDA no tecido cardíaco. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. Dados expressos em média ± desvio padrão. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. * Animais tratados com doxorrubicina foram diferentes estatisticamente dos animais que não receberam o quimioterápico, portanto, pD <0,05.

Painel B: quantificação de carbonilação de proteínas no tecido cardíaco. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. #: p <0,05 quando comparado com grupo D. &: p <0,05 quando comparado com grupo W.

Determinação das espécies reativas *in situ*

Na análise para determinação da produção *in situ* de espécies reativas de oxigênio no coração, observamos que não houve diferença entre os grupos (C: 35650 ± 10973; D: 35973 ± 11619; W: 37587 ± 9617; DW: 25271 ± 4659 UA. pD=0,093; pW=0,214; pi=0,077). Os resultados podem ser vistos na figura 7.

Figura 7. Representação das espécies reativas de oxigênio por grupo de animais



Realizadas em microscópio de fluorescência no aumento de 40x. DHE: dihidroetídio para marcação dos ânions de superóxido. DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol para marcação dos DNAs. FITC: fluoresceína para marcação das membranas. MARGE 2: DHE + DAPI + FITC. C: grupo controle (n=10); D: grupo doxorubicina (n=10); W: grupo ácidos graxos ômega 3 (n=10); DW: doxorubicina + ácidos graxos ômega 3 (n=10).

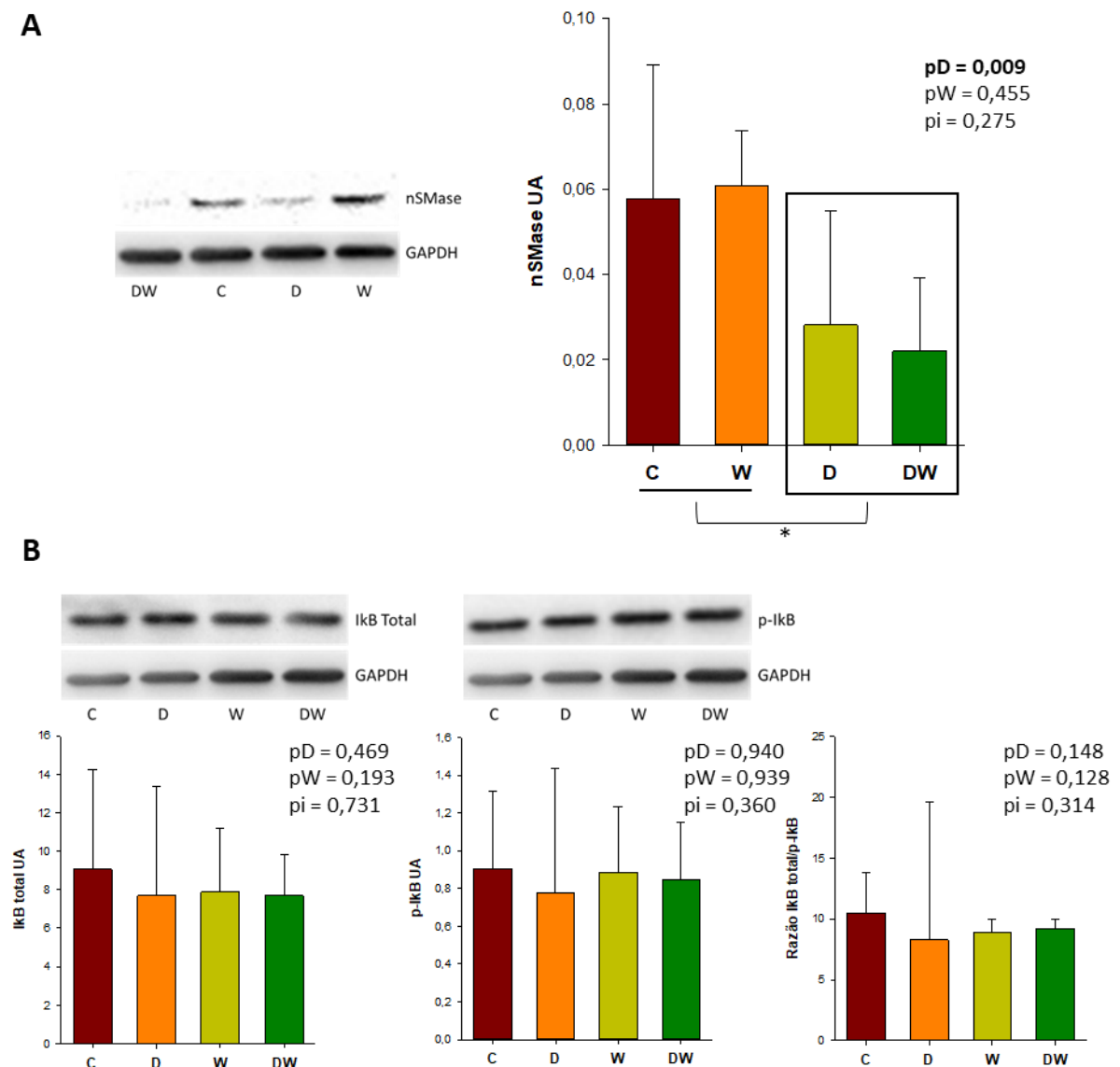
Determinação da expressão proteica por Western Blot

Foram determinadas as expressões das proteínas nSMase e I κ B no coração dos animais. Vimos que a nSMase teve menor expressão nos animais tratados com doxorubicina em comparação aos animais saudáveis (grupo C e W). Não observamos diferença estatisticamente significativa na quantificação das proteínas I κ B total e p-I κ B, bem como na razão entre elas. Os dados estão apresentados na tabela 8 e figura 8.

Tabela 8. Expressão de proteínas no coração dos animais

	C (n = 9)	D (n = 9)	W (n = 7)	DW (n = 10)	pD	pW	pi
nSMase	0,055 ± 0,034	0,035 ± 0,020	0,052 ± 0,022	0,024 ± 0,015	0,009	0,455	0,275
IκB Total	10,10 ± 4,153	9,121 ± 4,231	8,219 ± 2,960	7,614 ± 2,177	0,469	0,193	0,731
p-IκB	0,933 ± 0,383	0,959 ± 0,476	0,927 ± 0,305	0,897 ± 0,251	0,940	0,939	0,936
IκB Total / p-IκB	11,164 ± 2,622	11,184 ± 8,468	8,816 ± 1,184	8,612 ± 1,369	0,148	0,128	0,314

C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. Dados expressos em média ± desvio padrão. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores.

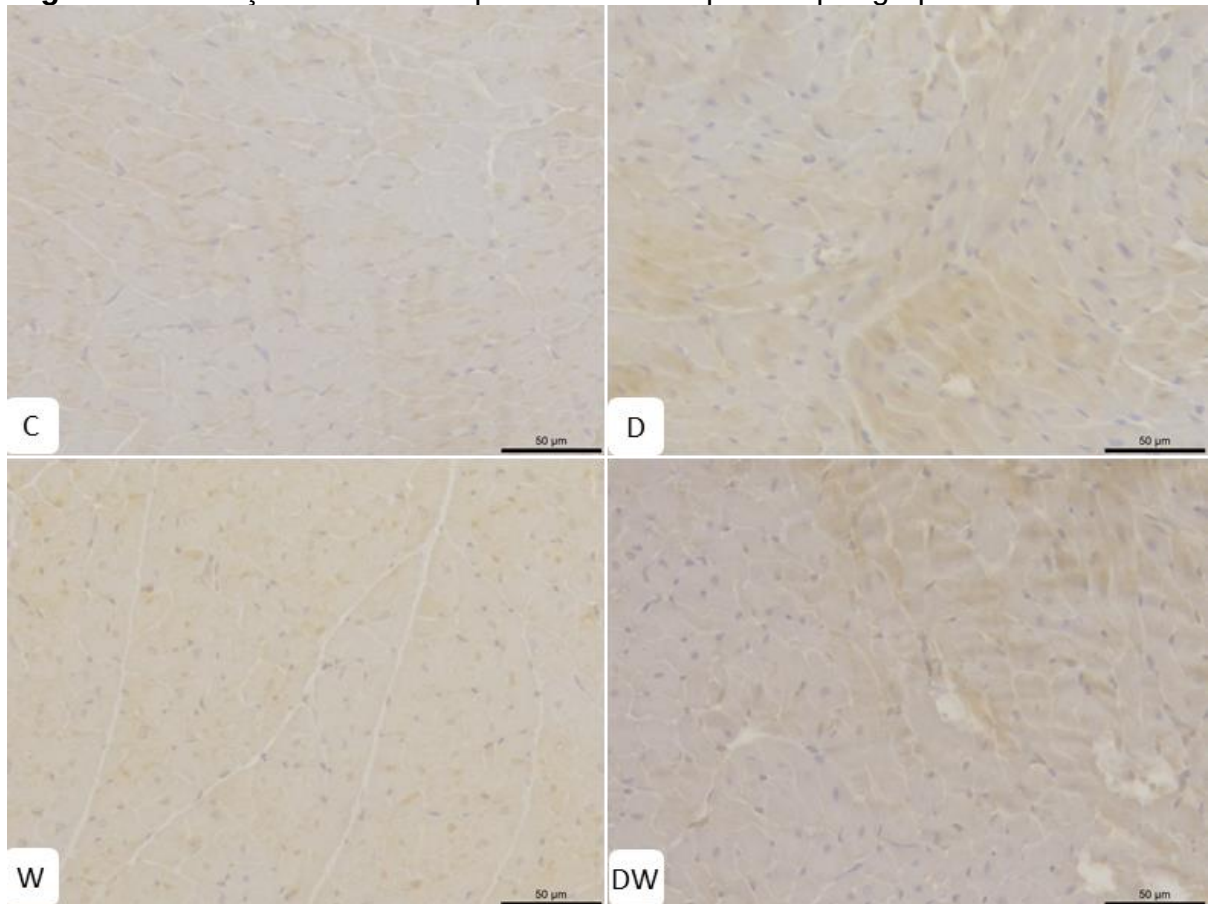
Figura 8. Expressão das proteínas por western blot no coração dos animais

Painel A: representação dos resultados da expressão da nSMase. C: grupo controle; D: grupo doxorrubicina; W: grupo ácidos graxos ômega 3; DW: doxorrubicina + ácidos graxos ômega 3. Dados expressos em média ± desvio padrão. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores. * Animais tratados com doxorrubicina foram diferentes estatisticamente dos animais que não receberam o quimioterápico, portanto, pD < 0,05. **Painel B:** representação dos resultados da expressões da IκB total, p-IκB e sua razão. Valor de p: ANOVA de duas vias, sendo pD: valor de p para o efeito da doxorrubicina; pW: valor de p para o efeito dos ácidos graxos ômega 3; pi: valor de p para a interação entre os fatores.

Análise da esfingomielinase neutra no coração por imuno-histoquímica

Não observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos na marcação da nSMase no tecido cardíaco dos animais. Os resultados podem ser vistos na figura 9.

Figura 9. Marcação da nSMase por imuno-histoquímica por grupos de animais



C: grupo controle (n=5); D: grupo doxorubicina (n=5); W: grupo ácidos graxos ômega 3 (n=5); DW: doxorubicina + ácidos graxos ômega 3 (n=5).
Imagens realizadas em microscópio no aumento de 40x.

DISCUSSÃO

Apesar de muitos estudos abordarem o uso de diversos tratamentos associados à doxorrubicina com o objetivo de atenuar a cardiotoxicidade gerada pelo quimioterápico (49,50), ainda não dispomos de tratamento estabelecido para essa complicação. Bem como, ainda não temos o real entendimento da sua fisiopatologia. O efeito da suplementação de ácido graxo ômega 3 nas doenças cardiovasculares ainda é muito discutido e, especificamente na cardiotoxicidade, os efeitos da suplementação são controversos (45). Por isso, nosso objetivo foi avaliar o efeito da suplementação de ácido graxo ômega 3 na atenuação da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em ratos. Adicionalmente, avaliamos o envolvimento da via da ceramida na fisiopatologia da lesão cardíaca e no efeito benéfico do ácido graxo ômega 3.

Os animais tratados com doxorrubicina apresentaram alterações estruturais cardíacas, disfunção diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo e aumento do estresse oxidativo, que aponta o desenvolvimento de cardiotoxicidade nesses grupos. O tratamento associado de doxorrubicina com ácido graxo ômega 3 mostrou melhora na estrutura cardíaca, diminuição do estresse oxidativo e atenuação da disfunção cardíaca causada pelo quimioterápico.

A toxicidade da doxorrubicina extrapola as células tumorais e danifica, além do coração, outros órgãos e tecidos saudáveis do organismo. A desordem sistêmica causada pelo quimioterápico resulta em efeitos adversos que incluem a cardiotoxicidade e danos ao sistema nervoso periférico, reprodutor, urinário e digestório (51). Sintomas como náuseas, vômitos, anorexia e alteração de paladar são recorrentes em pacientes em uso da doxorrubicina (51). Por isso, a diminuição da ingestão hídrica e alimentar que resulta em perda de massa muscular e desidratação é esperada (52). Essas alterações podem ter contribuído para a diminuição do consumo de ração e evolução do peso corporal dos animais tratados com a doxorrubicina no decorrer do experimento.

As alterações estruturais cardíacas observadas devido à administração do quimioterápico foram aumento do diâmetro sistólico e diastólico do VE corrigidos pelo peso, do índice de massa do VE e do diâmetro do átrio esquerdo e da aorta corrigidos pelo peso dos animais. O tratamento associado do ácido graxo ômega 3 com a doxorrubicina foi capaz de melhorar os diâmetros sistólico, diastólico e do átrio esquerdo corrigidos pelo peso, bem como a relação átrio esquerdo pela aorta.

Quanto a função cardíaca, vimos que a doxorrubicina prolongou o tempo de relaxamento isovolumétrico (intervalo de tempo entre o fechamento da valva aórtica e a abertura da valva mitral sem alteração do volume intraventricular) cuja alteração é marcadora de disfunção diastólica (53). Ainda, o quimioterápico foi responsável por diminuir a velocidade do fluxo sanguíneo no período de enchimento rápido da diástole (onda E). A associação entre as alterações dessas variáveis, junto ao aumento do diâmetro do átrio esquerdo, que também é preditor de disfunção diastólica (54), nos permite concluir que a doxorrubicina gerou disfunção diastólica nos animais. Entretanto, a suplementação de ácido graxo ômega 3 concomitante ao tratamento quimioterápico aumentou a onda E e diminuiu o diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso e normalizado pela aorta, indicando melhora da diástole.

A análise da função sistólica mostrou que os animais tratados com doxorrubicina apresentaram diminuição na fração de encurtamento do VE, o que mostra contração ventricular insuficiente que resulta em disfunção sistólica (55). A administração do ácido graxo ômega 3 associada melhorou a função sistólica já que aumentou a fração de encurtamento do VE dos animais.

A volemia é uma das variáveis hemodinâmicas responsável por determinar a função cardíaca. A desidratação leva a hipovolemia e pode resultar em disfunção cardíaca (56). Observamos possível desidratação nos animais tratados com doxorrubicina, podendo a hipovolemia ser a causa das alterações cardíacas encontradas nesses animais. Entretanto, na hipovolemia é esperado diminuição do diâmetro diastólico do VE e do átrio esquerdo (57), e o que vimos foi aumento do diâmetro dessas câmaras nos animais. Por isso, atribuímos a disfunção cardíaca encontrada em nosso estudo ao próprio efeito cardiotóxico da doxorrubicina.

O estresse oxidativo tem papel central na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina. Ele é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de ERO, ERN e os mecanismos antioxidantes intrínsecos. Além da capacidade reduzida de neutralização das espécies reativas que o coração fisiologicamente apresenta devido a menor concentração de enzimas antioxidantes, o estresse oxidativo associado a cardiotoxicidade pode ser desencadeado por diversos mecanismos como lesão mitocondrial, perturbação na homeostase do cálcio, formação de complexo de ferro, alteração no ciclo *redox*, dano ao DNA/RNA e peroxidação lipídica (58).

O malondialdeído (MDA) é formado pela decomposição de lipídios presentes nas membranas celulares e sua concentração é utilizada para estimar a intensidade

da peroxidação lipídica, bem como aumento do estresse oxidativo. O acúmulo de MDA no tecido cardíaco lesionado pela doxorrubicina é, provavelmente, decorrente da disfunção mitocondrial gerada pelo quimioterápico. A alta afinidade da doxorrubicina pela cardiolipina – fosfolípido mitocondrial que atua na atividade da cadeia transportadora de elétrons e geração massiva de EROs –, favorece a formação de EROs e resulta em peroxidação lipídica e apoptose dos cardiomiócitos (59).

Vimos em nosso estudo aumento da concentração miocárdica de MDA decorrente da administração de doxorrubicina, entretanto, a suplementação com ácido graxo ômega 3 não foi capaz de diminuir a produção de MDA causada pelo quimioterápico. Dos estudos com cardiotoxicidade induzida por doxorrubicina e suplementação de ácido ômega 3, alguns observaram diminuição do MDA na presença da suplementação (15,60,61). Entre eles, apenas um foi com modelo de cardiotoxicidade crônica (60) e nele, a suplementação foi de ALA e a dose suplementada foi muito inferior ao nosso estudo, sendo 0,5 mg/kg em dias alternados e 400 mg/kg diariamente, respectivamente. Em concordância ao nosso achado, outro estudo com cardiotoxicidade crônica e suplementação de ácido graxo ômega 3, não observou alteração na concentração de MDA sendo que a dose da suplementação foi mais próxima ao nosso estudo (370 mg/kg/ dias alternados), porém, diferentemente do presente estudo, a via de administração utilizada foi a parenteral (62). Essas comparações podem indicar que doses menores de ácido graxo ômega 3 podem ser mais eficientes para regulação da peroxidação lipídica na cardiotoxicidade crônica.

A oxidação de proteínas também é considerada marcador de estresse oxidativo. A carbonilação é amplamente utilizada para indicar dano oxidativo a proteínas. A introdução de grupos carbonil em aminoácidos específicos das proteínas marca a degradação de proteínas por meio de reação de oxidação dependente de oxigênio, ferro e redutores equivalentes (63). No presente trabalho, observamos que o grupo de tratamento associado (grupo DW) apresentou diminuição da carbonilação de proteínas totais. O efeito antioxidante da suplementação de ácido graxo ômega 3 na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, por meio da carbonilação de proteínas, ainda não havia sido descrito na literatura.

Apesar de, numericamente, o grupo de tratamento associado apresentar menor intensidade de marcação de EROs por fluorescência, não vimos aumento na produção das espécies reativas de oxigênio *in situ* no coração. Porém, nessa técnica, são marcados apenas os radicais superóxidos e, como já dito anteriormente, a

doxorrubicina é capaz de gerar aumento do estresse oxidativo por vários mecanismos e de diversas fontes diferentes.

O ensaio cometa é um método eficiente para quantificar danos ao DNA. O princípio da técnica é baseado na coloração formada no gel pelo deslocamento do DNA fragmentado para fora do “núcleóide” sob um campo elétrico. A extensão dessa coloração, conhecida como cauda do cometa, é utilizada para quantificar a extensão do dano ao DNA. As variáveis intensidade da cauda e momento da cauda (combinação do comprimento e intensidade da cauda) são diretamente proporcionais ao dano DNA (64). Em nosso estudo, a suplementação de ácidos graxos ômega 3 diminuiu danos ao DNA em linfócitos do sangue periférico dos animais que a receberam independente da administração de doxorrubicina.

Estudos têm mostrado que ácidos graxos ômega 3 diminuem a ocorrência de metilação de DNA – mecanismo epigenético caracterizado como modificação na configuração do DNA sem mutações – e assim, o risco de desenvolvimento de doenças (65).

Acreditamos que os efeitos antioxidantes observados em nosso estudo foram atribuídos ao ácido graxo ômega 3 e não a vitamina E, também presente no composto suplementado aos ratos, porque a dose de vitamina E presente na composição é muito inferior à de EPA e DHA. Adicionalmente, estudo prévio não mostrou efeito da vitamina E na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (66).

Apesar da importância do estresse oxidativo na cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina, estudos realizados com suplementação de antioxidantes não tiveram muito sucesso na atenuação da cardiotoxicidade gerada pelo quimioterápico no coração. Por isso, outras vias têm sido exploradas com o objetivo de compreender a complexa fisiopatologia da cardiotoxicidade, como a via da ceramida.

Os esfingolipídeos são lipídios bioativos que compõem a membrana plasmática celular e desempenham diversas funções em processos fisiológicos e patológicos, que incluem sobrevivência, estresse e morte celular. As esfingomielinas são os esfingolipídeos mais abundantes nas células (67). São compostas por ceramida, estrutura esfingóide acoplada a uma cadeia de ácido graxo, e pelo radical fosfocolina (68). Diferentes estímulos, incluindo o uso de quimioterápico, levam a quebra das esfingomielinas por reações enzimáticas que resulta na produção de ceramidas. As esfingomielinas e ceramidas se diferem pelo tamanho da cadeia de ácidos graxos e nível de saturação presentes em sua conformação. Podem conter ácidos graxos

saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados, e isso parece determinar o grau de fluidez da membrana plasmática. Junto ao colesterol, as esfingomielinas formam jangadas lipídicas, que são microdomínios com elevada concentração de colesterol e esfingolípídeos englobando proteínas e receptores envolvidos na sinalização celular (69).

O ciclo esfingomielina/ceramida é amplamente estudado por sua atuação na diferenciação celular, inflamação, estresse oxidativo e apoptose (69). Atualmente, sabe-se que as ceramidas são sintetizadas por três vias distintas: via *de novo*, via da esfingomielinase e via de resgate. A síntese da via *de novo* ocorre no retículo endoplasmático por meio de reações enzimáticas e adição de cadeia de ácido graxo que resultam na formação de diidroceramida e, posteriormente, ceramida. Após, a ceramida pode ser novamente convertida em esfingomielina no complexo de Golgi e transportada para a membrana plasmática. Na via da esfingomielinase, a ceramida é formada pela hidrólise da ligação fosfodiéster que pode ser feita, principalmente, pelas enzimas esfingomielinase ácida (aSMase) e esfingomielinases neutras (nSMase), sendo esta última mais associada a condições patológicas. Por fim, a ceramida também pode ser gerada pela via resgate a partir da esfingosina que também é precursora da esfingosina-1-fosfato (S1P), outro lipídio bioativo. A quebra da S1P em moléculas não esfingolípídicas é o único ponto de saída do ciclo esfingolípídios e ceramidas (70).

Até hoje, sabe-se da existência de quatro tipos de nSMases: nSMase1, nSMase2, nSMase3 e nSMase mitocondrial (Ma-nSMase). São estimuladas por TNF- α e outras citocinas inflamatórias, e dependem de pH neutro e íons de magnésio (Mg^{2+}) para serem ativadas (71). Entre elas, a nSMase2 é a mais investigada na literatura devido à sua atividade mais pronunciada no ciclo esfingomielina/ceramida (72). Entretanto, nenhum estudo relacionou cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina e a atividade dessas enzimas.

O uso da doxorrubicina foi capaz de promover ativação das nSMases em células cancerígenas mamárias e, conseqüentemente, aumento da produção de ceramidas nas células (73). Estudos apontam que a suplementação de ácidos graxos ômega 3 podem atenuar estresse oxidativo e apoptose por meio da diminuição da produção de ceramidas. (39-42). Ao investigarmos esse possível efeito benéfico do ácido graxo ômega 3 no tecido cardíaco e soro de animais tratados com doxorrubicina, vimos que a suplementação de ácido graxo ômega 3 aumentou a atividade das

nSMases no soro, e a administração da doxorrubicina foi responsável por esse efeito no coração. Além disso, vimos menor expressão da nSMase1 nos animais que receberam o quimioterápico segundo análise por Western Blot. Entretanto, não observamos diferença entre grupos na marcação de nSMase1 por imuno-histoquímica.

A divergência entre atividade e expressão da enzima encontrada no coração dos animais, pode ser explicada pelo fato da análise da atividade enzimática englobar todas as nSMases, enquanto o anticorpo utilizado para avaliar expressão proteica foi específico para nSMase1. Então, podemos sugerir que a doxorrubicina foi capaz de inibir a nSMase1 e aumentar a atividade enzimática das nSMases 2 e 3, as quais estão diretamente relacionadas à produção de ceramidas. O aumento da atividade enzimática no soro animais causado pelo tratamento com ácido graxo ômega 3, nos faz acreditar que a suplementação serviu como substrato para as enzimas.

Há apenas um estudo com suplementação de DHA e expressão das esfingomielinases, no qual os autores descreveram menor expressão e atividade da aSMase e nSMase em células endoteliais retinianas humanas inflamadas (74). As diferenças entre nossos resultados e desse estudo podem ser explicadas pelo grau de lesão no tecido cardíaco causado pela doxorrubicina, especificidades do músculo estriado cardíaco, modelo de estudo e dose de suplementação ofertada.

O TNF- α tem papel fundamental na ativação da nSMase. Além disso, ele é responsável por degradar a proteína I κ B – proteína que se encontra acoplada ao NF- κ B com a função de mantê-lo inibido – e resultar na ativação do NF- κ B que irá desencadear inflamação e apoptose (75). Entretanto, não vimos diferença estatística na expressão da I κ B entre os grupos, nem mesmo nos animais tratados com doxorrubicina que apresentaram aumento da atividade das nSMases.

Estudos experimentais *in vivo* e *in vitro*, descrevem hiperlipidemia como um efeito colateral da administração de doxorrubicina (76-79). Aumento do HDL, LDL, colesterol total e triglicerídeos séricos foram referidos após 14 dias da administração do quimioterápico. Essas alterações foram associadas ao desenvolvimento de síndrome nefrótica – lesão renal caracterizada por proteinúria, hipoalbuminemia, edema e hiperlipidemia – que pode ser causada pelo uso de doxorrubicina (80). Em nosso estudo, todos os animais que receberam doxorrubicina apresentaram elevação das concentrações séricas do HDL, LDL, colesterol total e triglicerídeos. Entretanto, não observamos diferenças nas concentrações séricas de creatinina entre os grupos.

Esses resultados sugerem que a dislipidemia associada ao uso da doxorrubicina pode ter etiologia diversa e não ser somente resultante da lesão renal induzida pelo quimioterápico. As consequências maléficas dessas alterações dos lipídeos sanguíneos, como por exemplo a lipotoxicidade cardíaca, permanecem por ser investigadas nesse modelo.

Nesse contexto, estudo com suplementação de ácidos graxos ômega 3 e toxicidade cardiorrenal aguda induzida pela doxorrubicina, mostrou melhora do perfil lipídico e da creatinina em ratos que receberam tratamento associado quando comparados ao grupo que recebeu apenas o quimioterápico (61). As doses de suplementação de ácido graxo ômega 3 utilizadas foram 25, 50 e 100 mg/kg/dia.

CONCLUSÃO

A suplementação de ácido graxo ômega 3 foi capaz de atenuar a disfunção cardíaca sistólica e diastólica e a lesão oxidativa às proteínas induzida pela doxorrubicina. Apesar da via das ceramidas, possivelmente, estar envolvida na fisiopatologia da cardiotoxicidade, esse não é o mecanismo pelo qual o ácido graxo ômega 3 atenuou a disfunção cardíaca.

REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 09 maio 2021.
2. YANG, X.; MA, R.C.; SO, W.Y.; YU L.W.; KONG A.P.; KO G.T.; XU G.; OZAKI, R.; TONG, P.C.; CHAN, J.C. Low triglyceride and nonuse of statins is associated with cancer in type 2 diabetes mellitus: the Hong Kong Diabetes Registry. **Cancer**. v. 117(4), p. 862-871, 2011.
3. GHIGO, A.; LI, M.; HIRSCH, E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1863(7), p. 1916-1925, 2016. Part B.
4. DAMIANI, R.M.; MOURA, D.J.; VIAU, C.M.; CACERES, R.A.; HENRIQUES, J.A.P.; SAFFI, J. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. **Archives of Toxicology**. v. 90(9), p. 2063–2076, 2016.
5. VOLKOVA, M.; RUSSELL, R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. **Current Cardiology Reviews**. v. 7(4), p. 214-220, 2011.
6. SAWYER, D.B. Anthracyclines and heart failure. **The New England Journal of Medicine**. v. 368 (12), p. 1154-1156, 2013.
7. HENNINGER C.; FRITZ, G. Statins in anthracycline-induced cardiotoxicity: Rac and Rho, and the heartbreakers. **Cell Death and Disease**. v. 8, e2564, 2017.
8. PIMPRA VEJPONGSA, M.D.; EDWARD, T.H. Prevention of Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Challenges and Opportunities. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 64(9), p. 938-945, 2014.
9. CARDINALE, D.; COLOMBO, A.; BACCHIANI, G.; TEDESCHI, I.; MERONI, C.A.; VEGLIA, F.; CIVELLI, M.; LAMANTIA, G.; COLOMBO, N.; CURIGLIANO, G.; FIORENTINI, C.; CIPOLLA, C.M. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. **Circulation**. v. 131(22), p. 1981-1988, 2015.
10. ZAMORANO, J. L.; LANCELLOTTI, P.; MUÑOZ, D. R.; ABOYANS, V.; ASTEGGIANO, R.; GALDERISI, M.; HABIB, G.; LENIHAN, D. J.; LIP, G. Y. H.; LYON, A. R. Position paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for practice guidelines: The task force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). **European Heart Journal**. v. 37 (36), p. 2768–2801, 2016.
11. CAPPETTA, D.; DE ANGELIS, A.; SAPIO, L.; PREZIOSO, L.; ILLIANO, M.; QUAINI, F.; ROSSI, F.; BERRINO, L.; NAVIGLIO, S.; URBANEK, K. Oxidative stress and cellular response to doxorubicin: a common factor in the complex milieu of anthracycline cardiotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v. 2017, p. 1-13, 2017.
12. CARVALHO, F. S.; BURGEIRO, A.; GARCIA, R.; MORENO, A.J.; CARVALHO, R. A.; OLIVEIRA, P.J. Doxorubicin-Induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and

cell death to cardiomyopathy. **Medicinal Research Reviews**. v. 34 (1), p. 106-135, 2014.

13. FARÍAS, J.G.; MOLINA, V. M.; CARRASCO, R. A.; CARRASCO, R. A.; ZEPEDA, A. B.; FIGUEROA, E.; LETELIER, P.; CASTILLO, R. L.; Antioxidant therapeutic strategies for cardiovascular conditions associated with oxidative stress. **Nutrients** v. 9 (9), p. E966, 2017.

14. ICHIKAWA, Y.; GHANEFAR, M.; BAYEVA, M.; WU, R.; KHECHADURI, A.; NAGA PRASAD, S. V.; MUTHARASAN, R. K.; NAIK, T. J.; ARDEHALI, H. Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 124(2), p. 617-30, 2014.

15. UYGUR, R.; AKTAS, C.; TULUBAS, F.; ALPSOY, S.; TOPCU, B.; OZEN, O. A. Cardioprotective effects of fish omega-3 fatty acids on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Human & Experimental Toxicology**. v. 33(4), p. 435-45, 2014.

16. CHILDS, A.C.; PHANEUF, S. L.; DIRKS, A. J.; PHILLIPS, T.; LEEUWENBURGH, C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. **Cancer Research**. v. 62(16), p. 4592-8, 2002.

17. NEGORO, S.; OH, H.; TONE, E.; KUNISADA, K.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; KISHIMOTO, T.; YAMAUCHI-TAKIHARA, K. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. **Circulation**. v. 103(4), p. 555-561, 2001.

18. UENO, M.; KAKINUMA, Y.; YUHKI, K.; MURAKOSHI, N.; IEMITSU, M.; MIYAUCHI, T.; YAMAGUCHI, I. Doxorubicin induces apoptosis by activation of caspase-3 in cultured cardiomyocytes in vitro and rat cardiac ventricles in vivo. **Journal of Pharmacological Sciences**. v. 101(2), p. 151-158, 2006.

19. VAN DALEN, E. C.; CARON, H. N.; DICKINSON, H. O.; KREMER, L. C. Cardioprotective interventions for cancer patients receiving anthracyclines. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 16(2), p. CD003917, 2008.

20. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Fundamentos da biologia celular**. Ed 2. Porto Alegre: Artmed, 2006.

21. ADADA, M.; LUBERTO, C.; CANALS, D. Inhibitors of the sphingomyelin cycle: Sphingomyelin synthases and sphingomyelinases. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 197, p. 45-59, 2016.

22. BIENIAS, K.; FIEDOROWICZ, A.; SADOWSKA, A.; PROKOPIUK, S.; CAR, HALINA. Regulation of sphingomyelin metabolism. **Pharmacological Reports**. v. 68, p. 570-581, 2016.

23. Taniguchi, M. e Okazaki, T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to

human disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**. v. 1841, p. 692-703, 2014.

24. ZEIDAN, Y. H.; HANNUN, Y. A. The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation. **Current Molecular Medicine**. v. 10(5), p. 454-66, 2010.

25. LOEHR, J. A.; ABO-ZAHRAH, R.; PAL, R.; RODNEY, G. G. Sphingomyelinase promotes oxidant production and skeletal muscle contractile dysfunction through activation of NADPH oxidase. **Frontiers in Physiology**. v. 5, p. 530, 2015.

26. WON, J. S.; SINGH, I. Sphingolipid signaling and redox regulation. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 40(11), p. 1875-88, 2006.

27. DEFILIPPIS, A. P.; BLAHA, M. J.; JACOBSON, T. A. Omega-3 fatty acids for cardiovascular disease prevention. **Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine**. v. 12(4), p. 365–380, 2010.

28. DINICOLANTONIO, J.J.; MCCARTY, M.F.; S. CHATTERJEE, S.; LAVIE, C.J.; O'KEEFE, J.H.; Uma proporção mais alta de ômega-3 de cadeia longa para ácidos graxos ômega-6 totais para a prevenção de adenocarcinomas dependentes de COX-2. **Nutrition and Cancer**. v. 66(80), p. 1279-1284, 2014.

29. DE CATERINA, R.; n-3 Fatty Acids in Cardiovascular Disease. **The New England Journal of Medicine**. v. 364(25), p. 2439-2450, 2011.

30. LAVIE, C. J.; MILANI, R. V.; MEHRA, M. R.; VENTURA, H. O. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. **Journal of the American College of Cardiology**. v. 54, p. 585–594, 2009.

31. BRADBERRY, J. C.; HILLEMANN, D. E. Overview of omega-3 fatty acid therapies. **Pharmacy and Therapeutics**. v. 38(11), p. 681–691, 2013.

32. CALDER, P. C. Mechanisms of Action of (N-3) Fatty Acids. **The Journal of Nutrition**. v. 142(3), p. 592–599, 2012.

33. COLUSSI, G.; CATENA, C.; NOVELLO, M.; BERTIN, N.; SECHI, L.A. Impact of ω -3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**. v. 27, p. 191–200, 2017.

34. WEISMAN, D.; BEINART, R.; EREZ, A.; KOREN-MORAG, N.; GOLDENBERG, I.; ELDAR, M.; GLIKSON, M.; LURIA, D. Effect of supplemented intake of ω -3 fatty acids on arrhythmias in patients with ICD: Fish oil therapy may reduce ventricular arrhythmia. **Journal of Interventional Cardiac Electrophysiology**. v. 49, p. 255–261, 2017.

35. Backes, J.; Anzalone, D.; Hilleman, D.; Catini, J. The clinical relevance of ω -3 fatty acids in the management of hypertriglyceridemia. **Lipids Health Diseases**. v. 15(1), p. 118, 2016.

36. Li, X.; Ballantyne, L.L.; Che, X.; Mewburn, J.D.; Kang, J.X.; Barkley, R.M.; Murphy, R.C.; Yu, Y.; Funk, C.D. Endogenously generated ω -3 fatty acids attenuate vascular inflammation and neointimal hyperplasia by interaction with free fatty acid receptor 4 in mice. **Journal of the American Heart Association**. v. 4, p. e001856, 2015.
37. Phang, M.; Lincz, L.F.; Garg, M.L. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid supplementations reduce platelet aggregation and hemostatic markers differentially in men and women. **J. Nutrition**, v. 143, p. 457–463, 2013.
38. Sauder, K. A.; Skulas-Ray, A. C.; Campbell, T. S.; Johnson, J. A.; Kris-Etherton, P. M.; West, S. G. Effects of ω -3 fatty acid supplementation on heart rate variability at rest and during acute stress in adults with moderate hypertriglyceridemia. **Psychosomatic Medicine**. v. 75, p. 382–389, 2013.
39. PACHECO, F. J.; ALMAGUEL, F. G.; Evans, W.; RIOS-COLON, L.; FILIPPOV, V.; LEOH, L. S.; ROOK-ARENA, E.; MEDIAVILLA-VARELA, M.; DE LEON, M.; CASIANO, C. A. Docosahexanoic acid antagonizes TNF- α -induced necroptosis by attenuating oxidative stress, ceramide production, lysosomal dysfunction, and autophagic features. **Inflammation Research**. v. 63(10), p. 859-871, 2014.
40. JUNFEI, J.; ZHONGYANG, L.; YANCHUN, L.; COWARTS, L. A; LOPES-VIRELLA, M. F.; HUANG, Y. Docosahexaenoic acid antagonizes the boosting effect of palmitic acid on LPS inflammatory signaling by inhibiting gene transcription and ceramide synthesis. **Plos One**. v. 13(2), p. e0193343, 2018.
41. WITTMANN, A.; GRIMM, M. O. W.; SCHERTHAN, H.; HORSCH, M.; BECKERS, J.; FUCHS, H.; GAILUS-DURNER, V.; DE ANGELIS, M. H.; FORD, S. J.; BURTON, N. C.; TRÜMBACH, D. R. D.; AICHLER, M.; WALCH, A. K.; CALZADA-WACK, J.; NEFF, F.; WURST, W.; HARTMANN, T.; FLOSS, T. Sphingomyelin synthase 1 is essential for male fertility in mice. **Plos One**. v. 11(10), p. e0164298, 2016.
42. KASBI-CHADLI, F. K; FERCHAUD-ROUCHER, V.; KREMPF, M.; OUGUERRAM, K. Direct and maternal n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation improved triglyceridemia and glycemia through the regulation of hepatic and muscle sphingolipid synthesis in offspring hamsters fed a high-fat diet. **European Journal of Nutrition**. v. 55(2), p. 589-599, 2015.
43. DONG, Y. Q.; ZHANG, X. Z.; SUN L. L.; ZHANG S. Y.; LIU, B; LIU, H. Y.; WANG, X.; JIANG C. T. Omega-3 PUFA ameliorates hyperhomocysteinemia-induced hepatic steatosis in mice by inhibiting hepatic ceramide synthesis. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 38(12), p.1601-1610, 2017.
44. ZHANG, H. F.; WANG, Y. L.; GAO, C.; GU, Y. T.; HUANG, J.; WANG, J.; WANG, J. H.; ZHANG, Z.; Salvianolic acid A attenuates kidney injury and inflammation by inhibiting NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways in 5/6 nephrectomized rats. **Acta Pharmacologica Sinica**. v. 67, p. 283-289, 2018.
45. SERINI, S.; VASCONCELOS, R. O.; GOMES R. N.; CALVIELLO, G. Protective effects of ω -3 PUFA in anthracycline-Induced cardiotoxicity: a critical review. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18(12), p. E2689, 2017.

46. INVITROGEN. Thermo Fisher Scientific. **Amplex® Red Sphingomyelinase Assay Kit**, 2006. Disponível em: < <https://www.thermofisher.com/document-connect/documentconnect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFSAssets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fmp12220.pdf&title=QW1wbGV4IFJlZCBTcGhp bmdvbXllbGluYXNlIEFzc2F5IEtpdA==>>. Acesso em 07 out 2020.
47. NIELSEN, F.; MIKKELSEN, B. B.; NIELSEN, J. B.; ANDERSEN, H. R.; GRANDJEAN, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. **Clinical Chemistry**. v. 43(7), p. 1209–1214, 1997.
48. MESQUITA, C. S.; OLIVEIRA, R.; BENTO, F.; GERALDO, D.; RODRIGUES, J. V.; MARCOS, J. C. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. **Analytical Biochemistry**. v. 458, p. 69-71, 2014.
49. BHAGAT, A.; KLEINERMAN, E. S. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Causes, Mechanisms, and Prevention. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 1257, p. 181-192, 2020.
50. ABUSHOUK, A. I.; ISMAIL, A.; SALEM, A. M. A.; AFIFI, A.M.; ABDEL-DAIM, M. M. Cardioprotective mechanisms of phytochemicals against doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 90, p. 935-946, 2017.
51. PUGAZHENDHI, A.; EDISON, T. N. J. I.; VELMURUGAN, B. K.; JACOB, J. A.; KARUPPUSAMY, I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**. v. 200, p. 26-30, 2018.
52. de VRIES, Y. C.; VAN DEN BERG, M. M. G. A.; de VRIES, J. H. M.; BOESVELDT, S.; de KRUIF, J. T. C. M.; BUIST, N.; HARINGHUIZEN, A.; LOS, M.; SOMMEIJER, D. W.; TIMMER-BONTE, J. H. N.; VAN LAARHOVEN, H. W. M.; VISSER, M.; KAMPMAN, E.; WINKELS, R. M. Differences in dietary intake during chemotherapy in breast cancer patients compared to women without cancer. **Support Care Cancer**. v. 25(8), p. 2581-2591, 2017.
53. ITO, T.; SUWA, M. Echocardiographic tissue imaging evaluation of myocardial characteristics and function in cardiomyopathies. **Heart Failure Reviews**. 2020. In press.
54. HSIAO, S. H.; CHIOU, K. R. Diastolic Heart Failure Predicted by Left Atrial Expansion Index in Patients with Severe Diastolic Dysfunction. **Plos One**. v. 11(9) p. e0162599, 2016.
55. CHENGODE, S. Left ventricular global systolic function assessment by echocardiography. **Annals of Cardiac Anaesthesia**. v. 19(Supplement), p. S26-S34, 2016.
56. SANTOS, P. P.; OLIVEIRA, F.; FERREIRA, V. C.; POLEGATO, B. F.; ROSCANI, M. G.; FERNANDES, A. A. et al. The role of lipotoxicity in smoke cardiomyopathy. **Plos One**. v. 2, p. e113739, 2014.

57. CARVALHO, P. B.; GONÇALVES, A. F.; ALEGRE, P. H.; AZEVEDO, P. S.; ROSCANI, M. G.; BERGAMASCO, C. M.; MODESTO, P. N.; FERNANDES, A. A.; MINICUCCI, M. F.; PAIVA, S. A.; ZORNOFF, L. A. M.; POLEGATO, B. F. Pamidronate Attenuates Oxidative Stress and Energetic Metabolism Changes but Worsens Functional Outcomes in Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**. v.40, p. 431-442, 2016.
58. SONGBO, M.; LANG, H.; XINYONG, C.; BIN, X.; PING, Z.; LIANG, S. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Toxicology Letters**. v. 307, p. 41-48, 2019.
59. BAIKUNTHA, A.; ASHUTOSH, R. A. O. Deficiency in Cardiolipin Reduces Doxorubicin-Induced Oxidative Stress and Mitochondrial Damage in Human B-Lymphocytes. **Plos One**. v. 7 p. e0158376, 2016.
60. YU, X.; CUI, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, Q.; LI, S. α -Linolenic acid attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats through suppression of oxidative stress and apoptosis. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. v. 45(10), p. 817-26, 2013.
61. SALEH, D.; ABDELBASET, M.; HASSAN, A.; SHARAF, O.; MAHMOUD, S.; HEGAZY, R. Omega-3 fatty acids ameliorate doxorubicin-induced cardiorenal toxicity: In-vivo regulation of oxidative stress, apoptosis and renal Nox4, and in-vitro preservation of the cytotoxic efficacy. **PLoS One**. v. 15(11), p. e0242175, 2020.
62. XUE, H.; REN, W.; DENKINGER, M.; SCHLOTZER, E.; WISCHMEYER, P. E. Nutrition Modulation of Cardiotoxicity and Anticancer Efficacy Related to Doxorubicin Chemotherapy by Glutamine and ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. 2016 v. 40(1), p. 52-66, 2016.
63. NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **EMBO Journal**. v. 24(7), p. 1311–1317, 2005.
64. LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**. v. 48(1), p: 46-53, 2009.
65. NASIR, A.; BULLO, M. M. H.; AHMED, Z.; IMTIAZ, A.; YAQOOB, E.; JADOON, M.; AHMED, H.; AFREEN, A.; YAQOOB, S. Nutrigenomics: Epigenetics and cancer prevention: A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 60(8), p. 1375-1387, 2020.
66. GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J. L.; RAMIREZ-TORTOSA, C. L.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48(6):1425-38, 2010.
67. SAHU, S. K.; HANNUN, Y. A.; YAO, N. Emergence of membrane sphingolipids as a potential therapeutic target. **Biochimie**. v. 158, p. 257-264. PMID: 30703477, 2019.
68. ALBEITUNI, S.; STIBAN, J. Roles of Ceramides and Other Sphingolipids in Immune Cell Function and Inflammation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 1161, p. 169-191, 2019.

69. BIENIAS, K.; FIEDOROWICZ, A.; SADOWSKA, A.; PROKOPIUK, S.; CAR, H. Regulation of sphingomyelin metabolism. **Pharmacological Reports**. v. 68(3), p. 570-81, 2016.
70. de WIT, N. M.; MOL, K.; RODRÍGUEZ-LORENZO, S.; de VRIES, H. E.; KOOLJ, G. The Role of Sphingolipids and Specialized Pro-Resolving Mediators in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Immunology**. v. 11, p. 620348, 2021.
71. ADADA, M.; LUBERTO, C.; CANALS, D. Inhibitors of the sphingomyelin cycle: Sphingomyelin synthases and sphingomyelinases. **Chemistry and Physics of Lipids**. v. 197, p. 45-59, 2016.
72. AL-RASHED, F.; AHMAD, Z.; THOMAS, R.; MELHEM, M.; SNIDER, A. J.; OBEID, L. M.; AL-MULLA, F.; HANNUN, Y. A.; AHMAD, R. Neutral sphingomyelinase 2 regulates inflammatory responses in monocytes/macrophages induced by TNF- α . **Scientific Reports**. v. 10(1), p.16802, 2016.
73. Snider JM, Trayssac M, Clarke CJ, et al. Multiple actions of doxorubicin on the sphingolipid network revealed by flux analysis. **Journal of Lipid Research**. v. 60(4), p. 819-831, 2021.
74. OPREANU, M.; LYDIC, T. A.; REID, G. E.; MCSORLEY, K. M.; ESSELMAN, W. J.; BUSIK, J. V. Inhibition of cytokine signaling in human retinal endothelial cells through downregulation of sphingomyelinases by docosahexaenoic acid. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**. v. 51(6), p. 3253-63, 2010.
75. KARIN, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. **Oncogene**. v. 18(49), p. 6867-74, 1999.
76. ZHANG, G.; LI, Q. Inflammation Induces Lipid Deposition in Kidneys by Downregulating Renal PCSK9 in Mice with Adriamycin-Induced Nephropathy. **Medical Science Monitor**. v. 25, p. 5327-5335, 2019.
77. KLINNIKOVA, M. G.; LUSHNIKOVA, E. L.; KOLDYSHEVA, E. V.; TOLSTIKOVA, T. G.; SOROKINA, I. V.; YUZHNIK, E. I.; MZHEL'SKAYA, M. M. Cardiotoxic and Dyslipidemic Effects of Doxorubicin and Betulinic Acid Amide. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. v. 162(2):277-282, 2016.
78. KORGA, A.; DUDKA, J.; BURDAN, F.; WRONECKI, L.; SIEROCINSKA-SAWA, J.; IWAN, M.; KOROBYOWICZ-MARKIEWICZ, A.; KOROBYOWICZ, E. The influence of a thyroxine supplemented diet on selected hepatic redox equilibrium markers, liver morphology and the serum lipid profile in rats treated with doxorubicin. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**. v. 67, p. 143-9, 2013.
79. BIZZI, A.; CERIANI, L.; GERUNDINO, M.; SPINA, A.; TACCONI, M. T.; VENERONI, E. Adriamycin causes hyperlipemia as a consequence of nephrotoxicity. **Toxicology Letters**. v. 18(3), p. 291-300, 1983.

80. AGRAWAL, S.; ZARITSKY, J. J.; FORNONI, A.; SMOYER, W. E. Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: mechanisms and treatment. **Nature Reviews Nephrology**. v. 14(1), p. 57-70, 2018.