



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTRATÉGIA PARA REDUZIR A CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA (DOX) SEM AFETAR SUA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA**

VIVIANE COSTA JUNQUEIRA ROCHA

**Salvador – Bahia – Brasil
2010**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**ESTRATÉGIA PARA REDUZIR A CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA (DOX) SEM AFETAR SUA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA**

VIVIANE COSTA JUNQUEIRA ROCHA

Orientador: Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho
Co-orientador: Dr. Alberto Augusto Noronha
Dutra

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Salvador – Bahia – Brasil
2010**

VIVIANE COSTA JUNQUEIRA ROCHA

**ESTRATÉGIA PARA REDUZIR A CARDIOTOXICIDADE DA
DOXORRUBICINA (DOX) SEM AFETAR SUA ATIVIDADE
ANTINEOPLÁSICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em 25/08/2010

BANCA EXAMINADORA

Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho – CPqGM

Dr. Ramon dos Santos El-Bachá – Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Dra. Simone Garcia Macambira – CPqGM

Dedico este trabalho:

*À minha mãezona, Elizaura, às minhas
queridas irmãs Cristiane e Lisiane...*

*...e ao meu lindo e grande amor Luciano.
Vocês são preciosos presentes de Deus
em minha vida! Eu os amo!!!*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, proteção, força, amor incondicional e por suprir TODAS as minhas necessidades. Senhor, tu és tudo para mim!

Ao Dr. Lain Carlos Pontes de Carvalho pela confiança para tocar um projeto de uma linha de pesquisa nova, pelo exemplo de pessoa e pesquisador, pela competência, dedicação, perfeccionismo, responsabilidade e pela orientação neste trabalho.

Ao Dr. Alberto Augusto Noronha Dutra por estimular o crescimento intelectual, o desenvolvimento de autonomia, por estar sempre disponível quando procurado, pelas idéias, sugestões, conversas e orientação.

À Luciana de Aragão França pela amizade sincera, companhia, apoio incondicional em todos os experimentos independente do dia, horário, cansaço ou estado de saúde, pelas conversas, força, estímulo, enfim por tudo! Muito obrigada, Lu!

A Thiago Amparo pelo auxílio nos experimentos de manhã cedo, à noite, nos finais de semana ou feriados, pelas contribuições teóricas, dedicação e responsabilidade.

À Thayna Meirelles e Thassila Pitanga pelas discussões e sugestões para o projeto e experimentos, pela preocupação, boas conversas e ajuda, sempre que possível.

À Virgínia da Silva pela atenção, conselhos, auxílio nos experimentos, correções e sugestões para a dissertação.

A Pablo Oliveira pelas correções, atenção e, sobretudo, por divulgar e auxiliar no manuseio do *Mendeley Desktop* que foi muito útil durante a elaboração da dissertação.

Aos amigos da B05 pela alegre convivência, união e suporte: David Andrade, Camila Trevisan, Andréia Cunha, Cíntia Araújo, Isabela Navarro, Daniela Larangeira, Yanaihara Pinchemel, Felipe Miranda, Pilar Veras, Laura Fontes, Nara Pacheco.

À Joselli Santos Silva pela amizade, companhia, orações e ajuda, quando possível.

A Tiago Landim e Cristiane Junqueira pelo precioso auxílio na formatação da dissertação.

A Sérgio Vasconcelos pelo excelente trabalho na esterilização, pela companhia agradável, por sempre atender às solicitações com um sorriso no rosto, mesmo passando do horário normal de expediente e à Elivani de Jesus pelo auxílio técnico, sempre que possível.

À D. Lia pela preocupação diária com meu bem estar e por torcer por mim.

Aos demais colegas do LPBI pela companhia diária.

À Adriana Lanfredi Rangel e Claudio Pereira Figueira pela ajuda com a realização da microscopia eletrônica de transmissão.

À Dra. Maria de Nazareth Meirelles por me receber com tanto carinho e atenção em seu laboratório para aprender a isolar cardiomiócitos e a todos do Laboratório de Ultraestrutura Celular (LUC, Fiocruz-RJ), em especial, Danielle e Caroline.

À Dra. Simone Macambira pela doçura, atenção e disponibilidade na análise funcional dos animais, juntamente com Lucas Castro e Murilo Fagundes.

Ao Dr. Ricardo David Couto pelo auxílio na dosagem sérica de enzimas.

Aos colegas de mestrado pelos momentos agradáveis, em especial à Tâmara Nogueira pela amizade, dicas, conversas e auxílio na pesagem da Dox.

A Ciro Filadelfo, Ebenézer Cruz e Fabiana Nonato pelo auxílio nos cálculos da LC50.

A Diego Silva Menezes pela confiança em emprestar constantemente o banho seco de seu laboratório, indispensável aos meus experimentos, pelas dicas e atenção.

À Flávia dos Santos Paixão pela competência na administração do LPBI, pela agilidade e empenho em resolver as pendências e por estar sempre disponível.

À Taise Coutinho Caires pelo competente trabalho na secretaria do Curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

À Adelvani de Araújo Boa Morte pela elaboração da ficha catalográfica.

A FAPESB pelo financiamento do projeto e CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

*“Não tenho palavras para agradecer Tua bondade
Dia após dia me cercas com fidelidade
Nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho
tudo o que sou, o que vier a ser
Vem de Ti, Senhor...”*

(Vem de Ti, Senhor – Ana Paula Valadão)

RESUMO

ESTRATÉGIA PARA REDUZIR A CARDIOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA (DOX) SEM AFETAR SUA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

A Dox é um quimioterápico da classe das antraciclinas amplamente utilizado no tratamento de tumores malignos sólidos e hematológicos. Apesar de sua eficácia no tratamento antineoplásico, a cardiotoxicidade é o principal fator limitante para o uso da Dox na clínica médica. Embora o dano cardíaco induzido pela Dox pareça ser multifatorial, uma das hipóteses mais prevalentes é a de que o dano celular seja induzido por radicais livres, e há muitas evidências apontando para as mitocôndrias cardíacas como principais alvos da toxicidade da Dox. Esse dano oxidativo pode ser potencialmente limitado com o uso de antioxidantes. No presente trabalho, foi avaliada a eficácia protetora do ácido lipoico, um antioxidante universal, sobre a cardiotoxicidade induzida pela Dox em camundongos *in vivo*, e sua interferência nos efeitos anticâncer foi investigada *in vitro* em células de melanoma de camundongo B16F10. A toxicidade da Dox induzida por uma dose única intraperitoneal (i.p.) de 20 mg/kg foi verificada por redução significativa do peso após cinco dias ($p < 0,001$), aumento da atividade sérica de CK total após 48 horas ($p < 0,05$) e elevação da concentração de malondialdeído após 24 horas em mitocôndrias cardíacas ($p < 0,05$) e tecido cardíaco ($p < 0,001$). O pré-tratamento com ácido lipoico (200 mg/kg, i.p., por dois dias, 72 horas antes da Dox) reduziu significativamente a peroxidação lipídica das mitocôndrias cardíacas, sugerindo o potencial antioxidante do ácido lipoico em reduzir a cardiotoxicidade induzida pela Dox. Além disso, o ácido lipoico não interferiu significativamente na atividade antitumoral da Dox sobre células de melanoma B16F10 *in vitro*.

Palavras-chave: Doxorubicina, cardiotoxicidade, mitocôndria, ácido lipoico, melanoma

ABSTRACT

A STRATEGY TO REDUCE THE CARDIOTOXICITY OF DOXORUBICIN (DOX) WITHOUT AFFECTING ITS ANTINEOPALSTIC ACTIVITY

Doxorubicin is a chemotherapeutic of the anthracycline class widely used in the treatment of solid and haematopoietic malignancies. Despite their efficacy in the antineoplastic treatment, cardiotoxicity is the main limiting factor to the use of Dox at the medical clinic. Although doxorubicin-induced cardiac damage appears to be multifactorial, one of the most prevalent assumptions is that cellular damage is induced by free radicals, and there is much evidence pointing to cardiac mitochondria as primary targets of the toxicity of Dox. This oxidative injury may be potentially limited by the use of antioxidants. In this study, the protective efficacy of lipoic acid, a universal antioxidant, on Dox-induced cardiotoxicity was evaluated in mice *in vivo*, and its interference in anticancer effects was investigated *in vitro* in mouse B16F10 melanoma cells. The Dox-induced toxicity by a single intraperitoneal (i.p.) injection of 20 mg/kg body weight was verified by a significant reduction in body weight after five days ($p < 0.001$), increased serum activity of total creatine kinase after 48 hours ($p < 0.05$) and increase in malondialdehyde levels after 24 hours in cardiac mitochondria ($p < 0.05$) and cardiac tissue ($p < 0.001$). Pretreatment with lipoic acid (200 mg/kg body weight, i.p., for two days, 72 hours prior to Dox) significantly reduced the lipid peroxidation of cardiac mitochondria, suggesting the antioxidant potential of lipoic acid in reducing the cardiotoxicity induced by Dox. In addition, lipoic acid did not significantly affect the antitumor activity of Dox on B16F10 melanoma cells *in vitro*.

Keywords: Doxorubicin, cardiotoxicity, mitochondria, lipoic acid, melanoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura e metabolismo da doxorubicina (Dox)	15
Figura 2	Esquema dos mecanismos de ação propostos para a toxicidade cardíaca e para a atividade antitumoral da Dox	18
Figura 3	Esquema dos protocolos de indução de cardiotoxicidade com doxorubicina (DOX)	32
Figura 4	Esquema do protocolo de tratamento com ácido lipoico (AL) em camundongos subsequentemente tratados com doxorubicina (DOX)	33
Figura 5	Variação ponderal de camundongos submetidos a diferentes tratamentos com doxorubicina (Dox)	41
Figura 6	Atividade sérica de creatina quinase (CK) 72 horas pós-doxorubicina (Dox)	42
Figura 7	Microscopia eletrônica de transmissão das mitocôndrias	43
Figura 8	Variação ponderal de camundongos 12, 24 e 48 horas após tratamento com doxorubicina (20 mg/kg)	44
Figura 9	Atividade sérica de creatina quinase (CK) 12, 24 e 48 horas pós-doxorubicina (Dox)	44
Figura 10	TBARS de preparação enriquecida para mitocôndria cardíaca 12, 24 e 48 horas pós-doxorubicina (Dox)	45
Figura 11	TBARS do homogenato total de coração 12, 24 e 48 horas pós-doxorubicina (Dox)	46
Figura 12	Variação ponderal de camundongos tratados com ácido lipoico e doxorubicina (Dox)	47

Figura 13	Atividade sérica de creatina quinase (CK) de camundongos tratados com ácido lipoico (AL) e doxorubicina (Dox)	48
Figura 14	TBARS de preparação enriquecida para mitocôndria cardíaca após tratamento com ácido lipoico (AL) e doxorubicina (Dox)	49
Figura 15	TBARS de homogenato total de coração após tratamento com ácido lipoico (AL) e doxorubicina (Dox)	49
Figura 16	Curva dose-resposta de doxorubicina (Dox) em células B16F10	50
Figura 17	Curva dose-resposta do ácido lipoico (AL) em células B16F10	51
Figura 18	Ação do ácido lipoico (AL) sobre a atividade antineoplásica da doxorubicina (Dox) em dose letal para 100% das células	52
Figura 19	Ação do ácido lipoico (AL) sobre a atividade antineoplásica da doxorubicina (Dox) na concentração que causa redução de viabilidade celular de 50% (LC ₅₀)	53

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
CK	Creatina quinase
CPqGM	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
Dox	Doxorrubicina
ECG	Eletrocardiograma
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
E.P.M.	Erro padrão da média
(g)	Gramas (s)
AL	Ácido lipoico
LC ₅₀	Concentração que reduz a viabilidade celular em 50% (do inglês, <i>Lethal Concentration, 50%</i>)
LDH	Lactato desidrogenase
MLDA	Malondialdeído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase (do inglês, <i>Nitric Oxide Synthase</i>)
PBS	Salina tamponada com fosfato
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SBF	Soro bovino fetal
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 O CÂNCER E O DESAFIO POSTO PARA SEU TRATAMENTO	14
1.2 USO CLÍNICO E NATUREZA QUÍMICA DA DOXORRUBICINA.....	14
1.3 MECANISMO DE AÇÃO DA DOXORRUBICINA.....	16
1.4 CARDIOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA	19
1.5 REDUÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA	22
1.5.1 Visão geral	22
1.5.2 O ácido lipoico como cardioprotetor	23
1.5.3 Outros antioxidantes como cardioprotetores	26
2. HIPÓTESE	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 GERAL.....	29
3.2 ESPECÍFICOS	29
4. JUSTIFICATIVA	30
5. MATERIAL E MÉTODOS	31
5.1 ANIMAIS	31
5.2 INDUÇÃO DE CARDIOTOXICIDADE COM DOXORRUBICINA	31
5.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO IDEAL PARA ANÁLISE DE MITOCÔNDRIA CARDÍACA	32
5.4 EFEITO DO ÁCIDO LIPOICO (AL) SOBRE A CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORRUBICINA	33
5.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE (CK) NO SORO.....	33
5.6 OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA PARA MITOCÔNDRIA CARDÍACA	34
5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.....	35
5.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	36
5.9 DETECÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	36
5.10 VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DO <i>ALAMAR BLUE</i>	37

5.11 ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA DOXORRUBICINA <i>IN VITRO</i>	37
5.11.1 Obtenção de células de melanoma B16F10	37
5.11.2 Curva dose-resposta de B16F10 ao tratamento com Dox	38
5.12 CURVA DOSE-RESPOSTA DE B16F10 AO TRATAMENTO COM AL.....	38
5.13 INTERFERÊNCIA DO ÁCIDO LIPOICO NA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA DOX	39
5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6. RESULTADOS	41
6.1 CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PEAL DOXORRUBICINA	41
6.1.1 Definição do protocolo de indução de cardiotoxicidade pela Dox	41
6.1.2 Determinação da qualidade da preparação enriquecida para mitocôndria por microscopia eletrônica de transmissão	43
6.1.3 Determinação do tempo ideal para avaliação de mitocôndria cardíaca	43
6.2. OUTROS EFEITOS DA DOXORRUBICINA	46
6.4 ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA DOX <i>IN VITRO</i>	50
6.4.1 Curva dose-resposta de B16F10 após tratamento com Dox	50
6.4.2 Curva dose-resposta de B16F10 após tratamento com AL	51
6.4.3 Interferência do ácido lipoico na atividade antineoplásica da Dox	51
7. DISCUSSÃO	54
8. CONCLUSÕES	62
9. PERSPECTIVAS	63
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER E O DESAFIO POSTO PARA SEU TRATAMENTO

O impacto do câncer no mundo tem crescido de forma significativa, sobretudo devido ao envelhecimento populacional e às mudanças de hábitos de vida. A Agência Internacional para Pesquisa em Câncer divulgou que, no ano de 2008, ocorreram cerca de 7 milhões de óbitos por câncer no mundo. No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010, válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer (BRASIL 2009).

Dentre as terapias empregadas para o combate ao câncer, a quimioterapia é a modalidade de tratamento mais utilizada, sendo a doxorrubicina (Dox) um dos agentes antineoplásicos mais importantes (BOMMU *et al.* 2008; DAOSUKHO *et al.* 2007; SIMUNEK *et al.* 2009; SURESH *et al.* 2003). Entretanto, o maior desafio do tratamento antineoplásico, que é matar seletivamente as células neoplásicas com reduzido ou inexistente dano às células saudáveis, ainda permanece para ser superado.

1.2 USO CLÍNICO E NATUREZA QUÍMICA DA DOXORRUBICINA

A Dox ($C_{27}H_{29}NO_{11} \cdot HCl$) é um quimioterápico, da classe das antraciclina, usado com sucesso no tratamento de tumores malignos sólidos e hematológicos, a exemplo de câncer de mama, de bexiga, linfoma, sarcoma e tumores sólidos infantis (BONADONNA *et al.* 1970; TAKEMURA & FUJIWARA 2007; VON DER MAASE *et al.* 2000; WEINEL *et al.* 2009). É uma droga citotóxica potente isolada a partir de colônias de *Streptomyces peucetius*, amplamente utilizada na prática oncológica

humana desde 1970 (ARCAMONE *et al.* 1969). Sua descoberta representou um dos grandes avanços na luta contra o câncer, resultando no aumento da sobrevivência, principalmente em crianças, de 30% na década de 60 para aproximadamente 70% no início dos anos 2000 (JEMAL *et al.* 2009; WOUTERS *et al.* 2005).

A molécula de Dox contém um aminossacarídeo, a daunosamina, ligado por meio de uma ponte glicosídica ao núcleo da droga denominado doxorribicina, uma aglicona composta por uma estrutura tetracíclica que contém um anel hidroquinona e outro quinona (Figura 1). Em sua estrutura química o anel quinona é de especial interesse por seu potencial em gerar radicais livres, uma vez que pode funcionar como doador e receptor de elétrons (MENNA *et al.* 2007; MINOTTI *et al.* 2004; SINGAL *et al.* 2000).

Apesar de sua eficácia no tratamento antineoplásico, a cardiotoxicidade é o principal fator limitante para o uso da Dox na clínica médica.

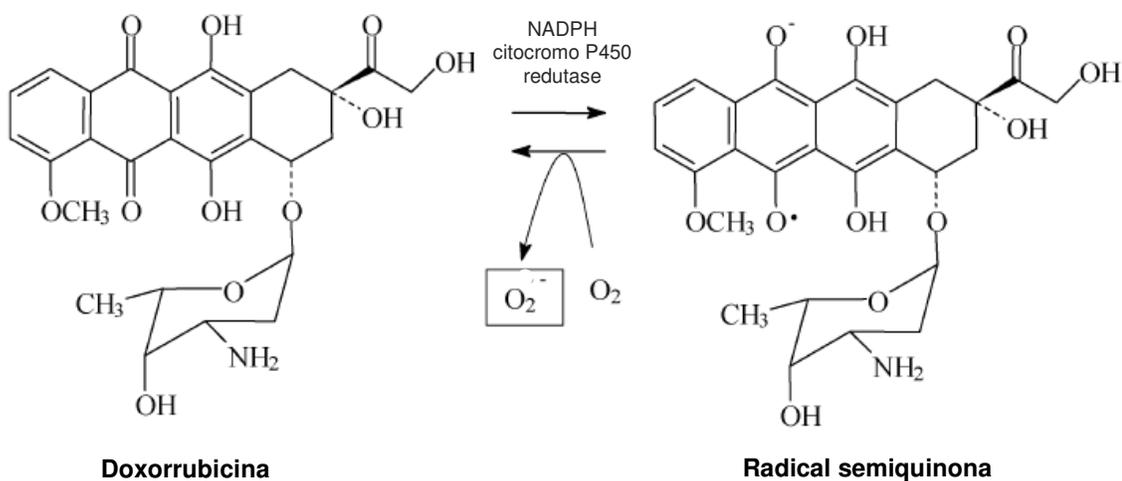


Figura 1 – Estrutura e metabolismo da doxorribicina (Dox). Adaptado de Deres e colaboradores (2005).

1.3 MECANISMO DE AÇÃO DA DOXORRUBICINA

Apesar da ampla utilização para o tratamento de câncer há mais de 40 anos, os mecanismos de ação da doxorubicina, tanto associados ao efeito antitumoral quanto ao efeito cardiotóxico, ainda não estão bem estabelecidos.

Vários mecanismos são propostos para explicar a ação citotóxica da Dox, incluindo-se entre eles a formação de um complexo com o DNA, a inibição da enzima topoisomerase II, e a indução de apoptose, além do estresse oxidativo pela geração de radicais livres (AROLA *et al.* 2000; BOMMU *et al.* 2008; DAMROT *et al.* 2006; DAOSUKHO *et al.* 2007).

A redução do anel quinona por um elétron, catalisada por NADPH citocromo P450 redutase, NADH desidrogenase mitocondrial ou a isoforma endotelial da óxido nítrico sintase (NOS), leva a formação de semiquinonas que são radicais relativamente estáveis em condições anaeróbias, mas na presença de oxigênio formam superóxido. A redução do oxigênio para a formação de superóxido resulta na regeneração da molécula de Dox (Figura 1). Esse ciclo redox é potencialmente perigoso para as células expostas, uma vez que pequenas quantidades de Dox são capazes de formar muitos radicais superóxido. Estes radicais, por sua vez, podem ser convertidos em peróxido de hidrogênio e oxigênio, em reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), ou reagir com o óxido nítrico (NO) formando peroxinitrito, um oxidante altamente citotóxico (DENG *et al.* 2007; NAGI & MANSOUR 2000; SINGAL *et al.* 2000).

O NO tem um papel importante na função cardíaca, mas também pode estar associado a patologias nesse órgão. Sua produção basal, via isoforma constitutiva da NOS, modula a função contrátil de cardiomiócitos e regula a distribuição do fluxo

sanguíneo (VARIN *et al.* 1999). Por outro lado, elevadas concentrações de NO, produzido via isoforma induzível da NOS, estão associadas a várias formas de doença cardíaca, incluindo a cardiomiopatia dilatada e a insuficiência cardíaca congestiva (ANDREADOU *et al.* 2007; COLE *et al.* 2006; SEDDON *et al.* 2007; UMAR & VAN DER LAARSE, 2010). O aumento da expressão de NOS induzível e a formação de peroxinitrito foram observados, por Weinstein e colaboradores (2000), em camundongos cinco dias após o tratamento com 20 mg/kg de Dox. Mihm e colaboradores (2002) detectaram falha contrátil de miofibrilas expostas *in vitro* ao peroxinitrito, demonstrando a vulnerabilidade da função contrátil miofibrilar ao dano mediado por esse radical.

Os radicais hidroxil, formados a partir do peróxido de hidrogênio, são considerados uns dos radicais mais danosos, pois podem iniciar reações em cadeia que culminarão com danos oxidativos à membrana (IQBAL *et al.* 2008).

O ciclo redox da doxorubicina é acompanhado também pela liberação de ferro da ferritina, principal proteína de armazenamento fisiológico de ferro, levando à formação de complexos Dox-ferro. Estes complexos são capazes de converter superóxido e peróxido de hidrogênio em radicais hidroxil podendo iniciar a peroxidação lipídica e causar disfunção mitocondrial (MINOTTI *et al.* 2004; QUILES *et al.* 2002). A habilidade de metais potencializarem fortemente a peroxidação aeróbica é reconhecida há muito tempo (GUTTERIDGE 1984; HALLIWELL & GUTTERIDGE 1984).

Há grande discussão quanto à diferença nos mecanismos associados à atividade antitumoral da Dox e os responsáveis pela cardiotoxicidade (Figura 2). Muitos trabalhos sugerem que essas duas atividades desenvolvem-se por mecanismos

distintos (OUTOMURO *et al.* 2007; SINGAL *et al.* 1997; TOKARSKA-SCHLATTNER *et al.* 2006; WANG *et al.* 2004).

Os mecanismos de ação antitumoral sugeridos incluem intercalação no DNA inibindo a síntese de macromoléculas, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) levando a dano no DNA ou peroxidação lipídica, interferência na atividade da helicase afetando a abertura ou separação da fita de DNA, ação direta na membrana das células tumorais, inibição da topoisomerase II e indução de apoptose resultante da inibição dessa enzima (CELIK & ARINÇ 2008; DAOSUKHO *et al.* 2007; GEWIRTZ 1999; TAKEMURA & FUJIWARA 2007).

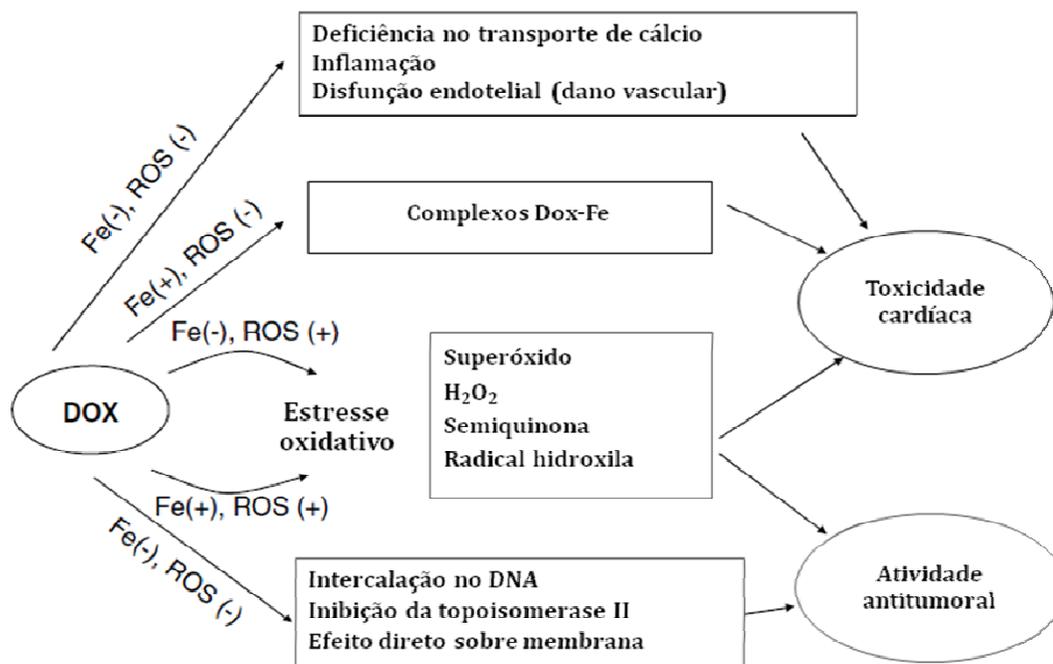


Figura 2 – Esquema dos mecanismos de ação propostos para a toxicidade cardíaca e para a atividade antitumoral da Dox. ROS, espécies reativas de oxigênio. Adaptado de Kaiserová e colaboradores (2006).

1.4 CARDIOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA

A cardiotoxicidade é um dos eventos adversos mais graves e de grande importância na sobrevivência de pacientes submetidos ao tratamento com antraciclina, podendo desenvolver-se de forma aguda ou crônica. A forma aguda é caracterizada por arritmias, hipotensão e alterações eletrocardiográficas durante o tratamento ou pouco tempo após, mas esses efeitos são normalmente reversíveis. Insuficiência ventricular, miocardite e pericardite podem ocorrer raramente. A forma crônica, por sua vez, manifesta-se após um período de latência de anos a décadas e seus efeitos, normalmente irreversíveis, podem progredir para cardiomiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva (GRENIER & LIPSHULTZ 1998; MENNA *et al.* 2007; SINGAL *et al.* 1997).

Embora o dano cardíaco induzido pela Dox pareça ser multifatorial, uma das hipóteses mais prevalentes é a de que o dano celular seja induzido por radicais livres gerados por mecanismos enzimáticos, a partir da cadeia respiratória mitocondrial, bem como por uma via não enzimática que incorpora ferro (ANJOS FERREIRA *et al.* 2007; SINGAL *et al.* 2000; XU *et al.* 2001).

Diversos fatores de risco são referidos na literatura como potencializadores do desenvolvimento de cardiotoxicidade. Dentre eles podem ser citados o uso concomitante de outros agentes quimioterapêuticos, radiação mediastinal, infusão de doses altas de Dox a intervalos maiores e doses cumulativas elevadas, sendo este último um dos fatores considerados mais importantes (KRISCHER *et al.* 1997; SWAIN *et al.* 2003). Doses de Dox superiores a 500 mg/m² aumentam rapidamente a incidência de cardiotoxicidade (VON-HOFF *et al.* 1979 *apud* SCHIMMEL *et al.* 2004). Porém, há trabalhos mostrando que mesmo doses menores que 300 mg/m²

podem estar associadas a anormalidades cardíacas subclínicas (LIPSHULTZ *et al.* 2005). Dessa forma, apesar do limite de 500 mg/m² ter sido estabelecido como máximo (LEFRAK *et al.* 1973 *apud* MINOTTI *et al.* 2004), ainda não há uma dose cumulativa que possa ser considerada totalmente segura.

As alterações cardíacas decorrentes da ação da Dox incluem perda de miofibrilas, vacuolização citoplasmática causada pela dilatação do retículo sarcoplasmático, alterações mitocondriais, redução dos níveis de antioxidantes endógenos, os quais podem resultar em cardiomiopatia e insuficiência cardíaca congestiva (AROLA *et al.* 2000; ICHIHARA *et al.* 2007). O prognóstico das complicações cardíacas geralmente é grave. As estimativas de probabilidade de dano miocárdico decorrente do tratamento podem chegar a 30%, dependendo da dose cumulativa total da droga (DENG *et al.* 2007; MINOTTI *et al.* 2004). Uma vez ocorrendo a cardiomiopatia, as opções de tratamento são poucas e a insuficiência cardíaca, usualmente refratária a terapia convencional, apresenta taxas de mortalidade variando de 20-40% (AHMED *et al.* 2009; ANJOS FERREIRA *et al.* 2007).

A susceptibilidade particular do miocárdio às antraciclina deve-se, entre outras razões, ao seu metabolismo oxidativo elevado, concentrações reduzidas de catalase e superóxido dismutase nos cardiomiócitos e grande quantidade de mitocôndrias, nas quais ocorre acúmulo de Dox e consequente produção de espécies reativas de oxigênio (ABDELLA & FISHER 1985; DANZ *et al.* 2009; NASCIMENTO & MARTINS 2005).

Tecidos com menor desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, como o coração, são mais susceptíveis a dano por radicais de oxigênio induzidos por antraciclina (AL-MAJED *et al.* 2002). Vários trabalhos têm referido que a

administração de Dox afeta a atividade de três importantes enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase (AYAZ *et al.* 2005; MALARKODI *et al.* 2004; SINGAL *et al.* 2000; SIVESKI-ILISKOVIC *et al.* 1995; SU *et al.* 2009). Somados, esses dois fatores contribuem fortemente para o desenvolvimento de dano cardíaco.

Há muitas evidências apontando para as mitocôndrias cardíacas como principais alvos da toxicidade da Dox (PAPADOPOULOU *et al.* 1999; QUILES *et al.* 2002; SU *et al.* 2009; YEN *et al.* 1996) e, como a função cardíaca é altamente dependente da energia gerada nas mitocôndrias, há uma íntima associação entre o dano nessas organelas e a cardiotoxicidade. A Dox pode ser reduzida a semiquinona pela NADH desidrogenase mitocondrial (OUTOMURO *et al.* 2007) e apresenta grande afinidade pela cardiolipina, um fosfolípido da membrana interna da mitocôndria, resultando no acúmulo da droga no interior das células cardíacas (GOORMAGHTIGH & RUYSSCHAERT 1984 *apud* QUILES *et al.* 2002; GOORMAGHTIGH *et al.* 1990). A ligação da Dox à cardiolipina pode induzir a dissociação de proteínas associadas à membrana interna da mitocôndria, a exemplo do citocromo c e creatina quinase mitocondrial, que podem afetar a cadeia transportadora de elétrons, bem como iniciar a morte celular programada (AROLA *et al.* 2000; TOKARSKA-SCHLATTNER *et al.* 2005).

1.5 REDUÇÃO DA CARDIOTOXICIDADE DA DOXORRUBICINA

1.5.1 Visão geral

Devido a grande importância da doxorubicina na quimioterapia para o tratamento de vários tipos de câncer, diversas tentativas têm sido realizadas visando prevenir ou reduzir sua cardiotoxicidade. As tentativas incluem desde formas especiais de administração (variações na velocidade de infusão e intervalo de administração) e desenvolvimento de novas formulações (análogos menos cardiotóxicos), ao encapsulamento em lipossomas (mais eficaz para tumores sólidos), co-administração com quelantes de ferro (impedindo a formação dos complexos ferro-antraciclina) ou com antioxidantes (HIDEG & KÁLAI 2007; SCHIMMEL *et al.* 2004).

O procedimento padrão para a administração de Dox é a infusão intravenosa por um período de 15 a 20 minutos e repetição a cada três semanas. Estudos clínicos comparando os efeitos dessa infusão, considerada rápida, com a administração lenta e contínua, por exemplo, por um período de seis horas, têm demonstrado menor incidência de cardiotoxicidade com este último procedimento (LEGHA *et al.* 1982; TAKEMURA & FUJIWARA 2007). Entretanto, apesar de reduzirem o pico de concentração plasmática da droga, infusões contínuas prolongam a exposição que pode inibir a recuperação de cardiomiócitos do dano gerado pelas antraciclinas (WOUTERS *et al.* 2005).

Lipossomos representam o sistema ideal de entrega de drogas antitumorais. Isso porque o sistema microvascular dos tumores é descontínuo apresentando poros que possibilitam a passagem dos lipossomos do sangue para o espaço extravascular que envolve as células tumorais (TARDI *et al.* 1996 *apud* WOUTERS *et al.* 2005). O

direcionamento exato dos lipossomos às células tumorais, entretanto, ainda se configura na grande limitação dessa estratégia.

Dentre os quelantes de ferro testados como cardioprotetores, o dexrazoxane é o agente mais promissor até o momento. Após ser testado em animais, já se demonstrou sua capacidade em reduzir a cardiotoxicidade induzida pela Dox em vários ensaios clínicos, porém não é capaz de impedir completamente a toxicidade cardíaca e a utilização combinada com a Dox parece estar associada a um aumento de toxicidade hematológica (ANDREADOU *et al.* 2007; SCHIMMEL *et al.* 2004).

1.5.2 O ácido lipoico como cardioprotetor

O ácido lipoico (AL) é reconhecido como potente antioxidante e agente protetor contra diversas disfunções orgânicas (ARIVAZHAGAN & PANNEERSELVAM 2000; LAL *et al.* 2008; VASDEV *et al.* 2000). É uma substância de baixo peso molecular que atravessa facilmente as barreiras biológicas. Ao ser reduzido a ácido dihidrolipoico pela lipoamida desidrogenase mitocondrial, também exerce potente atividade antioxidante. Tanto o AL quanto a sua forma reduzida reagem com uma ampla variedade de espécies reativas como radicais superóxido, hidroxil, peroxil, ácido hipocloroso e oxigênio *singlet* (BIEWENGA *et al.* 1997; MALARKODI *et al.* 2004; PACKER *et al.* 1995).

Considerado um antioxidante multifuncional, o ácido lipoico tem forte capacidade de quelar metais, aumentar os níveis intracelulares de glutathiona, regenerar ou reciclar as vitaminas C e E, além de ter um papel regulatório na pressão sanguínea por afetar a reatividade vascular, o metabolismo geral, bem como os mecanismos de

defesa antioxidante (AL-MAJED *et al.* 2002; ARIVAZHAGAN & PANNEERSELVAM 2000; PACKER *et al.* 1997).

A administração de AL tem sido benéfica na prevenção de patologias em diversos modelos de lesão oxidativa. Sua propriedade como potente antioxidante foi demonstrada *in vitro* em culturas de fibroblastos humanos expostos a excesso de ferro (LAL *et al.* 2008). Arivazhagan e Panneerselvam (2000), em trabalho com ratos jovens e velhos, sugerem que AL pode ser utilizado para minimizar as desordens associadas ao envelhecimento. Suplementação com AL pode reduzir a pressão sanguínea em ratos espontaneamente hipertensos (VASDEV *et al.* 2000). Ramakrishnan e colaboradores (1992) demonstraram efeito protetor do AL no tecido hematopoiético de camundongos contra o dano induzido pela radiação.

O efeito protetor do ácido lipoico sobre a toxicidade induzida pela Dox tem sido referido na literatura, mas existem poucos trabalhos demonstrando cardioproteção.

Prahalathan e colaboradores (2006), em trabalho com ratos submetidos ao tratamento crônico com Dox, apontam o AL como potencial candidato no combate às anormalidades testiculares induzidas por esse quimioterápico, uma vez que a espermatogênese dos animais pré-tratados manteve-se próxima da apresentada pelos animais do grupo controle.

Avaliando o efeito de distúrbios na homeostase de cálcio induzidos pela Dox, Kim e colaboradores (2006) obtiveram uma redução de 20% no cálcio liberado dos estoques intracelulares de cardiomiócitos previamente incubados por 15 minutos com 100 μ M de AL.

A influência do AL na nefrotoxicidade induzida pela Dox foi avaliada por Malarkodi e colaboradores (2003) que obtiveram, dentre outros parâmetros, normalização da atividade de enzimas urinárias a exemplo da γ -glutamilttransferase, bem como ausência de necrose tubular, presente nos animais tratados com Dox.

Em protocolo crônico de tratamento com Dox (1,2 mg/kg, uma vez por semana durante 14 semanas), Balachandar e colaboradores (2003) obtiveram proteção cardíaca nos animais pré-tratados com AL (35 mg/kg) 24 horas antes da administração da Dox. A cardioproteção foi representada pela redução significativa das concentrações séricas de creatina quinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH), redução de malondialdeído (MLDA) no tecido cardíaco, bem como manutenção das concentrações das enzimas antioxidantes catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase, normalmente reduzidas pela doxorubicina.

Avaliando o efeito preventivo e curativo do ácido lipoico sobre a cardiotoxicidade induzida pelo tratamento crônico com Dox em ratos, Ayaz e colaboradores (2005) observaram que o pré-tratamento com AL reduziu a depleção de glutathione e as concentrações de MLDA. O pós-tratamento com AL, por sua vez, apenas reduziu as concentrações de MLDA, não sendo capaz de aumentar as concentrações de glutathione.

Considerando as mitocôndrias como principais alvos de ação da Dox, este trabalho objetivou avaliar a ocorrência de peroxidação diretamente nessas organelas. Além disso, como o ácido lipoico é um agente que tem facilidade em atravessar barreiras biológicas e é transformado em um antioxidante ainda mais potente através de uma desidrogenase mitocondrial, esse agente foi escolhido para os experimentos de cardioproteção.

1.5.3 Outros antioxidantes como cardioprotetores

Diferentes antioxidantes podem ser promissores na inibição da cardiotoxicidade induzida por antraciclina e há um crescente interesse em seu uso para prevenir a cardiomiopatia induzida pela DOX, porém os resultados obtidos até o momento não são conclusivos.

Em estudos utilizando vitamina E para reduzir a toxicidade da Dox foram demonstrados redução de peroxidação lipídica (AYAZ *et al.*, 2005), prevenção de alterações eletrocardiográficas (PURI *et al.*, 2005), redução da perda de peso provocada pela quimioterapia e aumento da capacidade antioxidante do coração com elevação das atividades de glutatona e SOD (WAHAB *et al.*, 2000), porém ainda não há um consenso sobre a interferência desse antioxidante na eficácia terapêutica da Dox.

Efeito protetor da vitamina A sobre o dano peroxidativo a lipídios e proteínas do coração de ratos tratados com Dox, bem como redução da concentração sérica de LDH e CK e aumento da sobrevivência foram referidos por Tesoriere e colaboradores (1994). Esse mesmo grupo demonstrou, posteriormente, que a presença de vitamina A em cultura de células tumorais K562 tratadas com Dox não impediu a citotoxicidade desse quimioterápico (CIACCIO *et al.*, 1994). Anjos Ferreira e colaboradores (2007) demonstraram que a suplementação oral com licopeno foi capaz de proteger miócitos de ratos tratados com Dox, porém não preveniu a disfunção cardíaca induzida por essa droga.

Além de vitaminas e seus derivados, componentes antioxidantes do azeite de oliva também foram testados quanto ao seu efeito em reduzir a toxicidade da Dox. Andreadou e colaboradores (2007) verificaram que a oleuropeína, um componente

fenólico encontrado em alta concentração no azeite de oliva, preveniu a cardiotoxicidade aguda em ratos pela redução da concentração de MLDA no tecido cardíaco e redução sérica de marcadores de dano cardíaco, como aspartato aminotransferase (AST), CK e LDH. Além disso, Mataix e colaboradores (2006) observaram que o azeite de oliva pode reduzir o dano mitocondrial causado pela Dox.

A suplementação com selênio na dieta parece ter um papel importante na redução da toxicidade induzida pela Dox. Boucher e colaboradores (1995) observaram aumento significativo na atividade de glutathione peroxidase mitocondrial cardíaca e redução na concentração de MLDA no coração de ratos cuja dieta foi suplementada com selênio. Aumento na atividade antioxidante total do coração com consequente redução na produção de ROS também foi observado por Danesi e colaboradores (2006). Avaliando linhagens de células tumorais tratadas com Dox e selênio, simultaneamente, Vadgama e colaboradores (2000) demonstraram aumento dos efeitos tóxicos da Dox, na maioria das linhagens, representado por quantidade elevada de apoptose e redução na síntese de DNA.

Estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado que a coenzima Q, componente essencial para a respiração mitocondrial, exerce efeito protetor sobre mitocôndrias e não afeta a atividade antineoplásica da Dox (GRANADOS-PRINCIPAL *et al.*, 2010).

Apesar de muitos antioxidantes apresentarem resultados cardioprotetores promissores *in vitro* e em modelos animais, vários trabalhos apontam para a necessidade de estudos adicionais, seja devido à não detecção de proteção ou ao risco de interferência de tais antioxidantes na eficácia do antineoplásico (BREED *et al.*, 1980; D'ANDREA, 2005; HEANEY *et al.*, 2008; LEGHA *et al.*, 1982).

2. HIPÓTESE

A utilização de um antioxidante que atravesse facilmente barreiras biológicas e que seja mais específico ou direcionado para a mitocôndria reduzirá a cardiotoxicidade da doxorubicina.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Estudar possível mecanismo de redução da cardiotoxicidade da doxorubicina, sem afetar sua atividade antineoplásica.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a ocorrência de peroxidação lipídica induzida pela Dox em mitocôndrias cardíacas *in vivo*, de maneira a poder testar o efeito de antioxidantes sobre esta peroxidação;
- Verificar o efeito cardioprotetor do ácido lipoico sobre a peroxidação de mitocôndrias cardíacas causada pela Dox *in vivo*;
- Avaliar a interferência do ácido lipoico sobre a atividade antineoplásica da Dox *in vitro*.

4. JUSTIFICATIVA

Este projeto pode vir a contribuir para o desenvolvimento de protocolos terapêuticos visando, sobretudo, a redução da cardiotoxicidade da Dox durante e após o tratamento quimioterápico para o controle de neoplasias. Isso teria um grande impacto na saúde e qualidade de vida da população brasileira e mundial, tendo em vista o grande aumento da vida média do ser humano, o conseqüente aumento da incidência de neoplasias e a necessidade de utilização de quimioterápicos para o seu controle, os quais podem ser cardiotóxicos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Os protocolos experimentais foram submetidos à análise e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ-RJ (protocolo CEUA L-082/08). Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com idade entre 6 e 10 semanas, fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA). Os animais foram mantidos em microisoladores com ciclo claro/escuro de 12 horas, à temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e sem restrição hídrica ou alimentar. Os camundongos foram divididos randomicamente em grupos de 5 ou 6 animais.

5.2 INDUÇÃO DE CARDIOTOXICIDADE COM DOXORRUBICINA

Para definir o melhor protocolo de indução de cardiotoxicidade, foram testados três protocolos de administração de doxorubicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA): um grupo de camundongos recebeu quatro injeções intraperitoneais de 5 mg/kg, outro recebeu duas injeções de 10 mg/kg e ao terceiro foi administrada uma dose única de 20 mg/kg. O grupo controle recebeu salina a 0,9% e o intervalo entre as injeções de Dox foi de três dias (Figura 3). Os animais foram pesados antes e no final do experimento, cinco dias após a última injeção de Dox (pós-Dox). Amostras de sangue foram coletadas 72 horas pós-Dox para determinação quantitativa da atividade sérica de CK, indicativa de lesão cardíaca. Um grupo adicional de animais recebeu a dose única de 20 mg/kg de Dox e foi observado diariamente para avaliação de letalidade. O aspecto geral dos animais também foi observado no

momento da eutanásia em todos os experimentos, sendo consideradas, principalmente, a presença de diarreia e letargia.

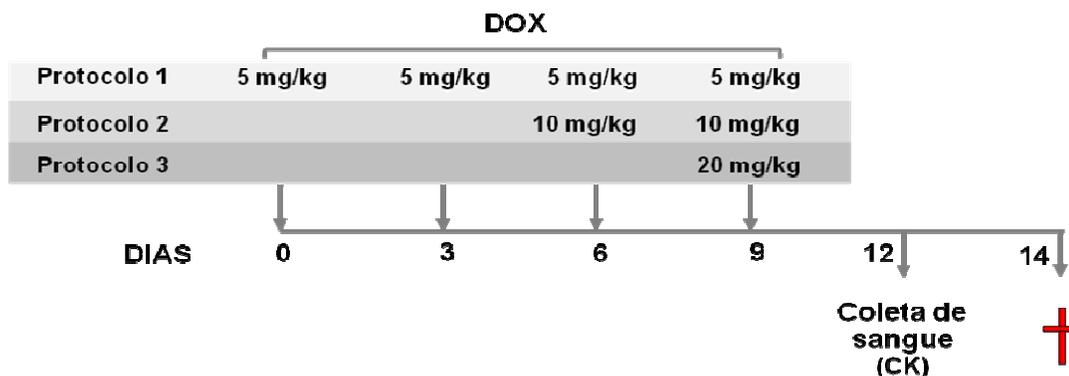


Figura 3 – Esquema dos protocolos de indução de cardiotoxicidade com doxorrubicina (DOX). CK, creatina quinase

5.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO IDEAL PARA ANÁLISE DE MITOCÔNDRIA CARDÍACA

Considerando que as mitocôndrias cardíacas são um dos principais alvos da doxorrubicina e que o dano nessas organelas pode ser detectado em tempos mais precoces, o momento ideal para análise de mitocôndria cardíaca foi determinado. Foram testados os tempos de 12, 24 e 48 horas após a administração da Dox. Camundongos foram pesados e receberam a dose de 20 mg/kg de Dox na cavidade peritoneal. Após os três tempos, os animais foram novamente pesados e eutanasiados para detecção de peroxidação lipídica no tecido e em uma fração enriquecida para mitocôndria cardíaca, e para determinação quantitativa da atividade sérica de CK.

5.4 EFEITO DO ÁCIDO LIPOICO (AL) SOBRE A CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA POR DOXORRUBICINA

O efeito cardioprotetor do AL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) foi avaliado da forma descrita abaixo. Camundongos receberam injeções intraperitoneais de AL nas concentrações de 100 e 200 mg/kg por dois dias. Após 48 horas, os animais receberam doxorubicina (20 mg/kg) pela mesma via. A avaliação foi realizada 24 horas pós-Dox através da mensuração da variação ponderal, determinação quantitativa da atividade sérica de CK e detecção de peroxidação lipídica no tecido cardíaco e em uma fração enriquecida para mitocôndria cardíaca (Figura 4).

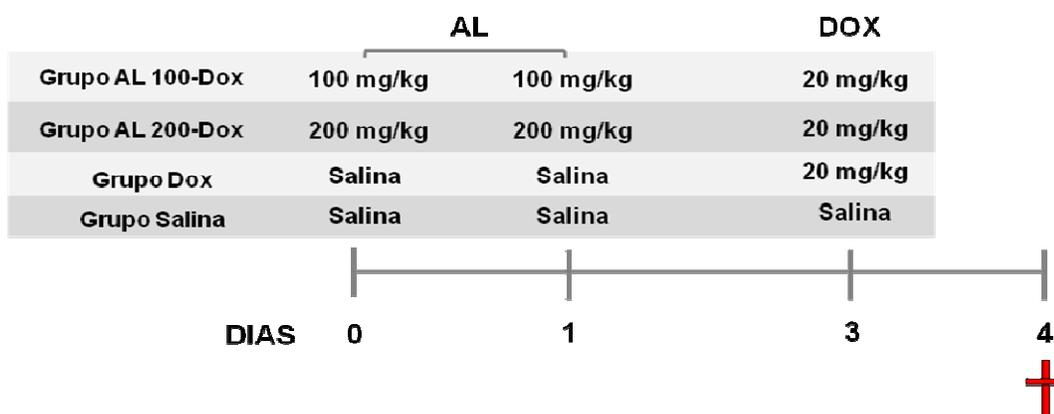


Figura 4 – Esquema do protocolo de tratamento com ácido lipoico (AL) em camundongos subsequentemente tratados com doxorubicina (DOX).

5.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DA CREATINA QUINASE (CK) NO SORO

Para avaliação da atividade sérica da creatina quinase, amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital 72 horas após a administração de Dox ou no momento da eutanásia, imediatamente após a retirada do coração. A coleta através do plexo orbital foi realizada em animais previamente anestesiados com a mistura de xilazina

(20 mg/kg) e ketamina (25 mg/kg), pela via intramuscular, além de anestesia local com uma gota do anestésico ocular Anestalcon (Alcon, São Paulo, SP, Brasil). Após coletado, o sangue foi centrifugado a 600 g por 10 minutos a 4° C. O soro foi coletado e armazenado a 4° C até o momento da análise, no máximo 24 horas após a coleta. A atividade sérica da CK foi determinada por metodologia cinética UV com a utilização de dois *kits* da Gold Analisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, MG, Brasil): *kit* para determinação da creatina quinase total (CK total) e *kit* para determinação da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB), específica para tecido cardíaco.

5.6 OBTENÇÃO DE FRAÇÃO ENRIQUECIDA PARA MITOCÔNDRIA CARDÍACA

Mitocôndrias cardíacas foram isoladas segundo protocolo descrito por Fernández-Vizarra e colaboradores (2010), com pequenas modificações. Todas as etapas foram realizadas a 4° C. Os corações dos camundongos foram retirados e transferidos imediatamente para o tampão de isolamento de mitocôndria (225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina sérica bovina - BSA, pH 7,4). Em seguida, os órgãos foram secos em papel filtro, pesados e os ventrículos fragmentados. Após serem lavados três vezes por centrifugações a 179 g por 2 minutos, os ventrículos foram macerados em macerador de tecidos de Potter e o homogenato centrifugado a 1000 g por 5 min. Uma parte do sobrenadante foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada a -70° C para posterior detecção de peroxidação lipídica do tecido cardíaco e o restante do sobrenadante foi centrifugado a 9000 g por 10 minutos para obter o sedimento bruto de mitocôndria. O sobrenadante foi desprezado e o

sedimento suspenso no tampão para isolamento de mitocôndria e centrifugado duas vezes a 15000 g por 2 minutos. Após a última lavagem, as mitocôndrias presentes no precipitado foram suspensas em salina a 0,15 M tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS), para quantificação de proteína e detecção de peroxidação lipídica.

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

A confirmação da obtenção de mitocôndrias foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. Frações enriquecidas para mitocôndrias, obtidas como descrito no item 5.6 foram centrifugadas a 15000 g por 2 minutos a 4° C. O sedimento foi suspenso em fixador contendo glutaraldeído a 2% e tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por 30 minutos a temperatura ambiente. Após fixação, as mitocôndrias foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M. Em seguida foram pós-fixadas em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M contendo tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM por 30 minutos, protegidas da luz. A amostra foi centrifugada e lavada três vezes em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M para remover o excesso do pós-fixador. O material foi desidratado em séries crescentes de acetona (50%, 70%, 90% - uma vez - e 100% - duas vezes), por 15 minutos a temperatura ambiente. A substituição foi feita com uma mistura de acetona absoluta com resina (Polybed 812) na proporção 1:1 por 16 horas em agitador de tubos vertical (Cientec, Piracicaba, SP, Brasil). O material foi incluído em resina pura com catalisador por 8 horas e, em seguida, mantido em estufa a 60° C por 72 horas para polimerizar. Vinte e quatro horas após ser cortado e contrastado, o material foi observado em microscópio Zeiss e as imagens foram adquiridas no “software Imaging Viewer”.

5.8 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas nas preparações de mitocôndrias cardíacas foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY *et al.* 1951), usando uma curva de BSA como padrão, com concentração inicial de 6,4 mg/mL e final de 0,1 mg/mL.

As amostras foram diluídas nas proporções 1:2 e 1:4 em PBS, utilizado como branco do teste. Um mL da mistura de reagentes A+B+C (A: 50 mL de carbonato de sódio a 0,125 M com 0,2 g de hidróxido de sódio; B: 0,5 mL de tartarato de sódio e potássio a 2% em água; C: 0,5 mL de sulfato de cobre a 1% em água) foi adicionado à curva padrão, amostras e branco. Após 10 minutos, foram adicionados 100 µL do reagente fenol (Folin Cocalteu's, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) diluído em água na proporção 1:1. As amostras foram mantidas protegidas da luz por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura da densidade óptica à luz com comprimento de onda de 750 nm foi realizada em espectrofotômetro.

5.9 DETECÇÃO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A concentração de malondialdeído (MLDA), um dos produtos da peroxidação lipídica, foi determinada pela técnica que detecta substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Uma curva de MLDA foi utilizada como padrão, com concentração inicial de 50 µM e final de 0,78 µM. As amostras enriquecidas para mitocôndria ou de homogenato de tecido cardíaco foram incubadas a 90° C por uma hora com 185 µL da mistura de ácido acético diluído a 50% em água destilada, ácido tiobarbitúrico a 1,3% e PBS, na proporção 1:1,5:1,2. Após o tempo de incubação, os tubos contendo as amostras foram colocados sobre gelo por cinco minutos e centrifugados a 9000 g (mitocôndria) ou 3000 g (homogenato de tecido cardíaco) por

10 minutos. A leitura da densidade óptica à luz com comprimento de onda de 532 nm do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro.

5.10 VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DO *ALAMAR BLUE*

A viabilidade celular após os diferentes tratamentos foi determinada pelo teste do *Alamar blue* que contém um indicador de estado redox para avaliação de células em cultura. As células foram incubadas com meio completo contendo 10% de *Alamar blue* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 4 horas a 37° C. A análise foi realizada em espectrofotômetro com leituras da densidade óptica nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm.

5.11 ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA DOXORRUBICINA *IN VITRO*

5.11.1 Obtenção de células de melanoma B16F10

Células de melanoma de camundongo B16F10 foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (FIOCRUZ-BA). As células foram mantidas em garrafas de cultura com meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal (SBF, Cripion, Andradina, SP, Brasil) a 10%, L-glutamina a 2 mM, ácido pirúvico a 1 mM, HEPES a 10 mM, gentamicina a 50-80 µg/mL e bicarbonato de sódio a 0,2%, pH 7,4 (meio completo) e incubadas a 37° C e a 5% de CO₂.

Culturas confluentes tiveram o meio retirado e foram lavadas três vezes com salina a 0,9% gelada. As células foram soltas do fundo da garrafa por incubação com solução de tripsina-EDTA a 0,1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 5 minutos a 37° C. A ação enzimática foi bloqueada pela adição de meio RPMI completo e, após

coletadas, as células foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos a 4° C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em meio completo.

5.11.2 Curva dose-resposta de B16F10 ao tratamento com Dox

Células B16F10 foram plaqueadas na concentração de 10^3 células por poço em placas de 96 poços, no mínimo em triplicata. Após 48 horas de cultivo, as células foram incubadas com diferentes concentrações de Dox (0,0625 – 2 μ M) por 24 horas. Em seguida a Dox foi retirada e foi acrescentado meio completo aos poços. A análise foi realizada 48 horas pós-Dox pelo teste do *Alamar blue*. Devido à alta capacidade de ligação da Dox a proteínas (BAĞRIAÇIK *et al.* 2007), o meio de cultura utilizado para o tratamento das células continha apenas 1% de SBF.

5.12 CURVA DOSE-RESPOSTA DE B16F10 AO TRATAMENTO COM AL

Células B16F10 foram plaqueadas na concentração de 10^3 células por poço em placas de 96 poços, em triplicata. Após 24 horas de cultivo, as células foram incubadas com diferentes concentrações de AL (40 – 1280 μ M) por 24 horas. Em seguida o meio contendo AL foi retirado e foi acrescentado meio completo aos poços. A análise foi realizada 72 horas após o tratamento das células pelo teste do *Alamar blue*.

5.13 INTERFERÊNCIA DO ÁCIDO LIPOICO NA ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA DOX

Células B16F10 foram plaqueadas na concentração de 10^3 células por poço em placas de 96 poços, no mínimo em triplicata. Após 24 horas de cultivo, as células foram incubadas com diferentes concentrações de ácido lipoico (40 – 320 μM) por 24 horas. Em seguida o ácido lipoico foi retirado e Dox (2 μM ou a LC_{50}) foi adicionada aos poços por 24 horas. Após esse período, o sobrenadante contendo Dox foi substituído por meio completo. A análise foi realizada 48 horas pós-Dox pelo teste do *Alamar blue*.

5.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

São apresentadas a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) ou a mediana dos dados. O tipo de distribuição dos dados (se gaussiana ou não) foi determinado pelo método de Kolmogorov-Smirnov. A significância das diferenças nos resultados obtidos, levando-se em conta todos os grupos de um dado experimento, foi estimada pelo teste ANOVA, para dados com distribuição gaussiana ou Kruskal-Wallis, para dados com distribuição não-gaussiana. A probabilidade das diferenças entre os resultados observados em diferentes grupos serem devido ao acaso foi avaliada pelo testes de Tukey, para dados com distribuição gaussiana, ou teste de Dunn, quando não houve distribuição gaussiana dos dados. Os testes t e Mann Whitney foram utilizados para comparar dois grupos experimentais.

A LC_{50} foi calculada a partir de uma curva sigmoide de concentração-resposta com base nos dados da viabilidade celular.

Todos os dados foram analisados utilizando o software Prisma 5.01 (GraphPad, San Diego, EUA). Diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 CARDIOTOXICIDADE INDUZIDA PEAL DOXORRUBICINA

6.1.1 Definição do protocolo de indução de cardiotoxicidade pela Dox

A toxicidade geral induzida pela Dox foi inicialmente avaliada pela perda de peso dos animais após o tratamento. Todos os animais que receberam a droga apresentaram uma redução significativa de peso após cinco dias, sobretudo o grupo que recebeu a dose única de 20 mg/kg (Figura 5). Essa dose de Dox foi letal para 50% dos animais a partir do sétimo dia.

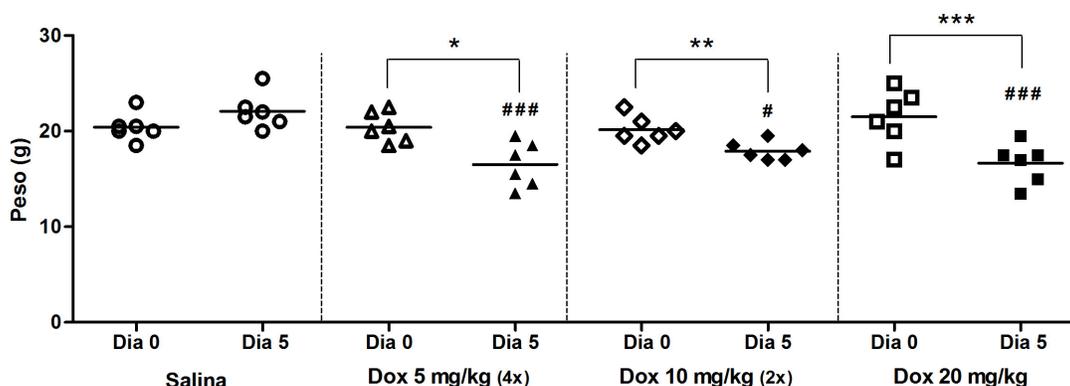


Figura 5 - Variação ponderal de camundongos submetidos a diferentes tratamentos com doxorubicina (Dox). Camundongos receberam injeções intraperitoneais de salina (grupo controle) ou uma dose cumulativa de 20 mg/kg de Dox, administrada em dose única ou doses fracionadas - quatro doses de 5 mg/kg [Dox 5 mg/kg (4x)] ou duas doses de 10 mg/kg [10 mg/kg (2x)] - com intervalo de três dias entre as doses. Os animais foram pesados antes (Dia 0) e cinco dias após a última injeção de Dox (Dia 5). Cada símbolo representa o resultado de um animal e as linhas horizontais representam as médias de cada grupo. n=6 animais por grupo. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 (teste t pareado). # p<0,05; ### p<0,001, significativamente diferente em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey).

A cardiotoxicidade da Dox foi avaliada bioquimicamente pela quantificação da atividade sérica da enzima CK 72 horas após o tratamento. A atividade sérica de CK total (CK total) foi significativamente mais elevada nos animais que receberam a dose única de 20 mg/kg de Dox (Figura 6A). Entretanto, essa dose e as demais

avaliadas não foram capazes de promover alterações significativas na atividade sérica de CK-MB no tempo de 72 horas (Figura 6B). Como a CK-MB em seres humanos atinge um valor máximo entre 12 e 24 horas após a ocorrência de infarto, é provável que o tempo de 72 horas seja tardio para a detecção da atividade sérica dessa enzima. Diante disso, nos demais experimentos, a avaliação da atividade de CK foi realizada em tempos mais precoces.

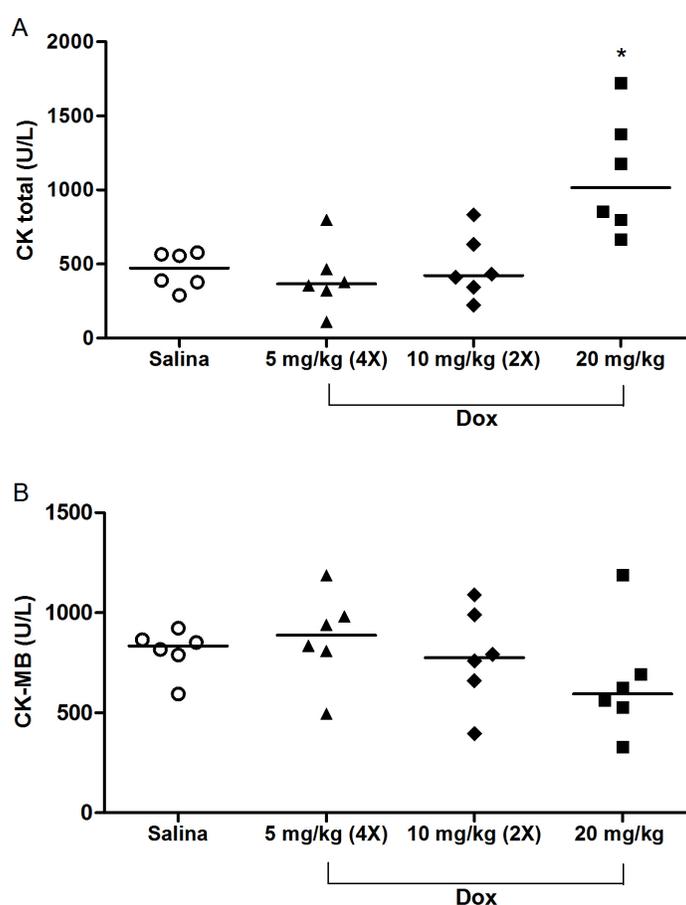


Figura 6 - Atividade sérica de creatina quinase (CK) 72 horas pós-doxorrubicina (Dox). Camundongos receberam injeções intraperitoneais de salina (grupo controle) ou uma dose cumulativa de 20 mg/kg de Dox, administrada em dose única ou doses fracionadas - quatro doses de 5 mg/kg [Dox 5 mg/kg (4x)] ou duas doses de 10 mg/kg [10 mg/kg (2x)] - com intervalo de três dias entre as doses. O sangue foi coletado do plexo orbital 72 horas após a última injeção de Dox. Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=6 animais por grupo. (A) CK total, * p<0,05, significativamente diferente em relação ao grupo controle (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). (B) CK-MB.

Com base nos resultados obtidos, a concentração de 20 mg/kg de Dox foi escolhida para a realização dos demais experimentos.

6.1.2 Determinação da qualidade da preparação enriquecida para mitocôndria por microscopia eletrônica de transmissão

A obtenção de mitocôndrias foi confirmada pelas imagens por microscopia eletrônica de transmissão, demonstrando que não há contaminação por outras organelas ou estruturas (Figura 7).

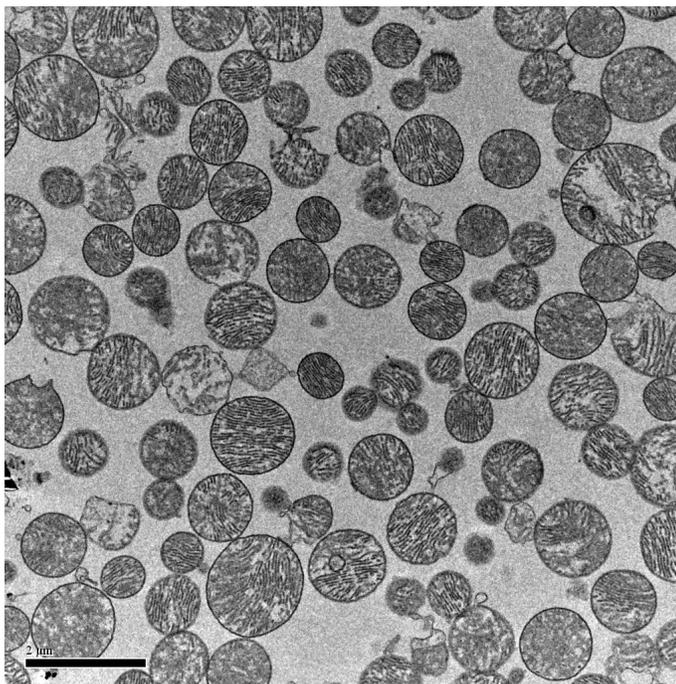


Figura 7 – Microscopia eletrônica de transmissão das mitocôndrias. As organelas obtidas foram fixadas em glutaraldeído 2% e pós-fixadas em ferricianeto de potássio 0,8% e tetróxido de ósmio 1%.

6.1.3 Determinação do tempo ideal para avaliação de mitocôndria cardíaca

A variação ponderal de camundongos tratados com 20 mg/kg de Dox foi avaliada após 12, 24 e 48 horas. Apesar de não ser estatisticamente significativa ($p=0,067$,

teste Mann Whitney), já é possível observar redução de peso dos animais após o tempo de 48 horas (Figura 8).

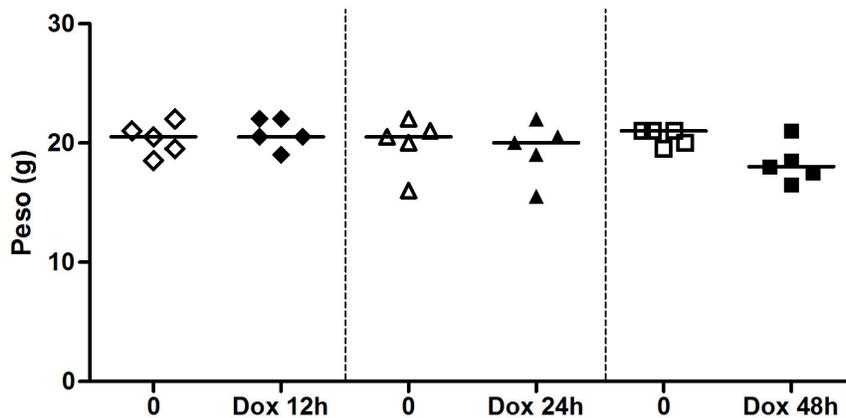
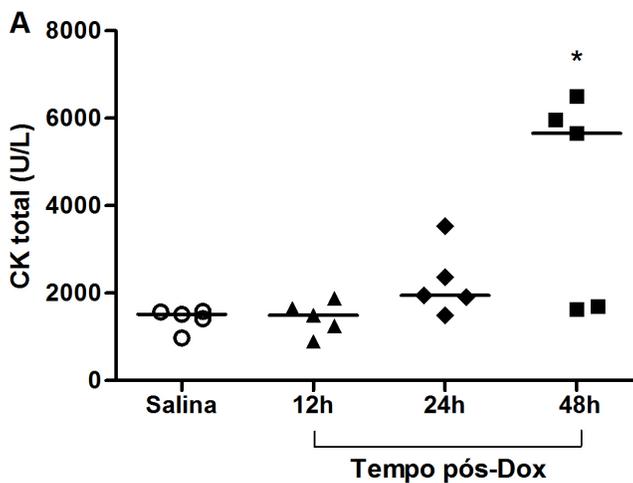


Figura 8 - Variação ponderal de camundongos 12, 24 e 48 horas após tratamento com doxorubicina (20 mg/kg). Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=5 animais por grupo. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste de Mann Whitney.

A atividade sérica de CK total foi significativamente mais elevada no tempo de 48 horas pós-Dox (Figura 9A), entretanto, não houve diferença na atividade sérica de CK-MB nos tempos avaliados (Figura 9B).



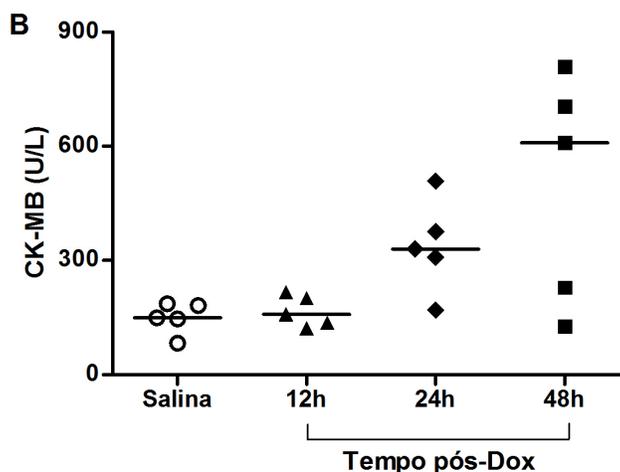


Figura 9 - Atividade sérica de creatina quinase (CK) 12, 24 e 48 horas pós-doxorrubicina (Dox). Camundongos foram tratados pela via intraperitoneal com Dox (20 mg/kg) ou salina (grupo controle). Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=5 animais por grupo. (A) CK total, * p<0,05, significativamente diferente em relação ao grupo controle (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn). (B) CK-MB.

A capacidade da Dox de promover peroxidação lipídica em mitocôndrias cardíacas foi avaliada por TBARS. A concentração de MLDA, um dos produtos da peroxidação lipídica, foi significativamente mais elevada 24 horas pós-Dox (Figura 10).

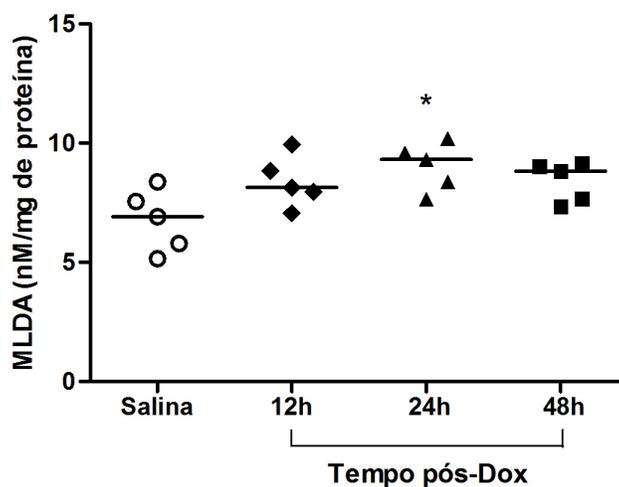


Figura 10 - TBARS de preparação enriquecida para mitocôndria cardíaca 12, 24 e 48 horas pós-doxorrubicina (Dox). Camundongos foram tratados pela via intraperitoneal com Dox (20 mg/kg) ou salina (grupo controle). Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=5 animais por grupo. * p<0,05, significativamente diferente em relação ao grupo controle (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

A peroxidação lipídica no tecido cardíaco também foi avaliada por TBARS no homogenato total de coração. Foi observado um aumento significativo da concentração de MLDA nos animais do grupo tratado com Dox após 24 horas em comparação aos animais do grupo controle, tratados com salina (Figura 11).

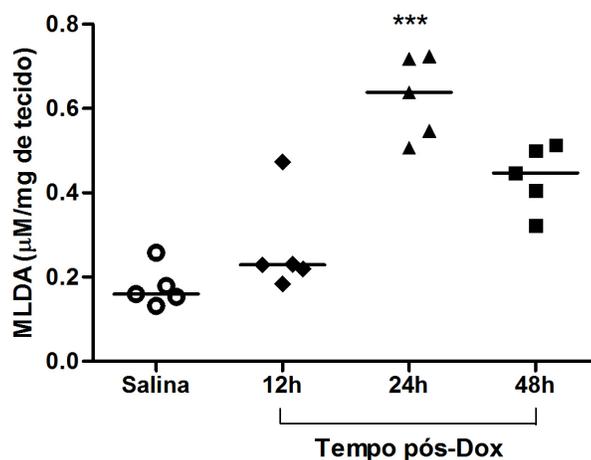


Figura 11 - TBARS do homogenato total de coração 12, 24 e 48 horas pós-doxorrubicina (Dox). Camundongos foram tratados pela via intraperitoneal com Dox (20 mg/kg) ou salina (grupo controle). Cada símbolo representa o resultado de um animal. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=5 animais por grupo. *** p<0,001, significativamente diferente em relação ao grupo controle (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

O tempo de 24 horas foi escolhido para os próximos experimentos considerando, principalmente, os dados de peroxidação lipídica.

6.2. OUTROS EFEITOS DA DOXORRUBICINA

A avaliação do aspecto geral dos camundongos, observado no momento da eutanásia, revelou que os animais desenvolvem letargia 48 horas após a administração de uma única dose de 20 mg/kg de Dox. Aproximadamente 50% dos animais apresentaram diarreia 24 horas pós-Dox e essa disfunção foi observada em todos os camundongos após 48 horas.

6.3 EFEITO DO ÁCIDO LIPOICO SOBRE A CARDIOTOXICIDADE DA DOX

A capacidade do ácido lipoico em reduzir a cardiotoxicidade da Dox foi avaliada, sobretudo quanto ao seu papel em reduzir peroxidação lipídica.

Camundongos foram tratados com AL nas concentrações de 100 ou 200 mg/kg por dois dias e, após 48 horas, receberam a injeção de Dox na concentração de 20 mg/kg. A avaliação foi realizada 24 horas pós-Dox.

Não houve variação ponderal entre os grupos avaliados (Figura 12).

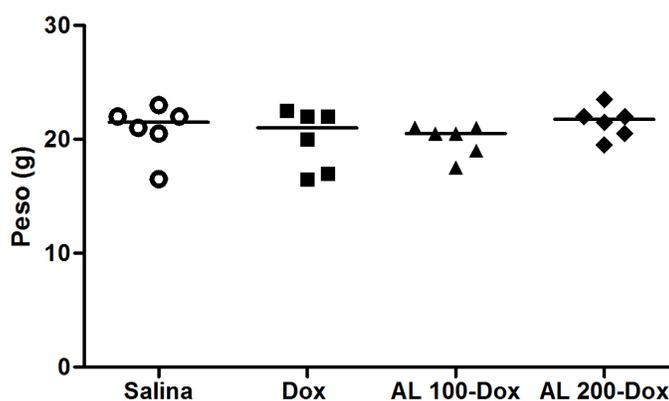


Figura 12 - Variação ponderal de camundongos tratados com ácido lipoico e doxorubicina (Dox). Camundongos receberam injeções intraperitoneais de ácido lipoico (AL) nas concentrações de 100 (AL 100-Dox) e 200 (AL 200-Dox) mg/kg por dois dias. Após 48 horas os animais receberam Dox (20 mg/kg) pela mesma via. Cada símbolo representa o resultado de um animal 24 horas pós-Dox. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=6 animais por grupo. Comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

Também não foi observada diferença na atividade sérica de CK entre os grupos avaliados, como demonstra a Figura 13.

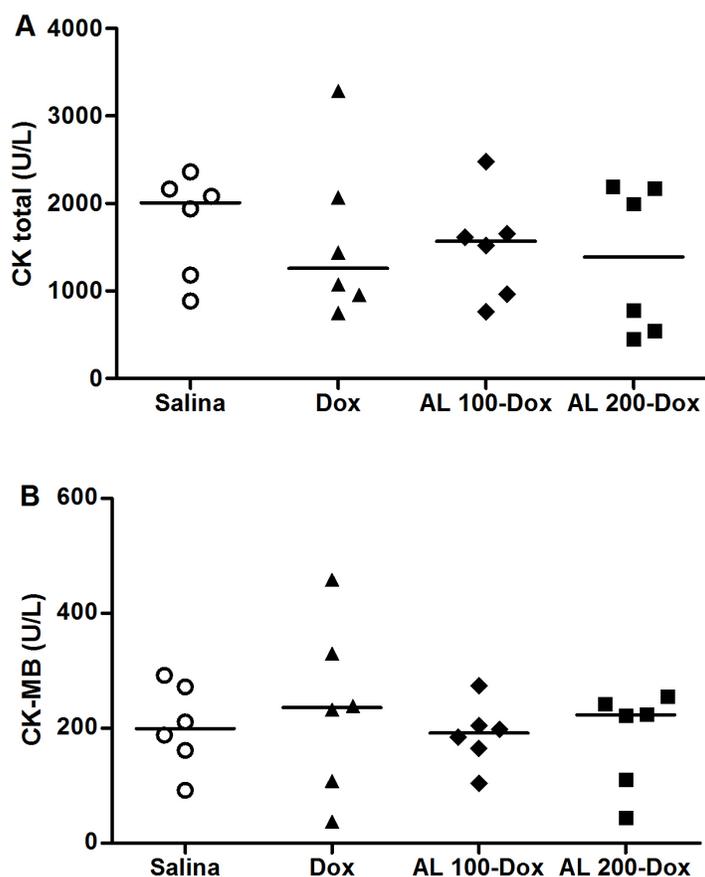


Figura 13 - Atividade sérica de creatina quinase (CK) de camundongos tratados com ácido lipoico (AL) e doxorrubicina (Dox). Camundongos receberam injeções intraperitoneais de AL nas concentrações de 100 (AL 100-Dox) e 200 (AL 200-Dox) mg/kg por dois dias. Após 48 horas os animais receberam Dox (20 mg/kg) pela mesma via. Cada símbolo representa o resultado de um animal 24 horas pós-Dox. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=6 animais por grupo. (A) CK total e (B) CK-MB. Comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

O pré-tratamento com 200 mg/kg de ácido lipoico promoveu redução estatisticamente significativa na peroxidação lipídica de preparações enriquecidas para mitocôndrias em comparação aos animais tratados apenas com Dox (Figura 14).

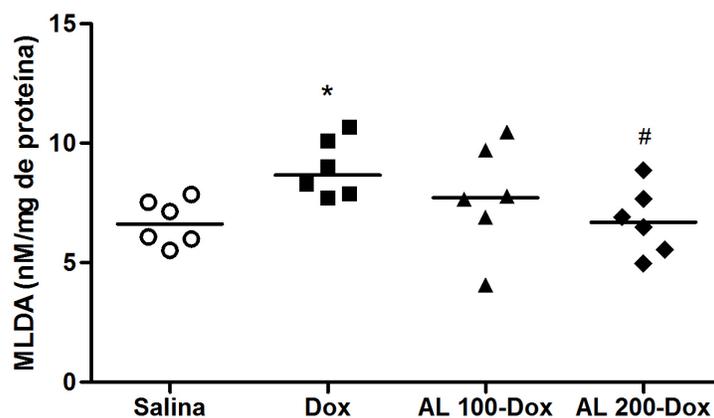


Figura 14 – TBARS de preparação enriquecida para mitocôndria cardíaca após tratamento com ácido lipoico (AL) e doxorrubicina (Dox). Camundongos receberam injeções intraperitoneais de ácido lipoico (AL) nas concentrações de 100 (AL 100-Dox) e 200 (AL 200-Dox) mg/kg por dois dias. Após 48 horas os animais receberam Dox (20 mg/kg) pela mesma via. Cada símbolo representa o resultado de um animal 24 horas pós-Dox. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=6 animais por grupo. * p<0,05, significativamente diferente em relação ao grupo controle; # p<0,05, significativamente diferente em relação ao grupo Dox (teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

Não foi observada diferença entre os grupos avaliados quanto à peroxidação lipídica no homogenato total de coração (Figura 15).

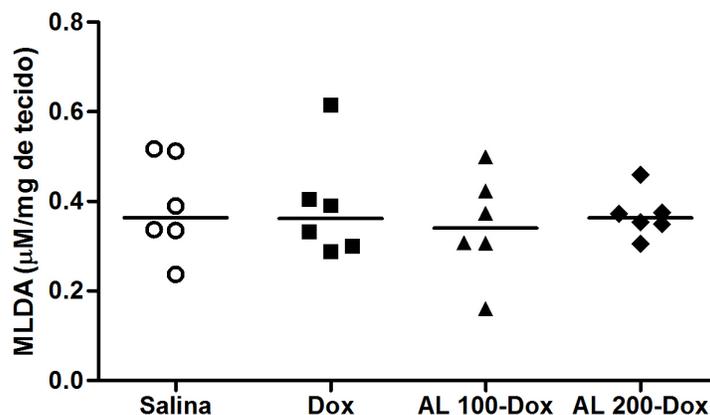


Figura 15 – TBARS de homogenato total de coração após tratamento com ácido lipoico (AL) e doxorrubicina (Dox). Camundongos receberam injeções intraperitoneais de AL nas concentrações de 100 (AL 100-Dox) e 200 (AL 200-Dox) mg/kg por dois dias. Após 48 horas os animais receberam Dox (20 mg/kg) pela mesma via. Cada símbolo representa o resultado de um animal 24 horas pós-Dox. As linhas horizontais representam as medianas de cada grupo. n=6 animais por grupo. Comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn.

6.4 ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA DOX *IN VITRO*

6.4.1 Curva dose-resposta de B16F10 após tratamento com Dox

A ação antineoplásica da Dox foi avaliada *in vitro* em culturas de células de melanoma de camundongo da linhagem B16F10. As células foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de Dox (0,0625 a 2 μM) e 48 horas após o tratamento foram avaliadas quanto a viabilidade pelo método do *Alamar blue*.

A redução da viabilidade de B16F10 após tratamento com Dox foi concentração-dependente. A concentração de 0,125 μM foi capaz de reduzir a viabilidade celular em aproximadamente 50% ($\text{LC}_{50} = 0,124 \pm 0,046 \mu\text{M}$) e a morte de quase 100% da cultura foi observada após incubação com Dox a 2 μM (Figura 16).

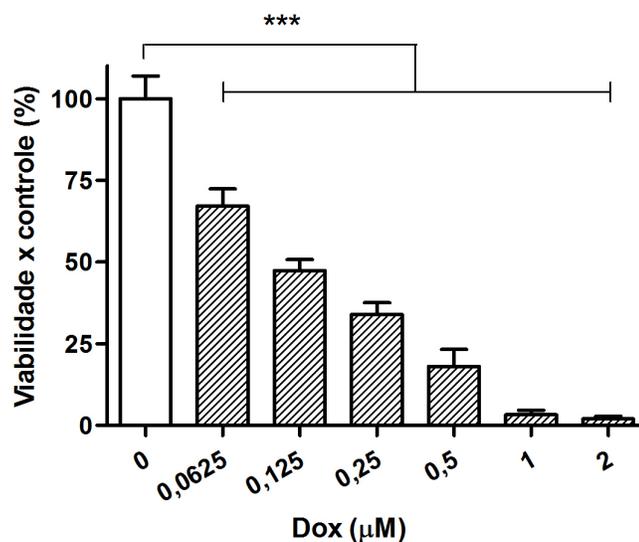


Figura 16 – Curva dose-resposta de doxorrubicina (Dox) em células B16F10. Células foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de Dox (0,0625 a 2 μM) e 48 horas após o tratamento foram avaliadas pelo método do *Alamar blue*. Dados são expressos como valor médio de cinco experimentos \pm o erro padrão da média. *** $p < 0,001$, significativamente diferente em relação a todas as concentrações (ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey)

6.4.2 Curva dose-resposta de B16F10 após tratamento com AL

O efeito do ácido lipoico sobre a viabilidade de células de melanoma foi avaliado para determinar se alguma concentração do antioxidante sozinho já seria tóxica para tais células. A concentração de 640 μM foi tóxica para aproximadamente 50% das células e concentrações superiores a 1280 μM foram letais para praticamente 100% das células (Figura 17). Diante disso, a concentração de 320 μM foi definida como máxima a ser testada nos experimentos subsequentes.

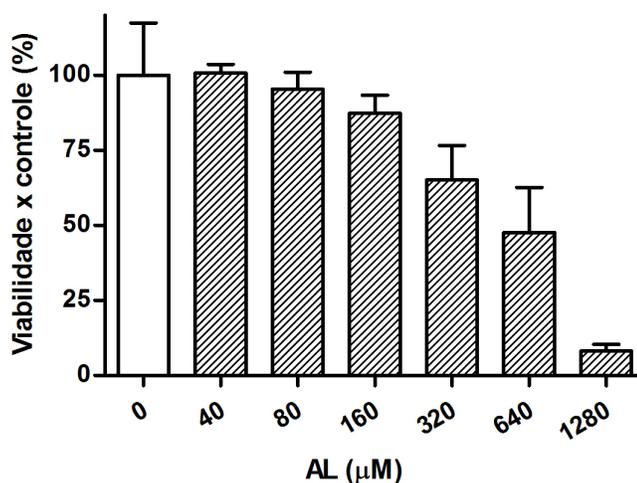


Figura 17 – Curva dose-resposta do ácido lipoico (AL) em células B16F10. Células foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de AL (40 a 1280 μM) e 72 horas após o tratamento foram avaliadas pelo método do *Alamar blue*. Dados são expressos como valor médio de três experimentos \pm o erro padrão da média.

6.4.3 Interferência do ácido lipoico na atividade antineoplásica da Dox

Para avaliar se o ácido lipoico interfere na atividade antineoplásica da Dox, reduzindo seu efeito, células B16F10 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de AL (40 a 320 μM). Após esse período, foi feito o tratamento com Dox a 2 μM , concentração antineoplásica efetiva para 100% das células definida no

experimento anterior, por 24 horas. A análise de viabilidade pelo método *Alamar blue* foi realizada 48 horas pós-Dox.

Nenhuma das concentrações de AL avaliadas foi capaz de reduzir a atividade antineoplásica da Dox sobre células B16F10 (Figura 18).

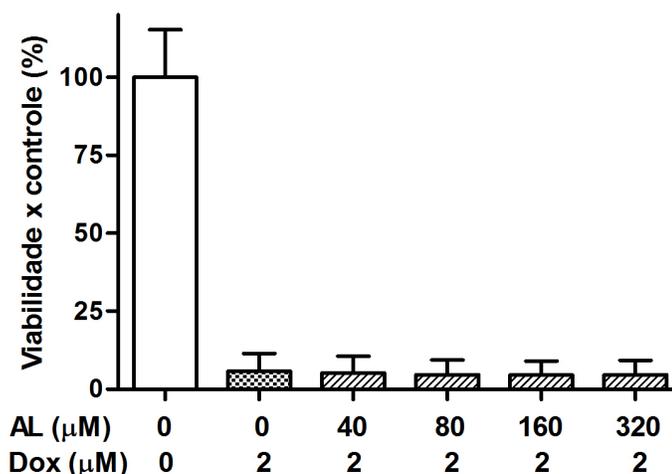


Figura 18 – Ação do ácido lipoico (AL) sobre a atividade antineoplásica da doxorubicina (Dox) em dose letal para 100% das células. Células B16F10 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de AL (40 a 320 μM) e, em seguida, com Dox (2 μM) por 24 horas. Avaliação pelo método do *Alamar blue* foi realizada 48 horas pós-Dox. Dados são expressos como valor médio de três experimentos ± o erro padrão da média.

Para verificar se a concentração de Dox de 2 μM utilizada no experimento anterior não era tão alta a ponto de impossibilitar a interferência do antioxidante sobre a atividade antineoplásica, outro experimento foi conduzido com o emprego da concentração de 0,125 μM de Dox, valor próximo da LC_{50} sobre esta linhagem celular.

Conforme demonstrado na Figura 19, o ácido lipoico não interferiu significativamente na atividade antineoplásica da Dox, confirmando o resultado anterior.

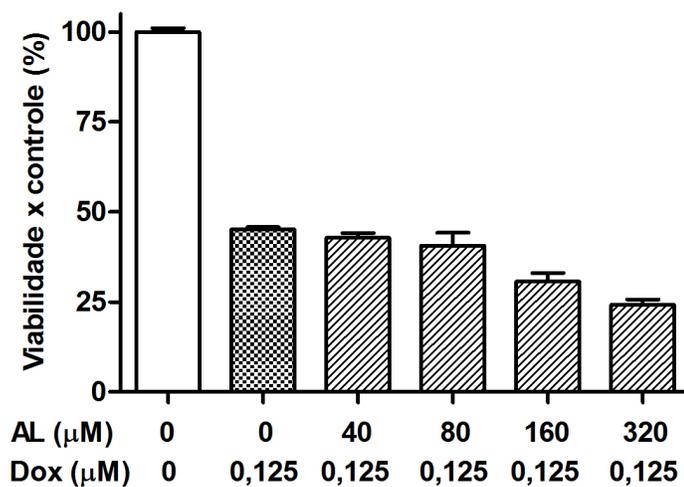


Figura 19 – Ação do ácido lipoico (AL) sobre a atividade antineoplásica da doxorrubicina (Dox) na concentração que causa redução de viabilidade celular de 50% (LC_{50}). Células B16F10 foram incubadas por 24 horas com diferentes concentrações de AL (40 a 320 μM) e, em seguida, com Dox (0,125 μM) por 24 horas. A avaliação pelo método do *Alamar blue* foi realizada 48 horas pós-Dox. Dados são expressos como valor médio de três experimentos \pm o erro padrão da média.

7. DISCUSSÃO

Desde as primeiras observações de cardiotoxicidade induzida por antraciclina, sobretudo pela doxorubicina (MHATRE *et al.* 1971; VON-HOFF *et al.* 1979 *apud* SIMUNEK *et al.* 2009), diversos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de reduzir esse dano, que ainda é o grande fator limitante à utilização dessas drogas na prática médica. Ratos e camundongos são os animais mais utilizados em tais trabalhos e há grande variação nos protocolos de indução de cardiotoxicidade, sendo aplicados tanto protocolos agudos quanto crônicos (ANJOS FERREIRA *et al.* 2007; BOMMU *et al.* 2008; DAOSUKHO *et al.* 2007; XIN *et al.* 2007). Diante dessa variedade de protocolos e do reduzido número de trabalhos utilizando a linhagem de camundongos deste estudo, foi necessário estabelecer a dose de Dox que seria suficiente para gerar dano cardíaco nos animais.

Em virtude da elevada mortalidade, em torno de 50-60%, observada em estudos utilizando protocolos crônicos de administração de Dox (ANJOS FERREIRA *et al.* 2007; KELISHOMI *et al.* 2008; NEILAN *et al.* 2007), o protocolo agudo foi escolhido para a condução de todos os experimentos.

As doses de Dox referidas na literatura variam de 10 a 20 mg/kg por animal, sendo que a dose de 20 mg/kg é a mais utilizada por ser claramente cardiotóxica (NOZAKI *et al.* 2004; RIAD *et al.* 2009). Diante disso, esta foi escolhida para o teste de três protocolos de tratamento, dois com a administração de doses fracionadas e outro com a administração de dose única. Os animais que receberam a dose única de Dox apresentaram maior perda de peso após cinco dias do que os animais submetidos aos outros protocolos (Figura 5). Em trabalho utilizando BALB/c e a administração da dose única de 20 mg/kg de Dox, Li e colaboradores (2006) também observaram

perda significativa de peso nos animais cinco dias após o tratamento. Toxicidade gastrointestinal representada por ulceração da mucosa jejunal foi observada por Doroshov e colaboradores (1981) em camundongos tratados com a dose cumulativa de 15 mg/kg de Dox. Os autores associaram a perda de peso apresentada pelos animais à má absorção resultante do efeito tóxico da droga sobre a mucosa.

Além da perda de peso, outros efeitos agudos causados pela Dox foram representados por letargia 48 horas após o tratamento e diarreia em 50% dos animais após 24 horas e em todos os camundongos após 48 horas. Diarreia, mucosite e náuseas são algumas reações adversas comumente apresentadas por pacientes e animais experimentais em tratamento com antraciclinas (BONADONNA *et al.* 1970; DERES *et al.* 2005; SANTOS *et al.* 2007).

A dose de 20 mg/kg de Dox resultou na mortalidade de 50% dos animais após 7 dias de tratamento, corroborando dados de Neilan e colaboradores (2007) que obtiveram a mesma mortalidade no sétimo dia em trabalho com camundongos C57Bl/6 tratados com a dose única de 20 mg/kg de Dox. Após 10 dias do mesmo tratamento, Nozaki e colaboradores (2004) obtiveram taxa de sobrevivência de 11% em camundongos C57Bl/6. Li e colaboradores (2006), em estudo utilizando camundongos BALB/c e 20 mg/kg de Dox, observaram o primeiro óbito quatro dias após o tratamento e sobrevivência de apenas 20% dos animais tratados após oito dias. Não foi observada mortalidade nos experimentos de peroxidação de fração enriquecida para mitocôndria do miocárdio e para teste do efeito do ácido lipoico no presente estudo, já que os animais foram eutanasiados no máximo cinco dias após o tratamento com Dox, exceto um grupo do primeiro experimento que foi acompanhado diariamente para avaliação da sobrevivência.

A determinação da concentração sérica de várias enzimas que são liberadas das células musculares cardíacas é um método de detecção precoce de lesão miocárdica. Dentre essas enzimas, a CK, LDH e troponina são comumente utilizadas como marcadores de toxicidade cardíaca (AL-MAJED *et al.* 2002; ANDREADOU *et al.* 2007; LIN *et al.* 2007; SINGAL *et al.* 2000). Olson & Capen (1978) hipotetizaram que a Dox liga-se a lipídios da membrana, altera a fluidez, modifica o sistema de transporte de cálcio e leva à liberação de enzimas intracelulares no sangue. Neste trabalho, um dos parâmetros considerados para avaliação da cardiotoxicidade induzida pela Dox foi a detecção bioquímica da atividade sérica de CK.

No tempo de 72 horas apenas a atividade sérica de CK total apresentou-se elevada, não sendo observada diferença estatística na atividade sérica de CK-MB (Figura 6). Daosukho e colaboradores (2007) obtiveram elevação de CK e LDH em camundongos C57Bl/6 submetidos ao tratamento com 20 mg/kg de Dox e Andreadou e colaboradores (2007) obtiveram níveis séricos de CK total e CK-MB significativamente elevados em ratos 72 horas após o mesmo tratamento. Nagi e Mansour (2000), entretanto, observaram níveis séricos significativamente mais elevados de LDH e CK em ratos 24 horas após o tratamento com 15 mg/kg de Dox e ainda obtiveram diferença estatística significativa após 48 horas, porém os valores foram mais baixos do que os apresentados no tempo de 24 horas. Como o aumento da atividade sérica de CK parece ocorrer em tempos mais precoces, atingir um valor máximo e depois retornar a valores normais, foi feita uma cinética para determinar o melhor tempo para avaliação desse parâmetro.

Conforme demonstrado na Figura 9, a atividade sérica de CK total começou a elevar-se 24 horas após a administração da Dox, sendo que apenas no tempo de 48 horas a diferença em relação ao grupo controle foi estatisticamente significativa. A

atividade sérica de CK-MB, por sua vez, não foi diferente nos tempos avaliados. Aumento significativo na atividade sérica de CK-MB e LDH após 24 horas foi observado por Bommu e colaboradores (2008) em trabalho com camundongos suíços tratados com a dose única de 15 mg/kg de Dox e por Osman e colaboradores (2009) 24 horas após tratamento com a dose cumulativa de 18 mg/kg de Dox. Xin e colaboradores (2007), entretanto, não observaram elevação significativa da atividade sérica de CK quatro dias após a última injeção de 15 mg/kg de Dox em camundongos tratados uma vez por semana durante quatro semanas. Apesar disso, a cardiotoxicidade foi confirmada por outros parâmetros como arritmias e anormalidades de condução, detectadas por eletrocardiograma (ECG), elevação de MLDA e redução de SOD no tecido cardíaco, vacuolização citoplasmática e desorganização de miofibrilas.

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a cardiotoxicidade induzida pela Dox, sendo o estresse oxidativo um dos mais referidos na literatura (AROLA *et al.* 2000; GEWIRTZ 1999; IKEGAMI *et al.* 2007; KONOREV *et al.* 2008). A capacidade das antraciclina de dirigir elétrons para o oxigênio formando superóxido, peróxido de hidrogênio e, finalmente, radicais hidroxil sugere a peroxidação lipídica como um resultado fisiológico potencialmente deletério (ABDELLA & FISHER 1985). A peroxidação lipídica resulta na produção de uma grande variedade de aldeídos, incluindo o malondialdeído, que afetam diretamente a membrana alterando sua permeabilidade e, conseqüentemente, a função celular. O MLDA é um importante produto da peroxidação lipídica e indicador da produção de ROS amplamente utilizado (ANDREADOU *et al.* 2007; BALACHANDAR *et al.* 2003; INJAC *et al.* 2008; SU *et al.* 2009).

A maioria dos trabalhos avalia a peroxidação lipídica a partir do homogenato total de tecido cardíaco, porém neste trabalho, além da detecção tecidual, propomos a determinação de peroxidação em mitocôndrias cardíacas. Isso porque a Dox altera a integridade funcional da cadeia respiratória da mitocôndria, cuja membrana, especialmente na sua porção interna, contém uma elevada quantidade de cardiolipina, um fosfolipídio estrutural pelo qual a Dox apresenta grande afinidade (SIMUNEK *et al.* 2009; TOKARSKA-SCHLATTNER *et al.* 2005). A Dox forma um complexo com a cardiolipina resultando no acúmulo da droga nas células cardíacas (GOORMAGHTIGH & RUYSSCHAERT 1984 *apud* QUILES *et al.* 2002). A concentração de MLDA foi o marcador utilizado para detecção de peroxidação lipídica através da técnica de TBARS.

Aumento significativo da concentração de MLDA no tecido cardíaco foi observado 24 horas após o tratamento com Dox (Figura 11), porém, esse resultado não se repetiu no experimento seguinte (Figura 15). Em contrapartida, a concentração desse produto da peroxidação lipídica foi significativamente mais elevada nas mitocôndrias cardíacas dos animais 24 horas após o tratamento com Dox (Figura 10). Elevação significativa de MLDA no tecido cardíaco de ratos tratados com 20 mg/kg de Dox foi obtida por Iqbal e colaboradores (2008) 48 horas e até sete dias após o tratamento. Não há trabalhos na literatura avaliando peroxidação lipídica em mitocôndrias cardíacas *in vivo*.

O efeito cardioprotetor do ácido lipoico (100 e 200 mg/kg) foi avaliado 24 horas após o tratamento dos camundongos com a dose de 20 mg/kg de Dox. Neste experimento, não houve diferença significativa na atividade sérica de CK (Figura 13) nem na concentração de MLDA no tecido cardíaco (Figura 15). Em trabalho com camundongos submetidos ao tratamento com a dose cumulativa de 60 mg/kg de

Dox dividida em quatro injeções semanais, Xin e colaboradores (2007) também não obtiveram diferença significativa nos níveis séricos de CK, mas observaram arritmias e anormalidades de condução (redução dos batimentos cardíacos, prolongamento do intervalo QT), aumento dos níveis séricos de AST, aumento de MLDA e redução de SOD no tecido cardíaco, vacuolização citoplasmática e desorganização de miofibrilas quatro dias após a última injeção de Dox.

Ao comparar a concentração tecidual de MLDA dos dois experimentos, percebemos que, no segundo, os valores apresentados pelos animais do grupo controle estão muito elevados, o que pode indicar que os animais estavam submetidos a alguma situação de estresse oxidativo que resultou em peroxidação lipídica tecidual independentemente do protocolo experimental. Em trabalho com ratos tratados com a dose única de 15 mg/kg de Dox, Al-Majed e colaboradores (2002) obtiveram elevação significativa de MLDA no tecido cardíaco após 48 horas. O tratamento com AL (100 mg/kg) cinco dias antes e dois dias após a administração de Dox reduziu significativamente a quantidade de MLDA no tecido cardíaco, bem como os níveis séricos de CK e LDH.

A doxorubicina, por sua vez, promoveu um aumento significativo na concentração de MLDA nas mitocôndrias cardíacas e o pré-tratamento dos animais com AL (200 mg/kg) foi capaz de inibir essa elevação (Figura 14), demonstrando o efeito cardioprotetor desse agente.

A partir desse experimento pode-se inferir que a detecção de MLDA em mitocôndrias cardíacas foi o parâmetro mais constante, dentre os utilizados nesta dissertação, para avaliação da cardiotoxicidade induzida pela Dox, uma vez que

possibilitou a detecção de pequenas diferenças entre os grupos experimentais e foi reproduzível.

Em virtude de vários trabalhos na literatura referirem que, sob certas condições, a co-administração de componentes antioxidantes pode reduzir a atividade antitumoral de agentes quimioterapêuticos (D'ANDREA 2005; LADAS *et al.* 2004; NYAYAPATI *et al.* 1996), tornou-se necessário avaliar se o ácido lipoico poderia interferir na atividade antineoplásica da Dox. Para isso, a metodologia escolhida foi a avaliação da viabilidade de células neoplásicas pré-tratadas com AL e tratadas com Dox. As células escolhidas para esses experimentos *in vitro* foram células de melanoma de camundongo da linhagem B16F10.

Inicialmente as células foram submetidas a diferentes concentrações (0,0625 a 2 μM) de Dox para definir a concentração letal desse quimioterápico sobre as células neoplásicas e também para determinar a LC_{50} após o tempo de incubação de 24 horas. Foi observada uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular já a partir da menor concentração avaliada (0,0625 μM) e morte de aproximadamente 100% da cultura com a concentração de 2 μM . Essa redução foi concentração-dependente (Figura 16). A LC_{50} da Dox para essas células foi $0,124 \pm 0,046 \mu\text{M}$. Este resultado foi consistente com o de Zhang e colaboradores (2010), que obtiveram LC_{50} de $0,11 \pm 0,01 \mu\text{M}$ e com o resultado de Mahmud e colaboradores (2008) que observaram que a redução da viabilidade dessas células em 50% ocorreu com a concentração de 0,09 $\mu\text{g/mL}$ de Dox, o que equivale a aproximadamente 0,155 μM .

A avaliação da interferência do ácido lipoico na atividade antineoplásica da Dox foi realizada através do pré-tratamento das células com diferentes concentrações de AL

24 horas antes da administração da Dox. Não foi observada alteração da viabilidade das células em nenhuma das concentrações de AL avaliadas, tanto com o tratamento de 2 μ M de Dox (Figura 18) quanto com a utilização da concentração mais próxima da LC₅₀ (Figura 19).

Diante desses resultados, pode-se inferir que o ácido lipoico não interfere na atividade antineoplásica da Dox, sugerindo que esta atividade não dependa de interferência da Dox no equilíbrio redox. Entretanto, estudos posteriores devem ser conduzidos a fim de confirmar o efeito cardioprotetor do AL e a não interferência na atividade antineoplásica da Dox, sobretudo em experimentos *in vivo*.

8. CONCLUSÕES

- A quantificação de MLDA em mitocôndrias cardíacas foi o parâmetro mais eficaz para a detecção de peroxidação induzida pela Dox *in vivo*, indicando que este protocolo pode servir de base para um método simples e sensível para detecção de estresse oxidativo no coração.
- A administração de ácido lipoico teve um efeito inibidor da peroxidação lipídica, o que pode refletir uma proteção da ação cardiotoxicidade da Dox.
- A atividade antineoplásica da Dox sobre células de linhagem de melanoma parece não depender de interferência no estado redox, uma vez que o ácido lipoico, nas condições testadas, não interferiu na atividade antineoplásica da Dox sobre as células tumorais.

9. PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito cardioprotetor do ácido lipoico sobre a função cardíaca, *in vivo*, através da realização de eletrocardiograma, ecocardiografia e ergometria;
- Investigar o efeito do ácido lipoico sobre a evolução clínica de animais com melanoma submetidos ao tratamento quimioterápico com diferentes doses de Dox;
- Avaliar possíveis alterações ultraestruturais do tecido cardíaco, sobretudo as alterações mitocondriais, induzidas pela Dox e o possível efeito do ácido lipoico sobre tais alterações;
- Desenvolver uma estratégia de direcionamento do ácido lipoico para o coração, por exemplo, com o uso de lipoproteínas plasmáticas.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdella, B. R. J., & Fisher, J. (1985). A chemical perspective on the anthracycline antitumor antibiotics. *Environmental Health Perspectives*, *64*, 3-18.
- Ahmed, S., Kishikawa, N., Ohyama, K., Wada, M., Nakashima, K., & Kuroda, N. (2009). Selective determination of doxorubicin and doxorubicinol in rat plasma by HPLC with photosensitization reaction followed by chemiluminescence detection. *Talanta*, *78*(1), 94-100.
- Al-Majed, A. A., Gado, A. M., Al-Shabanah, O. A., & Mansour, M. A. (2002). Alpha-lipoic acid ameliorates myocardial toxicity induced by doxorubicin. *Pharmacological Research*, *46*(6), 499-503.
- Andreadou, I., Sigala, F., Iliodromitis, E. K., Papaefthimiou, M., Sigalas, C., Aligiannis, N., et al. (2007). Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *42*(3), 549-558.
- Anjos Ferreira, A. L., Russell, R. M., Rocha, N., Ladeira, M. S. P., Salvadori, D. M. F., Nascimento, M. C. M. O., et al. (2007). Effect of lycopene on doxorubicin-induced cardiotoxicity: an echocardiographic, histological and morphometrical assessment. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *101*(1), 16-24.
- Arcamone, F., Franceschi, G., Penco, S., & Selva, A. (1969). Adriamycin (14-hydroxydaunomycin), a novel antitumor antibiotic. *Tetrahedron Letters*, *13*, 1007-1010.
- Arivazhagan, P., & Panneerselvam, C. (2000). Effect of DL-alpha-lipoic acid on tissue nucleic acid contents in aged rats. *Pharmacological Research*, *42*(3), 223-226.
- Arola, O. J., Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Parvinen, M., & Voipio-Pulkki, L. M. (2000). Acute doxorubicin cardiotoxicity involves cardiomyocyte apoptosis. *Cancer Research*, *60*, 1789-1792.
- Ayaz, S. A., Bhandari, U., & Pillai, K. K. (2005). Influence of DL α -lipoic acid and vitamin-E against doxorubicin-induced biochemical and histological changes in the cardiac tissue of rats. *Indian Journal of Pharmacology*, *37*(5), 294-299.
- Balachandar, A. V., Malarkodi, K. P., & Varalakshmi, P. (2003). Protective role of DL α -lipoic acid against adriamycin-induced cardiac lipid peroxidation. *Human & Experimental Toxicology*, *22*(5), 249-254.
- Bağriaçık, E. U., Uslu, K., Yurtçu, E., Stefek, M., & Karasu, C. (2007). Stobadine inhibits doxorubicin-induced apoptosis through a caspase-9 dependent pathway in P815 mastocytoma cells. *Cell Biology International*, *31*(9), 979-984.

- Biewenga, G. P., Haenen, G. R., & Bast, A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General Pharmacology*, 29(3), 315-331.
- Bommu, P., Nanjan, C. M. J., Joghee, N. M., Nataraj, S. M., & Bhojraj, S. (2008). *Phyllanthus maderaspatensis*, a dietary supplement for the amelioration of adriamycin-induced toxicity and oxidative stress in mice. *Journal of Natural Medicines*, 62(2), 149-154.
- Bonadonna, G., Monfardini, S., De Lena, M., Fossati-Bellani, F., & Beretta, G. (1970). Phase I and preliminary phase II evaluation of adriamycin (NSC 123127). *Cancer Research*, 30(10), 2572-2582.
- Boucher, F., Coudray, C., Tirard, V., Barandier, C., Tresallet, N., Favier, A., et al. (1995). Oral selenium supplementation in rats reduces cardiac toxicity of adriamycin during ischemia and reperfusion. *Nutrition*, 11(5), 708-711.
- Brasil. (2009). Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>. Acesso em julho 2010.
- Breed, J. G. S., Zimmerman, A. N. E., Dormans, J. A. M. A., & Pinedo, H. M. (1980). Failure of the antioxidant vitamin E to protect against adriamycin-induced cardiotoxicity in the rabbit. *Cancer Research*, 40(6), 2033-2038.
- Celik, H., & Arinç, E. (2008). Bioreduction of idarubicin and formation of ROS responsible for DNA cleavage by NADPH-cytochrome P450 reductase and its potential role in the antitumor effect. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 11(4), 68-82.
- Ciaccio, M., Tesoriere, L., Pintaudi, A. M., Re, R., Vallesi-Cardillo, S., Bongiorno, A., et al. (1994). Vitamin A preserves the cytotoxic activity of adriamycin while counteracting its peroxidative effects in human leukemic cells in vitro. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 34(2), 329-335.
- Cole, M. P., Chaiswing, L., Oberley, T. D., Edelmann, S. E., Piascik, M. T., Lin, S. M., et al. (2006). The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovascular Research*, 69, 186-197.
- Damrot, J., Nübel, T., Epe, B., Roos, W. P., Kaina, B., & Fritz, G. (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide. *British Journal of Pharmacology*, 149(8), 988-997.
- Danesi, F., Malaguti, M., Nunzio, M. D., Maranesi, M., Biagi, P. L., & Bordoni, A. (2006). Counteraction of adriamycin-induced oxidative damage in rat heart by selenium dietary supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1203-1208.
- Danz, E. D. B., Skramsted, J., Henry, N., Bennett, J. A., & Keller, R. S. (2009). Resveratrol prevents doxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial

- stabilization and the Sirt1 pathway. *Free radical biology & medicine*, 46(12), 1589-97.
- Daosukho, C., Chen, Y., Noel, T., Sompol, P., Nithipongvanitch, R., Velez, J. M., et al. (2007). Phenylbutyrate, a histone deacetylase inhibitor, protects against adriamycin-induced cardiac injury. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(12), 1818-1825.
- Deng, S., Kruger, A., Kleschyov, A. L., Kalinowski, L., Daiber, A., & Wojnowski, L. (2007). Gp91phox-containing NAD(P)H oxidase increases superoxide formation by doxorubicin and NADPH. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(4), 466-473.
- Deres, P., Halmosi, R., Toth, A., Kovacs, K., Palfi, A., Habon, T., et al. (2005). Prevention of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity by an experimental antioxidant compound. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 45(1), 36-43.
- Doroshov, J. H., Locker, G. Y., Ifrim, I., & Myers, C. E. (1981). Prevention of doxorubicin cardiac toxicity in the mouse by N-acetylcysteine. *The Journal of Clinical Investigation*, 68(4), 1053-1064.
- D'Andrea, G. M. (2005). Use of antioxidants during chemotherapy and radiotherapy should be avoided. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(5), 319-321.
- Fernández-Vizarra, E., Ferrín, G., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Zeviani, M., & Enríquez, J. A. (2010). Isolation of mitochondria for biogenetical studies: An update. *Mitochondrion*, 10(3), 253-262.
- Gewirtz, D. A. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*, 57(98), 727-741.
- Goormaghtigh, E., Huart, P., Praet, M., Brasseur, R., & Ruyschaert, J. M. (1990). Structure of the adriamycin-cardiolipin complex. Role in mitochondrial toxicity. *Biophysical Chemistry*, 35(2-3), 247-257.
- Granados-Principal, S., Quiles, J. L., Ramirez-Tortosa, C. L., Sanchez-Rovira, P., & Ramirez-Tortosa, M. C. (2010). New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1425-1438.
- Grenier, M. A., & Lipshultz, S E. (1998). Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults. *Seminars in Oncology*, 25, 72-85.
- Gutteridge, J. M. C. (1984). Lipid peroxidation initiated by superoxide-dependent hydroxyl radicals using complexed iron and hydrogen peroxide. *FEBS Letters*, 172(2), 245-249.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical Journal*, 219(1), 1-14.

- Heaney, M. L., Gardner, J. R., Karasavvas, N., Golde, D. W., Scheinberg, D. A., Smith, E. A., et al. (2008). Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Research*, 68(19), 8031-8038.
- Hideg, K., & Kálai, T. (2007). Novel antioxidants in anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovascular Toxicology*, 7(2), 160-164.
- Ichihara, S., Yamada, Y., Kawai, Y., Osawa, T., Furuhashi, K., Duan, Z., et al. (2007). Roles of oxidative stress and Akt signaling in doxorubicin cardiotoxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359, 27-33.
- Ikegami, E., Fukazawa, R., Kanbe, M., Watanabe, Miki, Abe, M., Watanabe, Makoto, et al. (2007). Edaravone, a potent free radical scavenger, prevents anthracycline-induced myocardial cell death. *Circulation Journal*, 71, 1815 - 1820.
- Injac, R., Perse, M., Obermajer, N., Djordjevic-Milic, V., Prijatelj, M., Djordjevic, A., et al. (2008). Potential hepatoprotective effects of fullereneol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. *Biomaterials*, 29, 3451-3460.
- Iqbal, M., Dubey, K., Anwer, T., Ashish, A., & Pillai, K. K. (2008). Protective effects of telmisartan against acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Pharmacological Reports*, 60(3), 382-390.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y., Xu, J., & Thun, M. J. (2009). Cancer Statistics, 2009. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 59(4), 225-249.
- Kaiserová, H., Hartog, G. J. M. D., Simunek, T., Schroterová, L., Kvasnicková, E., & Bast, A. (2006). Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *British Journal of Pharmacology*, 149, 920-930.
- Kelishomi, R. B., Ejtemaemehr, S., Tavangar, S. M., Rahimian, R., Mobarakeh, J. I., & Dehpour, A. R. (2008). Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. *Toxicology*, 243, 96-104.
- Kim, S. Y., Kim, S. J., Kim, B. J., Rah, S. Y., Shung, S. M., Im, M. J., et al. (2006). Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca²⁺ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Experimental & Molecular Medicine*, 38(5), 535-545.
- Konorev, E. A., Vanamala, S., & Kalyanaraman, Balaraman. (2008). Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(12), 1723-1728.
- Krischer, J. P., Epstein, S., Cuthbertson, D. D., Goorin, A. M., Epstein, M. L., & Lipshultz, S E. (1997). Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. *Journal of Clinical Oncology*, 15(4), 1544-1552.

- Ladas, E. J., Jacobson, J. S., Kennedy, D. D., Teel, K., Fleischauer, A., & Kelly, K. M. (2004). Antioxidants and cancer therapy: A systematic review. *Journal of Clinical Oncology*, 22(3), 517-528.
- Lal, A., Atamna, W., Killilea, D. W., Suh, J. H., & Ames, B. N. (2008). Lipoic acid and acetyl-carnitine reverse iron-induced oxidative stress in human fibroblasts. *Redox Report*, 13(1), 2-10.
- Legha, S. S., Benjamin, R. S., Mackay, B., Ewer, M., Wallace, S., Valdivieso, M., et al. (1982). Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Annals of Internal Medicine*, 96(2), 133-139.
- Legha, S. S., Wang, Y. M., Mackay, B., Ewer, M., Hortobagyi, G. N., Benjamin, R. S., et al. (1982). Clinical and pharmacologic investigation of the effects of alpha-tocopherol on adriamycin cardiotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 393, 411-418.
- Li, K., Sung, R. Y. T., Huang, W. Z., Yang, M., Pong, N. H., Lee, S. M., et al. (2006). Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin. *Circulation*, 113, 2211-2220.
- Lin, X., Li, Q., Wang, Y. J., Ju, Y. W., Chi, Z. Q., Wang, M. W., et al. (2007). Morphine inhibits doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and nuclear factor κ B transcriptional activation in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *The Biochemical Journal*, 406(2), 215-221.
- Lipshultz, Steven E, Lipsitz, S. R., Sallan, S. E., Dalton, V. M., Mone, S. M., Gelber, R. D., et al. (2005). Chronic progressive cardiac dysfunction years after doxorubicin therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 23(12), 2629-2636.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Mahmud, A., Xiong, X. B., & Lavasanifar, A. (2008). Development of novel polymeric micellar drug conjugates and nano-containers with hydrolyzable core structure for doxorubicin delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69, 923-934.
- Malarkodi, K. P., Balachandar, A. V., & Varalakshmi, P. (2003). The influence of lipoic acid on adriamycin induced nephrotoxicity in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 247(1-2), 15-22.
- Malarkodi, K. P., Sivaprasad, R., & Varalakshmi, P. (2004). Effect of lipoic acid on the oxidoreductive status of red blood cells in rats subject to oxidative stress by chronic administration of adriamycin. *Human & Experimental Toxicology*, 23(3), 129-135.

- Mataix, J., Ochoa, J. J., & Quiles, J. L. (2006). Olive oil and mitochondrial oxidative stress. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 76(4), 178-183.
- Menna, P., Minotti, G., & Salvatorelli, E. (2007). In vitro modeling of the structure – activity determinants of anthracycline cardiotoxicity. *Cell Biology and Toxicology*, 23, 49-62.
- Mhatre, R., Herman, E., Huidobro, A., & Waravdekar, V. (1971). The possible relationship between metabolism and cardiac toxicity of daunomycin and related compounds. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 178(1), 216-222.
- Mihm, M. J., Yu, F., Weinstein, D. M., Reiser, P. J., & Bauer, J. A. (2002). Intracellular distribution of peroxynitrite during doxorubicin cardiomyopathy: evidence for selective impairment of myofibrillar creatine kinase. *British Journal of Pharmacology*, 135(3), 581-588.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines : Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185-229.
- Nagi, M. N., & Mansour, M. A. (2000). Protective effect of thymoquinone against doxorubicin – induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. *Pharmacological Research*, 41(3), 283-289.
- Nascimento, M. C. M. O., & Martins, A. S. (2005). Cardiomiopatia induzida pela adriamicina: uma revisão. *Arquivos de Ciências da Saúde*, 12(2), 111-115.
- Neilan, T. G., Blake, S. L., Ichinose, F., Raher, M. J., Buys, E. S., Jassal, D. S., et al. (2007). Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin. *Circulation*, 116(5), 506-514.
- Nozaki, N., Shishido, T., Takeishi, Y., & Kubota, I. (2004). Modulation of doxorubicin-induced cardiac dysfunction in toll-like receptor-2-knockout mice. *Circulation*, 110(18), 2869-2874.
- Nyayapati, S., Afshan, G., Lornitzo, F., Byrnes, R. W., & Petering, D. H. (1996). Depletion of cellular iron by BPS and ascorbate: Effect on toxicity of adriamycin. *Free Radical Biology & Medicine*, 20(3), 319-329.
- Olson, H. M., & Capen, C. C. (1978). Chronic cardiotoxicity of doxorubicin (Adriamycin) in the rat: Morphologic and biochemical investigations. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 44(3), 605-616.
- Osman, A. M. M., Nemnem, M. M., Abou-Bakr, A. A., Nassier, O. A., & Khayyal, M. T. (2009). Effect of methimazole treatment on doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 47(10), 2425-2430.

- Outomuro, D., Grana, D. R., Azzato, F., & Milei, J. (2007). Adriamycin-induced myocardial toxicity: new solutions for an old problem?. *International Journal of Cardiology*, *117*(1), 6-15.
- Packer, L., Tritschler, H. J., & Wessel, K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, *22*, 359-378.
- Packer, L., Witt, E. H., & Tritschler, H. J. (1995). Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology & Medicine*, *19*(2), 227-250.
- Papadopoulou, L. C., Theophilidis, G., Thomopoulos, G. N., & Tsiftoglou, A. S. (1999). Structural and functional impairment of mitochondria in adriamycin-induced cardiomyopathy in mice: suppression of cytochrome c oxidase II gene expression. *Biochemical Pharmacology*, *57*(5), 481-489.
- Prahalathan, C., Selvakumar, E., & Varalakshmi, P. (2006). Lipoic acid modulates adriamycin-induced testicular toxicity. *Reproductive Toxicology*, *21*, 54-59.
- Puri, A., Maulik, S. K., Ray, R., & Bhatnagar, V. (2005). Electrocardiographic and biochemical evidence for the cardioprotective effect of vitamin E in doxorubicin-induced acute cardiotoxicity in rats. *European Journal of Pediatric Surgery*, *15*(6), 387-391.
- Quiles, J. L., Huertas, J. R., Battino, M., Mataix, J., & Ramírez-Tortosa, C. (2002). Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology*, *180*, 79-95.
- Ramakrishnan, N., Wolfe, W. W., & Catravas, G. N. (1992). Radioprotection of hematopoietic tissues in mice by lipoic acid. *Radiation Research*, *130*(3), 360-365.
- Riad, A., Bien, S., Westermann, D., Becher, P. M., Loya, K., Landmesser, U., et al. (2009). Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of doxorubicin in mice. *Cancer Research*, *69*(2), 695-699.
- Santos, R. V. T., Batista Jr, M. L., Caperuto, E. C., & Rosa, L. F. B. P. C. (2007). Chronic supplementation of creatine and vitamins C and E increases survival and improves biochemical parameters after doxorubicin treatment in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *34*, 1294-1299.
- Schimmel, K. J. M., Richel, D. J., Van Den Brink, R. B. A., & Guchelaar, H. J. (2004). Cardiotoxicity of cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews*, *30*, 181-191.
- Seddon, M., Shah, A. M., & Casadei, B. (2007). Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. *Cardiovascular Research*, *75*(2), 315-326.
- Simunek, T., Sterba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., & Gersl, V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, *61*, 154-171.

- Singal, P. K., Iliskovic, N., Li, T., & Kumar, D. (1997). Adriamycin cardiomyopathy: pathophysiology and prevention. *The FASEB Journal*, *11*(12), 931-936.
- Singal, P. K., Li, T., Kumar, D., Danelisen, I., & Iliskovic, N. (2000). Adriamycin-induced heart-failure: mechanism and modulation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *207*, 77-85.
- Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., Chow, D. A., & Singal, P. K. (1995). Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*, *91*(1), 10-15.
- Su, Y. W., Liang, C., Jin, H. F., Tang, X. Y., Han, W., Chai, L. J., et al. (2009). Hydrogen sulfide regulates cardiac function and structure in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Circulation Journal*, *73*, 741-749.
- Suresh, A., Guedez, L., Moreb, J., & Zucali, J. (2003). Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes survival in cell lines after doxorubicin treatment. *British Journal of Haematology*, *120*, 457-463.
- Swain, S. M., Whaley, F. S., & Ewer, M. S. (2003). Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*, *97*(11), 2869-2879.
- Takemura, G., & Fujiwara, H. (2007). Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Progress in Cardiovascular Diseases*, *49*(5), 330-352.
- Tesoriere, L., Ciaccio, M., Valenza, M., Bongiorno, A., Maresi, E., Albiero, R., et al. (1994). Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *269*(1), 430-436.
- Tokarska-Schlattner, M., Zaugg, M., Zuppinger, C., Wallimann, T., & Schlattner, U. (2006). New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: The critical role of cellular energetics. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *41*, 389 - 405.
- Tokarska-Schlattner, Malgorzata, Zaugg, Michael, Silva, R. da, Lucchinetti, E., Schaub, M. C., Wallimann, Theo, et al. (2005). Acute toxicity of doxorubicin on isolated perfused heart: response of kinases regulating energy supply. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *289*(1), 37-47.
- Umar, S., & Van Der Laarse, A. (2010). Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *333*(1-2), 191-201.
- Vadgama, J. V., Wu, Y., Shen, D., Hsia, S., & Block, J. (2000). Effect of selenium in combination with Adriamycin or Taxol on several different cancer cells. *Anticancer Research*, *20*(3A), 1391-1414.

- Varin, R., Mulder, P., Richard, V., Tamion, F., Devaux, C., Henry, J. P., et al. (1999). Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress. *Circulation*, *99*(22), 2951-2957.
- Vasdev, S., Ford, C. A., Parai, S., Longerich, L., & Gadag, V. (2000). Dietary alpha-lipoic acid supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, *18*(5), 567-573.
- Von Der Maase, H., Hansen, S. W., Roberts, J. T., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., et al. (2000). Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *Journal of Clinical Oncology*, *18*(17), 3068-3077.
- Wahab, M. H., Akoul, E. S., & Abdel-Aziz, A. A. (2000). Modulatory effects of melatonin and vitamin E on doxorubicin-induced cardiotoxicity in Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. *Tumori*, *86*(2), 157-162.
- Wang, S., Konorev, E. A., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., & Kalyanaraman, B. (2004). Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(24), 25535-25543.
- Weinel, S., Malone, J., Jain, D., & Callen, J. P. (2009). Leukaemia cutis in a patient treated for breast cancer. *Australasian Journal of Dermatology*, *50*, 52-55.
- Weinstein, D. M., Mihm, M. J., & Bauer, J. A. (2000). Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *294*(1), 396-401.
- Wouters, K. A., Kremer, L. C. M., Miller, T. L., Herman, E. H., & Lipshultz, S. E. (2005). Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *British Journal of Haematology*, *131*(5), 561-578.
- Xin, Y. F., Zhou, G. L., Shen, M., Chen, Y. X., Liu, S. P., Chen, G. C., et al. (2007). *Angelica sinensis*: A novel adjunct to prevent doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, *101*(6), 421-426.
- Xu, M. F., Tang, P. L., Qian, Z. M., & Ashraf, M. (2001). Effects by doxorubicin on the myocardium are mediated by oxygen free radicals. *Life Sciences*, *68*(8), 889-901.
- Yen, H. C., Oberley, T. D., Vichitbandha, S., Ho, Y. S., & St Clair, D. K. (1996). The protective role of manganese superoxide dismutase against adriamycin-induced acute cardiac toxicity in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*, *98*(5), 1253-1260.

Zhang, Y. F., Wang, J. C., Bian, D. Y., Zhang, X., & Zhang, Q. (2010). Targeted delivery of RGD-modified liposomes encapsulating both combretastatin A-4 and doxorubicin for tumor therapy: In vitro and in vivo studies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(3), 467-473.