



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Camila Macedo Batista

**Estrutura e função vascular na insuficiência cardíaca induzida pela
doxorubicina**

Rio de Janeiro

2018

Camila Macedo Batista

**Estrutura e função vascular na insuficiência cardíaca induzida pela
doxorubicina**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B326 Batista, Camila Macedo.

Estrutura e função vascular na insuficiência cardíaca induzida pela doxorubicina / Camila Macedo Batista – 2018.

46 f.

Orientadora: Cristiane Matsuura.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Insuficiência cardíaca – Teses. 2. Vasos sanguíneos – Teses. 3. Doxorubicina. 4. Remodelação vascular. I. Matsuura, Cristiane. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.12-008.46

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Camila Macedo Batista

**Estrutura e função vascular na insuficiência cardíaca induzida pela
doxorubicina**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 1 de março de 2018.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Monique Bandeira Moss Perszel

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Alessandra Choqueta de Toledo Arruda

Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Dayane Teixeira Ognibene

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao me pai, Aginaldo, pelo exemplo e apoio durante toda a caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, pela oportunidade de estudar aquilo que amo e por me cercar de pessoas maravilhosas que me ajudaram a tornar isso possível.

Obrigada tia Cátia e avó Maria da Graças por sempre participarem ativamente do meu crescimento, fazendo papel de mãe e me motivando a ser uma pessoa melhor.

Agradeço ao meu anjo, meu filho Miguel, pelo sorriso e amor que dá suavidade aos meus dias e por me dar forças para continuar a longa e inacabável caminhada do conhecimento.

À minha mãe e ao Cris por todo empenho e preocupação nas horas difíceis, em vocês encontrei verdadeiro refúgio.

Aos meus irmãos de coração, Amir, Ana, Andressa, Ari, Camilla, Chrislaine, Danilo e Marcelle. Obrigada por acreditarem mais em mim do que eu mesma, sua confiança me fez dar o meu melhor e prosseguir.

Agradeço aos meus companheiros Wanda, Claudia, Daniel, Márcia, Mariana e Marcela que participaram ativamente ao longo desse percurso, somando sempre. Sem vocês nada disso seria possível, muito obrigada por toda ajuda e amizade!

Obrigada aos componentes da banca Professoras Doutoras Monique Moss, Alessandra Arruda e Dayane Ognibene, pela grande contribuição no meu trabalho.

Sou muito grata também à dedicada professora Cristiane Matsuura, que acredito em mim, me lapidou e ensinou tanto. Você sempre será meu exemplo.

Muito obrigada meu querido esposo, por toda atenção, paciência, companheirismo e dedicação. Por ter sido minha base forte, ter estado ao meu lado em tudo, nunca me deixando desanimar. Obrigada também à minha querida sogra Marlene Queiroz, por me apoiar nos momentos de desespero, sempre carinhosa, atenciosa e disposta a ajudar.

Sobretudo, serei eternamente grata ao meu pai, que sempre foi meu orientador, exemplo, amigo, herói e inspiração.

Se você pensa que pode ou se pensa que não pode, de qualquer forma você está certo.

Henry Ford

RESUMO

BATISTA, Camila Macedo. **Estrutura e função vascular na insuficiência cardíaca induzida pela doxorubicina**. 2018. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2018.

A doxorubicina é um antibiótico da classe das antraciclinas eficaz e bastante utilizado no tratamento de vários tipos de câncer, porém, seu uso clínico pode ser limitado pelos seus conhecidos efeitos tóxicos sobre o coração. Pelo fato do sistema circulatório ser um sistema fechado, não se pode negligenciar a influência da função vascular sobre a função cardíaca. De fato, estudos epidemiológicos evidenciam uma associação inversa entre função endotelial e gravidade da insuficiência cardíaca. No entanto, até o momento, as investigações acerca das alterações vasculares após o tratamento com doxorubicina são escassas. O presente estudo objetivou investigar as alterações na estrutura e função vascular induzidas pela doxorubicina em roedores. Para isso, ratos SpragueDawley machos (250-300 g) foram distribuídos entre os grupos DOX (n inicial = 20) e controle (n inicial = 13) e receberam injeções intraperitoneais de DOX ($1 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ durante 10 dias; dose total, 10 mg.kg^{-1}) ou de solução salina (NaCl 0,9 %), respectivamente. A massa corporal e a pressão arterial média desses animais foram aferidas regularmente ao longo do protocolo experimental. Quatro semanas após a última injeção de DOX ou salina, foi realizada a eutanásia com uma superdose de tiopental sódico (90 mg.kg^{-1} , i.p.). O leito arterial mesentérico dos animais foi removido e isolado para estudo da reatividade vascular, a qual foi avaliada com a administração dos seguintes vasopressores: norepinefrina, fenilefrina, cloreto de potássio (KCl) e vasopressina. O remodelamento das artérias aorta e femoral foi avaliado por microscopia óptica após coloração com tricrômico de Masson. Uma mortalidade de 25% foi observada no grupo DOX, enquanto todos os animais do grupo controle sobreviveram. Os animais do grupo DOX apresentaram redução da massa corporal e da pressão arterial média em relação ao grupo controle. Os dados histológicos mostraram que tanto a artéria aorta torácica como a femoral do grupo DOX apresentaram uma maior deposição de fibras colágenas na túnica média quando comparados com o grupo controle. Além disso, as micrografias sugerem que em comparação com o grupo controle, no grupo DOX, a artéria femoral apresenta a túnica média mais espessa com consequente redução no diâmetro da luz, o que não foi evidenciado na artéria aorta desses animais. Do ponto de vista funcional, o grupo DOX apresentou menor resposta vasopressora quando estimulados com doses crescentes de fenilefrina, norepinefrina e KCl; e, paradoxalmente, maior resposta vasopressora quando estimulado com doses crescentes de vasopressina. Nossos resultados sugerem que, além dos conhecidos efeitos adversos sobre o coração, a doxorubicina provoca um remodelamento vascular que pode contribuir para a disfunção contrátil observada. A paradoxal resposta constritora à vasopressina pode ser importante do ponto de vista terapêutico, embora os mecanismos ainda precisem ser investigados.

Palavras-chave: Agentes cardiotoxícos. Insuficiência cardíaca. Vasos sanguíneos.

Vasoconstrição. Remodelamento vascular.

ABSTRACT

BATISTA, Camila Macedo. **Structure and vascular function in heart failure induced by doxorubicin**. 2018. 46 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2018.

Doxorubicin is an effective anthracycline antibiotic widely used in the treatment of various types of cancer, but its clinical use may be limited by its known toxic effects on the heart. Because the circulatory system is a closed system, we can not overlook the influence of vascular function on cardiac function. In fact, epidemiological studies show an inverse association between endothelial function and heart failure severity. However, to date, investigations about vascular changes following doxorubicin treatment are scarce. The present study aimed to investigate the alterations in vascular structure and vascular function induced by doxorubicin in rodents. For this, male Sprague Dawley rats (250-300 g) were distributed between DOX (initial n = 20) and control (initial n = 13) groups and received intraperitoneal injections of DOX ($1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ during 10 days, total dose, 10 mg.kg^{-1}) or saline solution (NaCl 0.9%), respectively. Body mass and mean arterial pressure of these animals were measured regularly throughout the experimental protocol. Four weeks after the last injection of DOX or saline, euthanasia was performed with an overdose of sodium thiopental (90 mg.kg^{-1} , i.p.). The mesenteric arterial bed of the animals was removed and isolated for vascular reactivity, which was evaluated with the administration of the following vasopressors: norepinephrine, phenylephrine, potassium chloride (KCl) and vasopressin. The animals in DOX group presented a reduction in body mass and mean arterial pressure in relation to control group. Histological data showed that both the thoracic and femoral aortic arteries of the DOX group had a higher deposition of collagen fibers in the tunica media when compared to the control group. In addition, the micrographs suggest that in the DOX group, the femoral artery presents a thicker tunica media with a consequent reduction in the lumen diameter, which was not evidenced in the aorta artery of these animals. From the functional point of view, the DOX group had a lower vasopressor response when stimulated with increasing doses of phenylephrine, norepinephrine and KCl; and, paradoxically, greater vasopressin response when stimulated with increasing doses of vasopressin. Our results suggest that in addition to the known adverse effects on the heart, doxorubicin causes a vascular remodeling that may contribute to the observed contractile dysfunction. The paradoxical constricting response to vasopressin may be important from a therapeutic point of view, although the mechanisms still need to be investigated.

Keywords: Cardiotoxic agents. Heart failure. Blood vessels. Vasoconstriction. Vascular remodeling.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Comparação das paredes de uma artéria elástica, uma artéria muscular e arteríola.....	18
Figura 2 –	Representação esquemática do mecanismo de regulação da contração do músculo liso.....	20
Figura 3 -	Representação gráfica de possíveis efeitos tóxicos vasculares causados por quimioterápicos.....	25
Gráfico 1 –	Massa corporal dos animais dos grupos controle e DOX.....	31
Figura 4 -	Fotomicrografia representativa da artéria aorta torácica do grupo controle (A e B) e DOX (C e D) corada com tricrômico de Masson..	33
Figura 5 -	Fotomicrografia representativa da artéria femoral do grupo controle (A e B) e DOX (C e D) corada com tricrômico de Masson.....	33
Gráfico 2 –	Reatividade do leito arterial mesentérico à norepinefrina (B), vasopressina (C), ao KCl (E) e à fenilefrina (F). Nos gráficos (A) e (D) estão apresentados traçados típicos de um registro de reatividade vascular.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Massa do coração e do ventrículo esquerdo em valores absolutos e relativos à massa corporal dos animais DOX e controle.....	32
Tabela 2 –	Massa do coração e do ventrículo esquerdo em valores absolutos e relativos à massa corporal dos animais dox e controle.....	32
Tabela 3 –	Resposta contrátil do leito arterial mesentérico.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DAG	Diacilglicerol
DOX	Doxorrubicina
ET-1	Endotelina 1
GDP	Guanosina monofosfato
GEFs	Fatores de troca do nucleotídeo guanina
GTP	Trifosfato de guanosina
IP3	Fosfatidilinositol (1, 4, 5) trifosfato
KCl	Cloreto de potássio
MLC	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase cadeia leve de miosina
MLCP	Fosfatase de cadeia leve de miosina
Mn-SOD	Superóxido desmutase dependente de manganês
PLC β	Fosfolipase C β
Top2A	Topoisomerase 2 alfa
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REVISÃO DA LITERATURA	14
1.1	Doxorrubicina: agente cardiotoxíco	14
1.2	Mecanismos de cardiotoxicidade	15
1.3	Sistema circulatório	17
1.4	Regulação do tônus vascular	19
1.4.1	<u>Aumento da concentração intracelular de cálcio</u>	21
1.5	Doxorrubicina e sistema vascular	22
1.6	Lacuna científica	25
2	OBJETIVOS	27
2.1	Objetivos gerais	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	MÉTODOS	28
3.1	Animais	28
3.2	Administração de doxorubicina	28
3.3	Medida da massa corporal e pressão arterial	28
3.4	Eutanásia e isolamento de órgãos	29
3.5	Remodelamento da parede vascular	29
3.6	Reatividade vascular	29
3.7	Análise estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Observações gerais e dados antropométricos	31
4.2	Pressão arterial	32
4.3	Estrutura e remodelamento vascular	33
4.4	Reatividade vascular	34
5	DISCUSSÃO	36
	CONCLUSÃO	40
	REFERÊNCIAS	41

INTRODUÇÃO

Os avanços no diagnóstico e tratamento do câncer têm resultado em um aumento importante na sobrevida dos pacientes. Ao longo dos últimos 30 anos, a taxa de sobrevida em cinco anos para todos os tipos de câncer aumentou entre 20 e 25% em média (SIEGEL, R. L. et al., 2017). Entretanto, a morbidade e a mortalidade prematura pelos efeitos adversos do tratamento quimio- e radioterápico também aumentaram, dentre os quais as complicações cardiovasculares são as mais comuns (ZAMORANO, J. L. et al., 2016). Um dos medicamentos mais conhecidos pelo seu potencial de toxicidade cardíaca é a doxorubicina.

A doxorubicina é um antibiótico da classe das antraciclinas eficaz e bastante utilizado no tratamento de tumores sólidos e hematológicos, inclusive em crianças. O seu uso, no entanto, está associado a alterações morfológicas e funcionais no coração que podem resultar no desenvolvimento de insuficiência cardíaca. Swain et al. (2003), em uma análise retrospectiva, observaram que a incidência de insuficiência cardíaca era dose dependente e que chegou a 48% dos pacientes tratados com uma dose cumulativa de 700 mg.m^{-2} . A doxorubicina causa graves alterações estruturais, com perda de miofibrilas, vacuolização do citoplasma, degeneração de mitocôndrias e distensão do retículo sarcoplasmático (CHATTERJEE, K. et al., 2010). Funcionalmente, há redução da função contrátil e, conseqüentemente, da fração de ejeção; com concomitante disfunção diastólica (CHATTERJEE, K. et al., 2010). O prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca induzida por esse fármaco é mais grave que a secundária a outras etiologias, como isquêmica e hipertensiva (FELKER, G. M. et al., 2000).

Apesar dos conhecidos efeitos da doxorubicina sobre o coração, muito pouco se sabe sobre as alterações vasculares causadas por esse quimioterápico. Pelo fato do sistema circulatório ser um sistema fechado em mamíferos, não se pode negligenciar a influência da função vascular sobre a função cardíaca. De fato, estudos epidemiológicos evidenciam uma associação inversa entre função endotelial e morbidade e mortalidade na insuficiência cardíaca (KATZ, S. D. et al., 2005, SHECHTER, M. et al., 2009). Agudamente, a doxorubicina parece reduzir a capacidade de relaxamento dependente do endotélio, como documentado no artigo de Duquaine (2003) que mediu a dilatação fluxo mediada após a primeira sessão de quimioterapia com esse fármaco. Em artérias isoladas de animais saudáveis, a

doxorubicina agudamente induz vasoconstrição por um aumento na liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. No entanto, sua capacidade em aumentar a liberação de cálcio parece ser limitada pois, após um período de tempo, os canais de cálcio se tornam irreversivelmente inativados (ONDRIAS, K. et al., 1990). Cronicamente, estudos em humanos evidenciam que pacientes submetidos a um regime quimioterápico que incluía a doxorubicina apresentaram uma redução da complacência da artéria aorta e da carótida comum interna, além de um aumento na rigidez dessas mesmas artérias (MIZIA-STECCO, K. et al., 2013a). Tais resultados sugerem que possa ter havido um remodelamento vascular, alterando as propriedades elásticas dos vasos, e que o controle vasomotor também possa estar comprometido, embora não haja evidências confirmando tais hipóteses.

Assim, no presente trabalho serão investigadas as alterações na estrutura e função vascular induzidas pelo tratamento crônico com doxorubicina em roedores.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doxorubicina: agente cardiotóxico

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento do câncer, a morbidade e a mortalidade prematura pelos efeitos adversos do tratamento quimioterápico aumentaram. Dentre eles, as complicações cardiovasculares são os mais comuns (ZAMORANO, J. L. et al., 2016).

A doxorubicina é um potente agente quimioterapêutico de amplo espectro, eficaz e bastante utilizado no tratamento de vários tipos de tumores sólidos e hematológicos (EWER, M. S. e EWER, S. M., 2010). Esse fármaco pertence à classe das antraciclina, a qual é composta por quatro fármacos principais: doxorubicina, daunorrubicina, epirrubicina e idarrubicina (SIMUNEK, T. et al., 2009). Os efeitos antineoplásicos dessa família foram identificados pela primeira vez na década de 1950, quando foi isolada a partir da fermentação da bactéria *Streptomyces peucetius* (DI MARCO, A. et al., 1981). A doxorubicina foi identificada na década de 1960 a partir da daunorrubicina e mostrou ser um agente antitumoral mais efetivo que a última (ARCAMONE, F. et al., 1969). Seu uso clínico foi aprovado em 1974 e, desde então, tem sido a antraciclina mais prescrita (LENNEMAN, A. J. et al., 2013). No entanto, assim como outras antraciclina, seu uso clínico pode ser limitado pela sua cardiotoxicidade, que pode culminar no desenvolvimento de cardiomiopatia irreversível e insuficiência cardíaca (CHATTERJEE, K. et al., 2010). Estima-se que a incidência de insuficiência cardíaca seja de 5% com uma dose cumulativa de 400 mg.m⁻² e possa chegar a 48% com uma dose cumulativa de 700 mg.m⁻² (SWAIN, S. M. et al., 2003). A insuficiência cardíaca secundária ao tratamento com doxorubicina apresenta um prognóstico mais adverso que a de outras etiologias, como isquêmica e hipertensiva (FELKER, G. M. et al., 2000). Os pacientes apresentam uma menor taxa e um menor tempo de sobrevida (FELKER, G. M. et al., 2000). Dados de uma base de dados norte americana sobre transplantes (United Network of Organ Sharing) demonstram que entre 1987 e 2011 foram realizados 453 transplantes de coração nessa população e que o número de transplantes/ano aumentou exponencialmente nesse período (LENNEMAN, A. J. et

al., 2013). Além disso, esses pacientes eram significativamente mais jovens que os de outras cardiomiopatias (mediana de 44 vs 52 anos).

A cardiomiopatia induzida por doxorubicina foi durante muito tempo considerada uma lesão irreversível do tipo I e classificada em aguda, subaguda e crônica de acordo com o momento de aparecimento (SBC, 2011). Ambas as categorizações estão sendo atualmente questionadas. Recentemente, Cardinale et al. (2015) demonstraram que pacientes tratados com doxorubicina e com evidências precoces de disfunção ventricular esquerda sistólica apresentaram remissão do quadro após tratamento com medicamentos usualmente utilizados na insuficiência cardíaca, como inibidores da enzima conversora de angiotensina e betabloqueadores. Os benefícios foram particularmente observados naqueles que ainda não apresentavam sintomas de disfunção cardíaca, salientando a necessidade atual de identificação de biomarcadores precoces de lesão cardíaca e de acompanhamento próximo da função ventricular. A classificação temporal da cardiotoxicidade foi feita considerando-se unicamente estudos retrospectivos em que a medida da fração de ejeção foi medida aleatoriamente ou após o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (ZAMORANO, J. L. et al., 2016). Evidências mais recentes têm sugerido que, ao invés disso, a cardiotoxicidade seja um fenômeno contínuo que se inicie com uma lesão aguda que leve a alterações graduais na estrutura e na função cardíaca (CARDINALE, D. et al., 2015). Uma vez instalada, a cardiomiopatia causada pela doxorubicina é caracterizada por graves alterações estruturais, com áreas de fibrose intersticial, vacuolização do citoplasma e necrose de cardiomiócitos (EWER, M. S. e EWER, S. M., 2010). Como consequência de tais alterações estruturais, os pacientes podem apresentar redução tanto na função diastólica como sistólica ventricular esquerda (ZAMORANO, J. L. et al., 2016).

1.2 Mecanismos de cardiotoxicidade

Apesar do seu uso extensivo, o mecanismo da ação cardiotóxica da doxorubicina não é claro e, aparentemente, é uma combinação de vários mecanismos diferentes. A hipótese mais aceita é a que envolve as espécies reativas de oxigênio. A doxorubicina pode ser reduzida pela NADH desidrogenase no

complexo I da cadeia respiratória mitocondrial formando um radical semiquinona que, por sua vez, pode reagir com o oxigênio molecular para formar o radical ânion superóxido (DAVIES, K. J. e DOROSHOW, J. H., 1986), podendo resultar ainda na produção de peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (DOROSHOW, J. H. e DAVIES, K. J., 1986). Além disso, a formação de complexos ferro-doxorrubicina pode catalisar uma reação de Fenton (conversão do peróxido de hidrogênio a radical hidroxila catalisada por Fe^{2+}) o que resulta na geração do radical hidroxila, uma espécie reativa de oxigênio altamente reativa. É provável que os cardiomiócitos sejam mais sensíveis ao estresse oxidativo causado pela doxorrubicina por terem grande parte de seu volume constituído por mitocôndrias e alta dependência do metabolismo do substrato oxidativo (MINOTTI, G. et al., 2004). Em modelo animal, o aumento da expressão da superóxido dismutase dependente de manganês (Mn-SOD) diminui a apoptose e promove melhoria na função do ventrículo esquerdo, em ratos tratados com doxorrubicina, enquanto sua deleção aumenta os efeitos cardiotoxicos do fármaco. Tal estudo demonstra a importância da modulação da produção de espécies reativas de oxigênio para o aprimoramento dos efeitos da doxorrubicina (DAOSUKHO, C. et al., 2005, COLE, M. P. et al., 2006).

A toxicidade exercida pela doxorrubicina em cardiomiócitos está relacionada com a formação de radicais livres, que causam morte celular através de vias apoptóticas (VOLKOVA, M. e RUSSELL, R., 2011). O tratamento com esse fármaco causa nos cardiomiócitos ativação de caspase3 e 9, abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e posterior liberação de citocromo C no citosol (WANG, G. W. et al., 2001, CHILDS, A. C. et al., 2002). Além disso, a doxorrubicina se liga diretamente ao fosfolípido mitocondrial, a cardiolipina, interrompendo a associação das proteínas internas da membrana mitocondrial com a mesma (TOKARSKA-SCHLATTNER, M. et al., 2007), o que poderia aumentar a liberação do citocromo C em resposta ao estresse oxidativo. A ativação da apoptose induzida por doxorrubicina é mediada em parte pela ativação do MAPK p38 (GRETHE, S. et al., 2006).

Mais recentemente, uma segunda hipótese vem sendo proposta para explicar o potencial cardiotoxico da doxorrubicina (VEJPONGSA, P. e YEH, E. T., 2014). A topoisomerase 2 é fundamental para a recombinação, transcrição ou replicação do DNA, e possui duas isoformas: α e β . A isoforma α está presente em células em proliferação e constitui o alvo molecular para a ação antitumoral da doxorrubicina. A

doxorubicina inibe a topoisomerase 2 causando separação das fitas duplas de DNA e bloqueando a transcrição e replicação, o que impede o crescimento rápido de células cancerosas e/ou causa inibição da atividade dessa enzima (GEWIRTZ, D. A., 1999).

Por outro lado, a isoforma β está presente em células quiescentes, incluindo cardiomiócitos, e sua inibição pode resultar em quebra das fitas duplas de DNA e morte celular (NITISS, J. L., 2009). Embora o mecanismo da cardiotoxicidade seja mal compreendido, resultados recentes sugerem que a doxorubicina iniba a topoisomerase 2β , o que pode contribuir significativamente para os efeitos indesejáveis desta antraciclina (VEJPONGSA, P. e YEH, E. T., 2014).

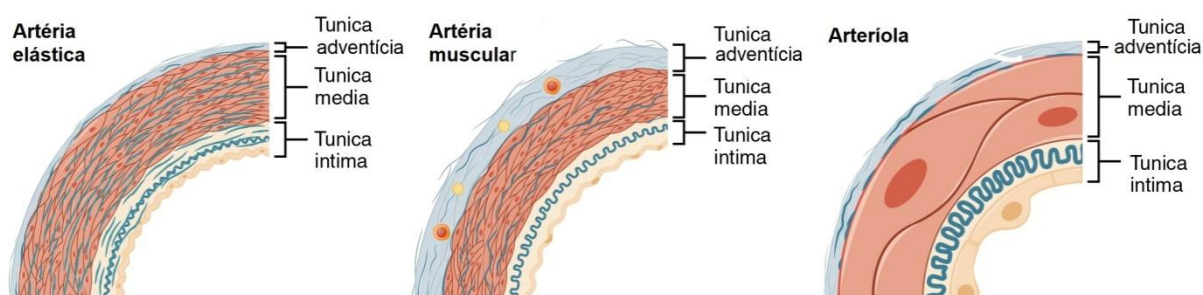
1.3 Sistema circulatório

O sistema circulatório é composto pelo coração, vasos sanguíneos e pelo sangue em si e é responsável por atender às demandas metabólicas das células periféricas. A sua regulação ocorre de maneira bastante precisa de modo a garantir um débito cardíaco e pressão arterial adequados para que sua função primária seja atendida. O coração é o órgão cuja função é bombear o sangue por todo o sistema vascular. Este, por sua vez, é compreendido pelas artérias, arteríolas, capilares, vênulas e veias. Os diferentes segmentos do sistema vascular possuem estrutura e função distintas, mas com um componente estrutural em comum – o endotélio. O endotélio é formado por uma única camada de células endoteliais que reveste a superfície dos vasos que está em contato com o sangue. Hoje, sabe-se que as células endoteliais são capazes de secretar diversas moléculas que possuem funções importantes na manutenção do tônus e homeostase vascular (JUNQUEIRA, L. e CARNEIRO, J., 2004).

De modo didático, a cada um dos diferentes segmentos do sistema vascular são atribuídas características estruturais específicas. No entanto, o mesmo vaso pode apresentar alterações em sua estrutura ao longo de seu percurso, uma vez que a transição de um tipo de vaso para outro ocorre de maneira gradual. Os vasos sanguíneos são usualmente compostos pelas túnicas (ou camadas) adventícia, média e íntima (do exterior para o interior). A túnica adventícia é formada

principalmente por colágeno do tipo I e fibras elásticas, já a média, por células musculares lisas interpostas por fibras elásticas, reticulares, proteoglicanas e glicoproteínas. A túnica íntima, por sua vez, é formada por uma camada de células endoteliais (JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J., 2004). A Figura 1 ilustra as características estruturais de artérias elásticas, musculares e arteríolas.

Figura 1 - Comparação das paredes de uma artéria elástica, uma artéria muscular e uma arteríola



Fonte:WikimediaCommons<https://commons.wikimedia.org/wiki/File%3A2103_Muscular_and_Elastic_Artery_Arteriole.jpg>Acesso em 06/02/2018.

As artérias têm a função de condução do sangue além de servirem como um “reservatório de pressão” garantindo o fluxo sanguíneo durante a diástole. Podem ser ainda diferenciadas entre as grandes artérias elásticas (aorta e seus ramos) e as artérias médias musculares. As artérias elásticas possuem várias lâminas elásticas na túnica média que auxiliam, principalmente, a acomodar as variações de pressão. As artérias musculares, por sua vez, possuem uma túnica média composta essencialmente por células musculares lisas e, assim, auxiliam no controle do fluxo sanguíneo para os vários órgãos. Mais distalmente no sistema vascular, encontram-se as arteríolas. Estas possuem um diâmetro inferior a 0,5 mm em humanos e possuem uma túnica média formada por uma ou duas camadas de células musculares lisas. As arteríolas desempenham duas funções principais: distribuição do fluxo sanguíneo e, em conjunto, determinam a resistência vascular e, por conseguinte, a pressão arterial (JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J., 2004, WIDMAIER, E. P. et al., 2006). Como estabelecido pela equação de Poiseuille, a resistência depende diretamente do comprimento do vaso e de sua viscosidade e,

inversamente, do raio do vaso elevada à quarta potência (Equação 1). Assim, alterações no raio do vaso, por vasoconstrição ou vasodilatação são determinantes essenciais da resistência vascular periférica que, por sua vez, é um determinante importante da pressão arterial (Equação 2).

Equação 1 - Equação de Poiseulle, onde R, resistência ao fluxo; η , viscosidade do fluido; L, comprimento do vaso; r, raio do vaso

$$R = \frac{8 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot r^4}$$

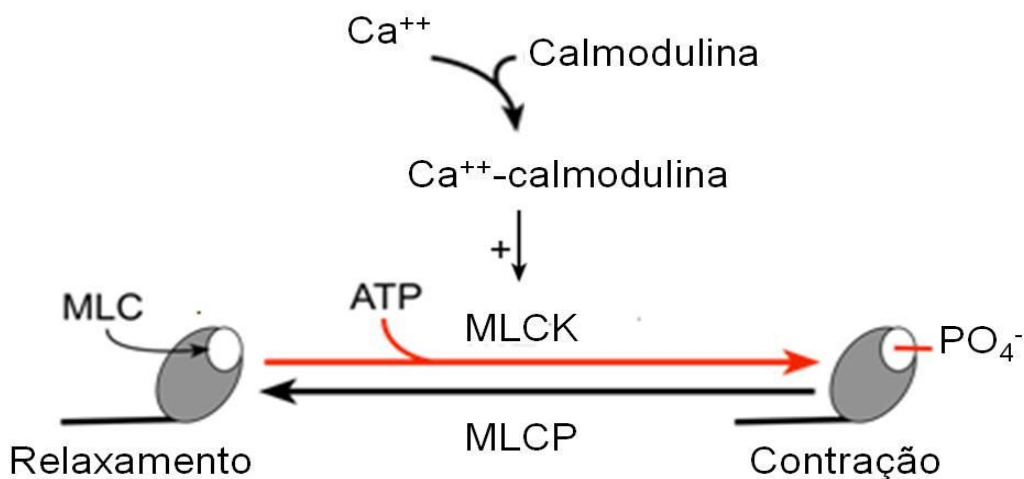
Equação 2 - Determinantes da pressão arterial, onde PAM, pressão arterial média; Q, débito cardíaco; RVP, resistência vascular periférica

$$PAM = \dot{Q} \cdot RVP$$

1.4 Regulação do tônus vascular

O tônus vascular (contração da parede vascular) e a regulação da luz do vaso sanguíneo são diretamente controlados pelas células musculares lisas presentes na túnica média. Em condições fisiológicas normais, as células musculares lisas dos vasos sanguíneos possuem uma plasticidade considerável, sendo fundamentais para a autorregulação da pressão arterial. O envelhecimento e condições patológicas podem afetar essa autorregulação, seja por alterações estruturais que resultem em remodelamento vascular, desequilíbrio entre sinalizadores constritores e de relaxamento, ou sinalização intracelular inapropriada a alguma molécula vasoativa. O tônus vascular depende da atividade espontânea do músculo liso vascular (tônus intrínseco) e do balanço entre sinais externos, que compreendem o controle neurohumoral e controladores locais (WIDMAIER, E. P. et al., 2006).

Figura 2 - Representação esquemática do mecanismo de regulação da contração do músculo liso



Legenda: MLC, cadeia leve de miosina; MLCK, quinase de cadeia leve de miosina; MLCP, fosfatase de cadeia leve de miosina; PO_4^- , fosfato.

A contração do músculo liso difere da contração do músculo esquelético e do cardíaco, mas que também se inicia com um aumento na concentração intracelular de cálcio. Este íon se liga à calmodulina, formando um complexo cálcio-calmodulina que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK do inglês, *myosin light chainkinase*). Esta por sua vez, fosforila o resíduo Ser-19 da cadeia leve de miosina (MLC do inglês, *myosin light chain*) na cadeia globular da miosina, levando ao aumento da afinidade dos filamentos grossos de miosina pelos de actina, promovendo a contração celular (WEBB, R. C., 2003). O estado vasorrelaxante ocorre após o desacoplamento do agente vasoconstritor do seu receptor específico com consequente redução da concentração intracelular de cálcio e ativação da enzima fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP do inglês, *myosin light chainphosphatase*), enzima responsável pela retirada do grupo fosfato da cadeia leve de miosina e consequente relaxamento do vaso (Figura 2). A modulação do estado contrátil ocorre basicamente por alterações na concentração intracelular de cálcio ou por inibição da desfosforilação da cadeia leve de miosina (BROZOVICH, F. V. et al., 2016).

1.4.1 Aumento da concentração intracelular de cálcio

O controle extrínseco do tônus vascular se dá pela modulação dos níveis de cálcio intracelular por fatores neurohumorais e locais. Existem duas fontes principais de cálcio no músculo liso vascular: (1) retículo sarcoplasmático e (2) entrada de cálcio extracelular principalmente através de canais de cálcio transmembranatipo L dependentes de voltagem, cuja contribuição relativa depende da molécula sinalizadora.

O controle neurohumoral tem como elemento central a vasoconstrição mediada por receptores α_1 -adrenérgicos. As células do músculo liso vascular recebem inervação do sistema nervoso simpático e o aumento da liberação de norepinefrina resulta em aumento da concentração intracelular de cálcio. O músculo liso vascular possui, fisiologicamente, predominância do subtipo de receptor adrenérgico α_1 , que é um tipo de receptor acoplado à proteína G_q , cuja estimulação resulta em ativação da fosfolipase C e subsequente hidrólise de fosfatidilinositol em inositol (1,4,5) trisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG). As moléculas de IP_3 atuam em receptores ionotrópicos específicos presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, denominados IP_3R , liberando cálcio do mesmo e resultando em contração muscular, como descrito na Figura 2. Cabe ressaltar que a vasoconstrição decorrente da ativação do receptor α_1 é contrabalanceada por uma vasodilatação secundária à ativação de receptores β_2 . No entanto, esse subtipo de receptor está presente em densidade bem menor que a dos receptores α_1 no músculo liso vascular e mais localizado em vasos que perfundem os músculos esqueléticos (BRUNTON, L. L. et al., 2012); assim, o produto final da ativação simpática é uma vasoconstrição.

Além da ação direta da norepinefrina liberada pelos neurônios pós-ganglionares simpáticos, outros hormônios também possuem propriedades vasoativas, incluindo epinefrina, vasopressina e angiotensina II (WIDMAIER, E. P. et al., 2006). A epinefrina, hormônio sintetizado a partir da norepinefrina nas células cromafins da medula suprarrenal, tem uma ação similar à norepinefrina. O único ponto de divergência entre ambos está relacionado à afinidade pelos subtipos de receptores adrenérgicos. A norepinefrina tem uma afinidade pelos receptores α_1 muito maior que pelos β_2 , enquanto a epinefrina tem afinidade similar pelos

receptores α e β (BRUNTON, L. L. et al., 2012). Por conseguinte, o efeito vasoconstritor da norepinefrina é mais pronunciado que o da epinefrina.

A vasopressina também possui papel importante na contração muscular. A vasopressina é um hormônio antidiurético produzido por neurônios magnocelulares localizados nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo com projeções celulares na hipófise posterior, local onde a vasopressina fica armazenada antes de sua liberação (MEYER-LINDENBERG, A. et al., 2011). Uma vez na corrente sanguínea, a vasopressina possui tempo de meia-vida entre 10 e 35 minutos e é degradada nos rins e fígado através de peptidases. O aumento da osmolaridade plasmática, a redução na tensão atrial por hipovolemia, ou a simples queda na pressão arterial por qualquer outro indicativo são fatores que estimulam os barorreceptores, localizados na carótida e no átrio esquerdo cardíaco, e os osmorreceptores, localizados no sistema nervoso central, a liberarem a vasopressina previamente armazenada, e ainda estimulam a produção deste hormônio em um novo ciclo (HOLMES, C. L. et al., 2001). Existem três subtipos de receptores de vasopressina: V1a, V2 e V1b; todos da família dos receptores acoplados à proteína G. O receptor do tipo V1a é expresso nos vasos sanguíneos. A ligação da vasopressina ao receptor V1a ativa uma proteína G do tipo q/11 ($G_{q/11}$), responsável pela ativação de uma classe de enzimas denominadas fosfolipases C β (PLC β), e que irá culminar na contração das células do músculo liso vascular pela mesma via descrita para a norepinefrina. Quando comparado a outros vasoconstritores como a noradrenalina e a fenilefrina, as quais ativam receptores adrenérgicos, a vasopressina é muito mais potente. Isso porque além do mecanismo de contração citado acima, este hormônio também utiliza outras cascatas contráteis para sua função na musculatura lisa vascular, como será abordado mais adiante.

1.5 Doxorrubicina e sistema vascular

Embora o potencial cardiotoxico da doxorrubicina, incluindo o risco elevado de desenvolvimento de disfunção ventricular esquerda e insuficiência cardíaca, seja

extensamente estudado, os efeitos, principalmente crônicos, desse fármaco sobre a estrutura e a função vascular ainda permanecem muito pouco entendidos.

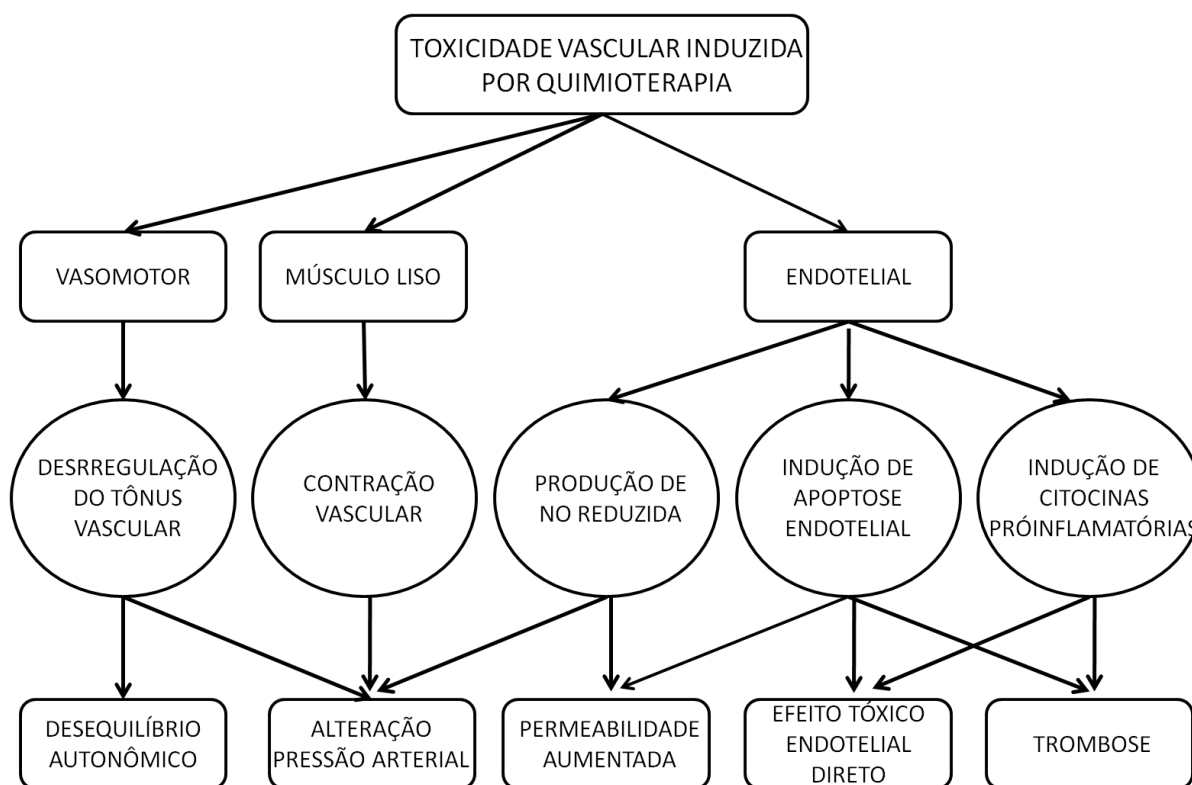
Os efeitos agudos foram medidos tanto em humanos quanto em vasos isolados de animais. Em humanos, Duquaine et al. (2003) mediram a reatividade vascular por ultrassonografia após a primeira sessão de tratamento com doxorubicina (60 mg.m^{-2} ; média de duração da infusão, 27 min) e observaram uma redução da dilatação fluxo mediada e de níveis circulantes de nitritos e nitratos, sugerindo uma disfunção endotelial. Os autores, no entanto, não observaram redução na vasodilatação induzida por nitroglicerina, sugerindo que, agudamente, a capacidade de relaxamento do músculo liso vascular não seja afetada. Um prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio também foi observado *in vitro*. Em artéria aorta isolada de ratos saudáveis, a vasodilatação induzida por acetilcolina foi significativamente reduzida após infusão de doxorubicina (AL-ABBASI, F. A. et al., 2016). No que diz respeito às propriedades contráteis, a doxorubicina, por si só, induz contração de artérias musculares, como a mesentérica (KANMURA, Y. et al., 1989). Além disso, anéis de aorta isoladas de animais, quando agudamente expostos à doxorubicina apresentam responsividade exagerada à fenilefrina (AL-ABBASI, F. A. et al., 2016). Esses resultados podem ser causados por um efeito direto do fármaco sobre o retículo sarcoplasmático. Existem evidências de que a doxorubicina se ligue diretamente ao receptor de rianodina cardíaco (SAEKI, K. et al., 2002). Embora não observado em retículo sarcoplasmático de células musculares lisas, pode-se esperar que a mesma afinidade ocorra, uma vez que a doxorubicina aumenta a liberação de cálcio pelo retículo (Kanmura et al., 1989). No entanto, seus efeitos sobre o retículo sarcoplasmático parecem ocorrer de modo inverso dependendo do tempo de exposição. Agudamente, há um aumento na liberação de cálcio, mas após um tempo, os canais de cálcio se tornam inativos de maneira irreversível (ONDRIAS, K. et al., 1990). Um dos possíveis mecanismos responsáveis por essa inativação do canal está associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pela doxorubicina e consequente oxidação de proteínas importantes na homeostase intracelular de cálcio. Quando as vesículas de retículo sarcoplasmático foram pré-incubadas com ditiotreitól, a inativação do canal foi evitada (ONDRIAS, K. et al., 1990). O ditiotreitól é um agente que mantém grupos sulfidrila no estado reduzido, sugerindo uma prevenção da oxidação de grupos sulfidrila críticos ao funcionamento dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático.

Como mencionado anteriormente, tanto em humanos como em animais, são escassas as investigações sobre os efeitos crônicos da doxorubicina sobre os vasos sanguíneos. Em humanos, é difícil estudar seu efeito isolado, uma vez que a doxorubicina é apenas um dos medicamentos que compõem o regime quimioterápico a um dado paciente. As poucas evidências sugerem que o tratamento com doxorubicina pode resultar em alterações vasculares tardias. Mulheres com câncer de mama foram acompanhadas por 12 meses após o término do tratamento e observou-se que a quimioterapia não levou a alterações na pressão arterial, mas houve uma redução da complacência da artéria carótida comum e da aorta e a um aumento da rigidez dessas mesmas artérias (DRAFTS, B. C. et al., 2013, MIZIA-STECK, K. et al., 2013a). O aumento da rigidez arterial pode dever-se a uma série de fatores, incluindo um possível remodelamento arterial ou uma disfunção endotelial que altere o equilíbrio entre os agentes vasoativos. Estudos *in vitro* demonstram que a doxorubicina induz apoptose e exsfoliação de células endoteliais em artérias ou células endoteliais em cultura (MURATA, T. et al., 2001c, WU, S. et al., 2002), o que pode resultar em um prejuízo na capacidade de relaxamento mediado pelo óxido nítrico. Sobre as alterações morfológicas, é possível somente especular que tenham ocorrido com base na alteração das respostas elásticas do vaso, pois, até o momento, não foram encontrados estudos na literatura a respeito.

Apesar do aumento da rigidez arterial, a resposta contrátil aos vasoconstritores norepinefrina (DALSKE, H. F. e HARDY, K., 1988), endotelina-1 e KCl (MURATA, T. et al., 2001a) também encontra-se deprimida após o tratamento crônico com doxorubicina em roedores (DALSKE, H. F. e HARDY, K., 1988) ou artéria em cultura (MURATA, T. et al., 2001a). Os mecanismos ainda são muito obscuros, mas pode estar parcialmente relacionado a uma redução na expressão gênica de receptores α_{1A} -adrenérgicos em aorta (MURATA, T. et al., 2001a) ou a já mencionada inativação de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (ONDRIAS, K. et al., 1990). No entanto, esses mecanismos não explicam a redução da responsividade aos outros agentes vasoconstritores.

A Figura 3 ilustra os possíveis locais de dano dos agentes quimioterápicos e as possíveis consequências para a homeostase vascular.

Figura 3 - Representação gráfica de possíveis efeitos tóxicos vasculares causados por quimioterápicos. Adaptado de Soulati et al. (2012)



1.6 Lacuna científica

Apesar das extensas investigações sobre os mecanismos e estratégias de prevenção da cardiotoxicidade induzida pelo tratamento com doxorrubicina, muito pouco se sabe sobre os seus efeitos vasculares. Como o sistema circulatório de mamíferos é um sistema fechado, não se pode negligenciar a influência do sistema vascular sobre o coração e vice-versa. Sabe-se que a função vascular possui um papel central no próprio desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca. Tanto a disfunção endotelial como o aumento da rigidez arterial estão associados a um risco aumentado de mortalidade nessa população (Katz et al., 2005). Assim, conhecer de que modo a doxorrubicina pode afetar a morfologia e a função vascular

torna-se essencial para um possível estabelecimento de estratégias preventivas e terapêuticas.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo principal investigar as possíveis alterações na estrutura e função vascular induzidas pela doxorubicina em roedores.

2.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar as alterações estruturais em artérias de ratos tratados cronicamente com doxorubicina;
- b) Medir a resposta contrátil a diferentes agentes vasopressores em artéria isolada de ratos tratados cronicamente com doxorubicina.

3 MÉTODOS

O presente estudo tem a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, UERJ (protocolo CEUA 023/2015).

3.1 Animais

A amostra foi composta por 33 ratos Sprague Dawley machos pesando 200-300 g, com idade inicial de oito semanas que foram divididos em dois grupos: controle (n=13) e DOX (n=20). Os animais tiveram acesso livre à água e ração e foram mantidos em biotério com controle de temperatura (21-24° C), com ciclo claro-escuro de 12:12 h (luzes acesas às 6 h).

3.2 Administração de doxorubicina

O cloridrato de doxorubicina (Adriblastina[®], Pfizer, Brasil) foi administrado por infusão intraperitoneal, diariamente, durante 10 dias consecutivos, em dose de 1 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ (dose total: 10 mg.kg⁻¹) (HAYWARD, R. e HYDOCK, D. S., 2007). Os animais do grupo controle receberam solução salina (NaCl 0,9 %) de acordo com o mesmo protocolo.

3.3 Medida da massa corporal e pressão arterial

A massa corporal dos animais foi medida semanalmente em balança eletrônica (Bel Photonics, SP, Brasil). Já a pressão arterial foi medida ao final do período experimental por plestimografia de cauda (CODA Non Invasive Blood

Pressure system, Kent Scientific Corporation, CT, EUA) de modo não invasivo em ratos conscientes. Esse sistema utiliza um manguito posicionado na cauda do animal e a medida da pressão arterial é feita pelo método VPR (do inglês, *volume pressure recording*).

3.4 Eutanásia e isolamento de órgãos

Quatro semanas após a última administração de doxorubicina ou salina, os animais foram anestesiados com uma superdose de tiopental sódico (90 mg.kg⁻¹, i.p.). Em seguida, foram removidos o leito arterial mesentérico para estudos de reatividade vascular e as artérias aorta torácica e femoral para microscopia óptica. Para esta última análise, os fragmentos foram imediatamente congelados a - 80°C e, para rotina microscópica, os fragmentos da aorta torácica e femoral foram fixados em paraformaldeído 4% (m/v) em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 para posterior processamento.

3.5 Remodelamento da parede vascular

Os fragmentos das artérias aorta torácica e femoral fixados em paraformaldeído 4% foram incluídos em Paraplast[®] Plus (McCormickScientific) e seccionados com 5 µm de espessura. Após desparafinização e re-hidratação, os tecidos foram corados com tricrômico de Masson e as imagens foram capturadas utilizando o microscópio BX51 (Olympus, Tóquio, Japão) e câmera Infinity 1-5c (Lumenera, Ottawa, Canada).

3.6 Reatividade vascular

O leito vascular mesentérico foi rapidamente isolado, canulado pela artéria mesentérica superior e perfundido com solução de Krebs-Henseleit modificada (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgSO₄, 1,2 mM, NaHCO₃ 25 mM, EDTA

0,026 mM e glicose 6,0 mM) gaseificada com 95% O₂ e 5% CO₂ a 37 °C utilizando uma bomba peristáltica (MINIPULS® 3, Gilson, WI, EUA) a um fluxo constante de 4 mL/min. A pressão de perfusão foi continuamente medida por meio de um transdutor de pressão acoplado a um conversor analógico-digital (PowerLab 4/30, AD Instruments, Austrália) e posteriormente analisada utilizando o software LabChart 7 (AD Instruments, Austrália). Após um período de equilíbrio de 20 minutos, as alterações na pressão de perfusão aos vasoconstritores norepinefrina (0,01 - 1000 nmol), fenilefrina (0,01 - 1000 nmol), KCl (0,01 - 1000 nmol) e arginina vasopressina (0,001 - 10 nmol) foram registradas. As substâncias foram administradas *in bolus* diretamente no sistema de perfusão, próximo à cânula arterial. Uma nova dose somente era administrada após o retorno da pressão de perfusão ao valor basal.

Por questão de viabilidade do leito arterial mesentérico, dois diferentes subgrupos de animais foram utilizados (n = 8, cada). Em um subgrupo testou-se a reatividade à norepinefrina e à vasopressina e no outro subgrupo, à fenilefrina e ao KCl.

3.7 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± EPM. Caso as premissas para a realização de testes paramétricos sejam atingidas, os resultados foram comparados por teste t não pareado ou por uma ANOVA de duas entradas (tratamento x tempo), com medidas repetidas no último fator. Em caso de F significativo, foi realizado o teste post hoc de HolmSidak.

As curvas concentração-resposta derivadas das medidas de reatividade vascular foram comparadas por uma análise de regressão não linear, com ajuste de curva para log (agonista) vs resposta – inclinação variável. A análise de regressão não linear permitiu a identificação da resposta máxima (E_{max}) e a concentração do agonista que resultou em 50% da E_{max} (EC₅₀). A diferença desses parâmetros entre os grupos foi testada por um teste F.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPadPrism, versão 7.0 (GraphPad Inc., CA, EUA). O nível de significância foi estabelecido em 5%.

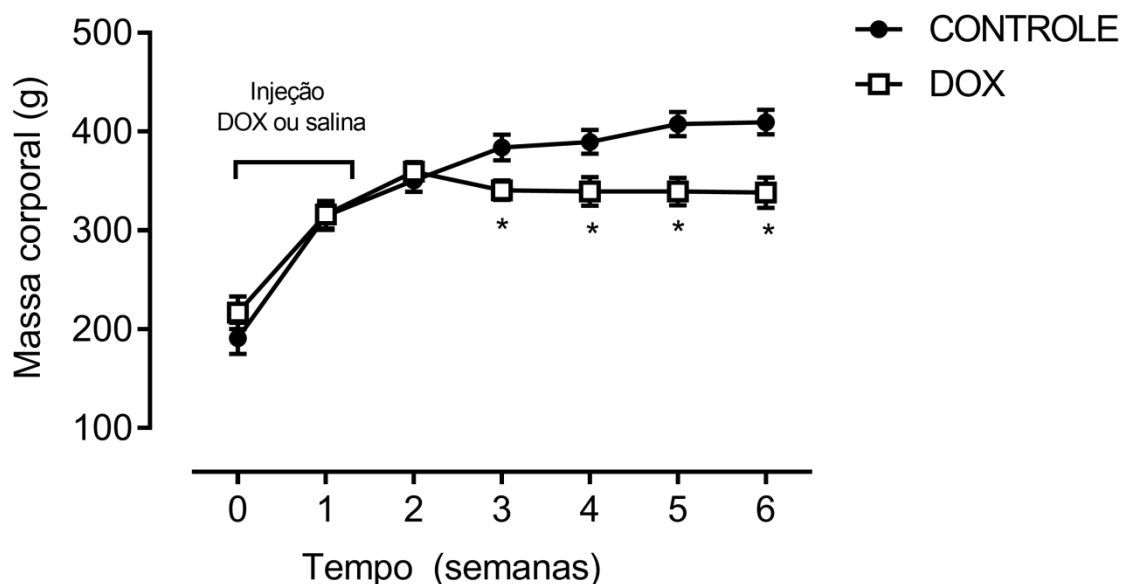
4 RESULTADOS

4.1 Observações gerais e dados antropométricos

No presente estudo, houve uma mortalidade de 25% no grupo DOX, ao passo que todos os animais do grupo controle sobreviveram.

Em relação à massa corporal, o grupo DOX mostrou declínio da mesma a partir de cerca de uma semana após a última administração de doxorubicina, não sendo reestabelecida até o momento da eutanásia. Além da perda de peso, os animais do grupo DOX tinham uma aparência não saudável, com o pelo opaco e eriçado, além de um exsudato vermelho ao redor dos olhos e nariz. Todos apresentaram distensão abdominal e, no momento da eutanásia, coletamos o líquido presente na cavidade abdominal (aproximadamente 105 mL de líquido).

Gráfico 1 - Massa corporal dos animais do grupo controle e DOX.



Legenda: *Diferente de controle ($P \leq 0,05$). DOX n=7; controle n=13.

A massa do coração e do VE isolado desses animais também foi mensurada e estão apresentadas em valores absolutos e relativas à massa corporal (Tabela 1).

Os resultados mostram que tanto a massa absoluta quanto a relativa de coração e ventrículo esquerdo foram menores no grupo em relação ao controle.

Tabela 1 - Massa do coração e do ventrículo esquerdo em valores absolutos e relativos à massa corporal dos animais DOX e controle

	Controle	DOX	<i>P</i>
Coração (g)	1,23 ± 0,04	0,90 ± 0,03*	< 0,0001
Coração/MC (mg/g)	3,0 ± 0,1	2,6 ± 0,1*	0,019
VE (g)	0,83 ± 0,03	0,59 ± 0,02*	<0,0001
VE/MC (mg/g)	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1*	0,015

Legenda: MC, massa corporal; VE, ventrículo esquerdo. *Diferente de controle. DOX n=10; controle n=9.

4.2 Pressão arterial

Quatro semanas após o término da administração de doxorubicina, os animais do grupo DOX apresentaram valores de pressão arterial sistólica, diastólica e média significativamente inferiores ao grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores pressóricos dos grupos experimentais medidos quatro semanas após o término da administração de doxorubicina

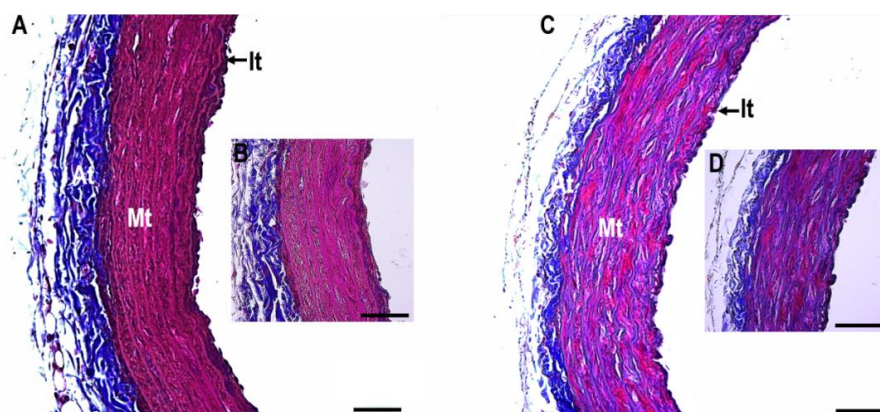
	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)	PAM (mm Hg)
Controle	135,9 ± 6,1	98,2 ± 5,4	110,1 ± 5,3
DOX	111,4 ± 8,6*	76,3 ± 6,6*	87,4 ± 7,2*
<i>P</i>	0,034	0,022	0,022

Legenda: PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; PAM, pressão arterial média. *Diferente de controle. DOX n=8; controle n=8.

4.3 Estrutura e remodelamento vascular

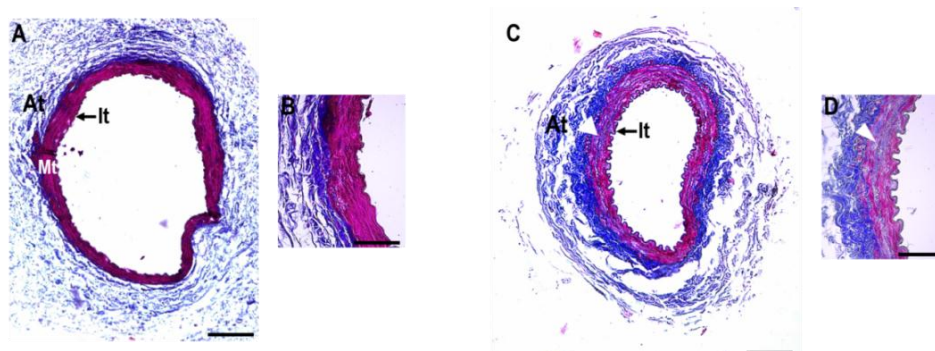
A coloração com tricrômico de Masson permite a visualização das fibras musculares lisas que ficam coradas em vermelho e também a visualização das fibras colágenas, que ficam coradas em azul. Os dados histológicos mostram que tanto a artéria aorta torácica (Figura 4) como a femoral (Figura 5) do grupo DOX apresentaram uma maior deposição de fibras colágenas na túnica média quando comparados com o grupo controle.

Figura 4 - Fotomicrografia representativa da artéria aorta torácica do grupo controle (A e B) e DOX (C e D) corada com tricrômico de Masson



Legenda: At, túnica adventícia; Mt, túnica média; It, túnica íntima. Barra de escala: 10 μ m (A e C) e 5 μ m (B e D)

Figura 5 - Fotomicrografia representativa da artéria femoral do grupo controle (A e B) e DOX (C e D) corada com tricrômico de Masson



Legenda: At, túnica adventícia; Mt, túnica média; It, túnica íntima. Barra de escala: 20 μ m (A e C) e 5 μ m (B e D).

Além disso, as micrografias sugerem que em comparação com o grupo controle, no grupo DOX, a artéria femoral (artéria muscular) apresenta a túnica média mais espessa com consequente redução no diâmetro da luz, o que não foi evidenciado na artéria aorta (artéria elástica) desses animais.

4.4 Reatividade vascular

Os animais do grupo controle apresentaram em média pressão de perfusão basal de 33,95 mmHg \pm 4,53 (n=12) e os do grupo controle 34,82 mmHg \pm 5,82 (n=14), não havendo diferença significativa quanto a esse parâmetro entre os grupos (p=0,9094). A Tabela 3 mostra os resultados de resposta máxima (E_{max}), concentração do agonista que levou a 50% da E_{max} (EC_{50}) em log e valores absolutos. Já o Gráfico 2 mostra as curvas de concentração-resposta para os vasoconstritores norepinefrina, vasopressina, KCl e fenilefrina, além de imagens representativas de um animal de cada grupo.

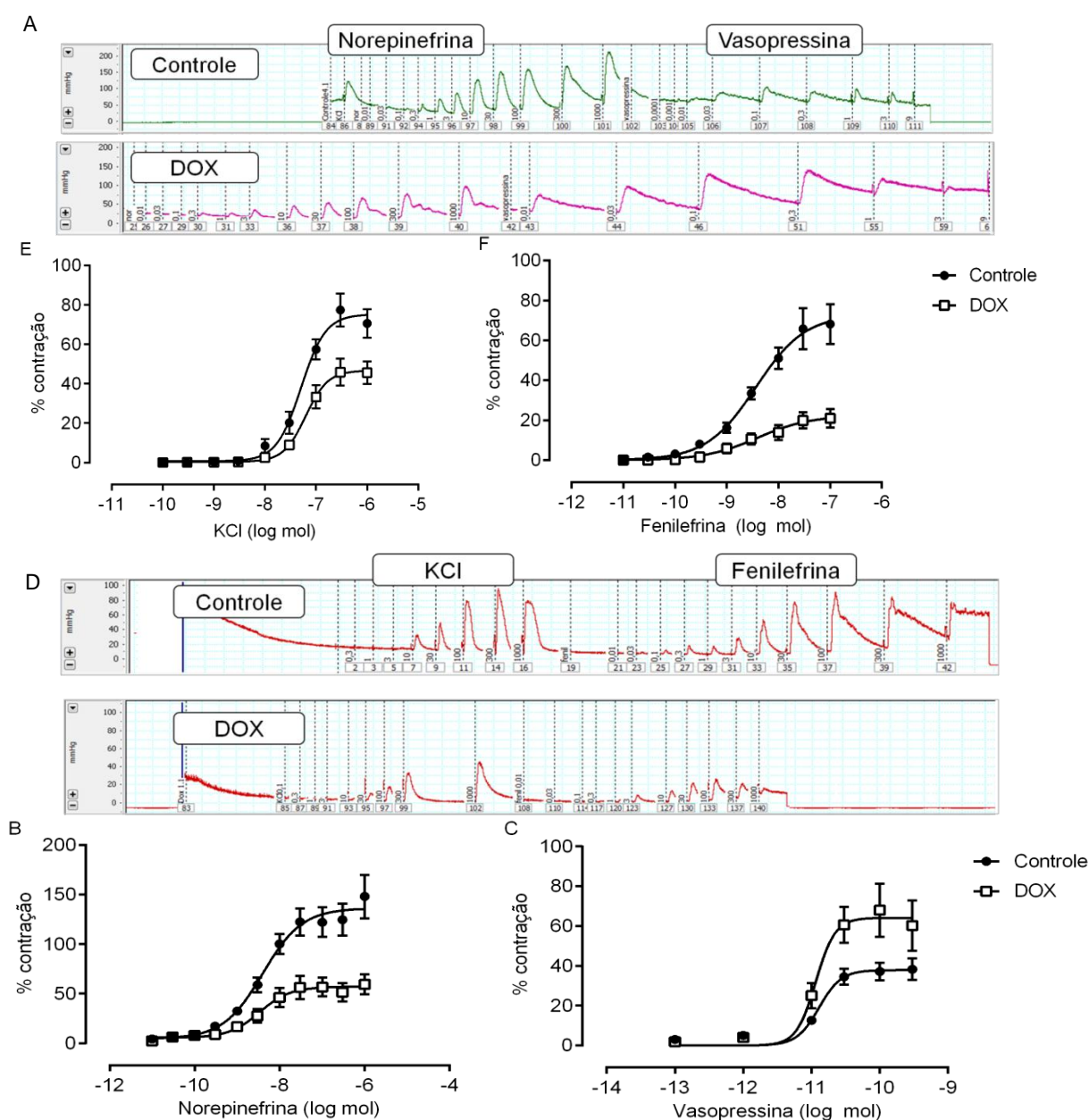
Tabela 3 - Resposta contrátil do leito arterial mesentérico

		Controle	DOX	P
Norepinefrina	E_{max} (%)	136,4 \pm 7,8	57,1 \pm 4,3*	0,020
	EC_{50} (Log mol)	-8,40 \pm 0,14	-8,47 \pm 0,18	0,773
	EC_{50} (mol)	4,0 $\times 10^{-9}$	3,4 $\times 10^{-9}$	
Fenilefrina	E_{max} (%)	72,5 \pm 7,3	22,9 \pm 4,9*	< 0,0001
	EC_{50} (Log mol)	-8,43 \pm 0,15	-8,41 \pm 0,31	0,969
	EC_{50} (mol)	3,7 $\times 10^{-9}$	3,9 $\times 10^{-9}$	
Vasopressina	E_{max} (%)	37,9 \pm 2,6	64,1 \pm 6,7*	0,021
	EC_{50} (Log mol)	-10,89 \pm 0,08	-10,94 \pm 0,11	0,814
	EC_{50} (mol)	1,3 $\times 10^{-11}$	1,2 $\times 10^{-11}$	
KCl	E_{max} (%)	75,2 \pm 3,5	46,7 \pm 3,0*	< 0,0001
	EC_{50} (Log mol)	-7,29 \pm 0,06	-7,20 \pm 0,08	0,367
	EC_{50} (mol)	5,1 $\times 10^{-8}$	6,3 $\times 10^{-8}$	

Legenda: E_{max} , efeito máximo; EC_{50} , concentração que resulta em 50% do efeito máximo. * Diferente de controle. Norepinefrina e vasopressina: DOX n=8; controle n=7. Fenilefrina e KCl: n=6.

O tratamento com doxorrubicina resultou em alteração na modulação das respostas contráteis, particularmente na resposta máxima. O leito arterial mesentérico de animais do grupo DOX se mostrou menos responsivo aos agonistas adrenérgicos norepinefrina e fenilefrina, assim como ao despolarizante KCl. Paradoxalmente, a resposta constritora à vasopressina foi exacerbada no grupo DOX em relação ao controle.

Gráfico 2 – Reatividade do leito arterial mesentérico à norepinefrina (B), vasopressina (C), ao KCl (E) e à fenilefrina (F). Nos gráficos (A) e (D) estão apresentados traçados típicos de um registro de reatividade vascular



5 DISCUSSÃO

A doxorubicina é uma das antraciclinas antitumorais mais utilizadas. Porém, suas doses são restritas devido à sua toxicidade (MURATA, T. et al., 2001b). No presente trabalho, objetivamos investigar as alterações crônicas na estrutura e função vascular induzidas pela doxorubicina em roedores.

Ainda existem poucos estudos sobre a disfunção vascular induzida pela doxorubicina. As alterações estruturais nas artérias femoral e aorta torácica do grupo doxorubicina observadas no presente trabalho podem contribuir para uma melhor compreensão dessa disfunção, as quais revelam fortes indícios de que houve remodelamento tecidual na túnica média em função dos efeitos provocados pelo tratamento. Esses resultados corroboram com o estudo de Murata e colaboradores que aponta alterações morfológicas em artérias mesentéricas isoladas de coelhos tratadas com alta concentração (1 mM) de doxorubicina por 7 dias. Esse estudo demonstrou ainda que houve apoptose dessas células musculares lisas a qual pode ser, pelo menos em parte, responsável pela diminuição de sua contratilidade (MURATA, T. et al., 2001b).

Histologicamente, a túnica média das artérias é constituída por matriz extracelular rica em fibras musculares lisas, colágeno e fibras elásticas (elastina). Esses componentes, em equilíbrio, são responsáveis pelas funções de contração e de relaxamento das artérias (TSAMIS, A. et al., 2013). A deposição excessiva de colágeno na túnica média, conforme observado no grupo DOX do presente trabalho, altera esse equilíbrio promovendo enrijecimento da artéria, o que de fato, modifica as suas funções de contração e de elasticidade. Apesar de o enrijecimento das artérias do grupo DOX sugerir um aumento da pressão arterial, em nosso estudo observamos uma redução da mesma. Essa diminuição da pressão arterial parece estar relacionada à disfunção cardíaca desenvolvida com o tratamento com doxorubicina (OCTAVIA, Y. et al., 2012).

Sabe-se que o coração é um órgão de suma importância para a homeostase do organismo. Esse órgão é responsável por bombear sangue para todo o sistema vascular e sua regulação ocorre de maneira bastante precisa de modo a garantir um débito cardíaco e pressão arterial adequados. A apoptose dos cardiomiócitos (NITOBE, J. et al., 2003) e diminuição do débito cardíaco (TSAI, C. S. et al., 1990)

em animais tratados com doxorrubicina pode acarretar na conseqüente diminuição da pressão arterial. As observações feitas sobre esse desfecho divergem na literatura. Alguns autores encontram uma diminuição (ROBISON, T. W. et al., 1985, KIRKHAM, A. A. et al., 2018), outros um aumento (CHEN, C.-T. et al., 2015, AHMAD, S. et al., 2017) e há ainda aqueles que não observam alteração na pressão arterial (MIZIA-STECC, K. et al., 2013b). Um dos fatores que podem contribuir para essa divergência de resultados é o modelo experimental variado. No caso de estudos em humanos, há ainda a combinação da doxorrubicina com outros medicamentos, o que acaba sendo um viés. Na insuficiência cardíaca, vários sistemas neuro-hormonais (sistema nervoso simpático, sistema renina-angiotensina-aldosterona, endotelina, citocinas e vasopressina) são ativados para manter a pressão arterial e a homeostase do organismo. No entanto, a hiperativação desses sistemas pode causar um aumento da pré-carga cardíaca através da retenção de água e sódio, vasoconstrição periférica, redução do fluxo sanguíneo renal e remodelamento cardíaco. Essa situação alimenta um ciclo vicioso que piora a insuficiência cardíaca (BROZENA, S. C. e JESSUP, M., 2003).

A vasopressina regula a reabsorção de água, a osmolaridade do fluido corporal, volume sanguíneo, pressão sanguínea, contração celular, proliferação celular e a secreção do hormônio adenocorticotrófico através da estimulação de receptores acoplados à proteína G (THIBONNIER, M. et al., 1998). Esse hormônio possui um importante papel no desenvolvimento, progressão e agravamento da insuficiência cardíaca, sendo ainda um componente de resposta neuro-hormonal à mesma. Os níveis circulantes desse hormônio são frequentemente elevados durante a progressão da insuficiência cardíaca em resposta a vários estímulos não osmóticos, incluindo baixa pressão arterial e volume arterial diminuído (GOLDSMITH, S. R., 2002). Num estudo feito em uma população com disfunção ventricular esquerda, pacientes assintomáticos apresentaram níveis mais elevados de vasopressina do que pacientes controle, enquanto pacientes com insuficiência cardíaca leve a moderada sintomática apresentaram níveis ainda mais elevados de vasopressina (FRANCIS, G. S. et al., 1990).

A liberação sustentada de vasopressina pode agravar a insuficiência cardíaca pela vasoconstrição mediada por receptor V1 e pela retenção de água mediada por receptor V2. Além disso, a ativação dos subtipos de receptor do tipo V1 no miocárdio pode levar à hipertrofia; à estimulação dos subtipos de V3R, podendo resultar na

secreção de aldosterona mediada por hormônios adrenocorticotrópicos e subsequente reabsorção de sódio (ROULEAU, J.-L. et al., 1994).

O presente trabalho é o primeiro a mostrar a hiperreatividade à vasopressina em modelo animal de insuficiência cardíaca induzida por doxorubicina. Estudos utilizando outros modelos crônicos e agudos de insuficiência cardíaca apontam que bloqueio seletivo dos receptores V1 e/ou V2 é benéfico, mostrando que, a pesar de ser uma importante ferramenta para melhora da homeostase do organismo, os efeitos exacerbados da vasopressina são deletérios para o coração, e conseqüentemente, para o sistema cardiovascular como um todo (NAITOH, M. et al., 1994, CLAIR, M. J. et al., 2000). Assim, faz-se interessante que em trabalhos futuros, sejam feitos mais estudos a fim de observar se os efeitos citados se aplicam ao modelo de insuficiência cardíaca induzida por doxorubicina; e até mesmo avaliar se uma possível intervenção neste contexto poderia melhorar o prognóstico dos pacientes com câncer.

A pesar da hiperresponsividade à vasopressina observada no grupo DOX, o mesmo apresentou redução da reatividade a os outros vasoconstritores testados. A hiporresponsividade ao KCl observada no leito arterial mesentérico dos ratos deste estudo corrobora com o trabalho de Murata et al. (2001a) o qual avaliou a contração induzida por esse vasoconstritor em artérias isoladas de coelhos tratados com doxorubicina, numa dose de 0,3 mM por 7 dias. Tal efeito parece estar relacionado à já mencionada inativação de canais de cálcio do retículo sarcoplasmático (ONDRIAS, K. et al., 1990).

Outro vasoconstritor que teve sua responsividade diminuída foi a norepinefrina. Murata (2001a) e Dalske e Hardy (1988) observaram o mesmo efeito. Este último examinou a contratilidade do músculo liso aórtico isolado de rato e observou que o tratamento com baixas doses de doxorubicina atenuava as contrações induzidas por norepinefrina, sem sinais de toxicidade no músculo cardíaco. É sabido que os radicais livres alteram a estrutura das proteínas, o que resulta na alteração de suas características funcionais. A hiporreatividade às catecolaminas na insuficiência cardíaca induzida por doxorubicina parece estar associada à produção de radicais livres pela droga, que ocorre quando a mesma é oxidada e reduzida na cadeia de transporte de elétrons. Alguns estudos sugerem que a regulação simpática da contração vascular é prejudicada mesmo por baixas doses de doxorubicina através da redução da expressão do adrenoceptor α_{1A} . O

tratamento com a enzima antioxidante superóxido desmutase (SOD) restaura a expressão desse adrenergico receptor assim como a responsividade à norepinefrina, demonstrando o importante papel das espécies reativas de oxigênio nessa condição (MURATA, T. et al., 2001a).

Os animais do grupo DOX apresentaram ainda hiporresponsividade a fenilefrina. Ahmadias ET al também encontraram alteração da resposta a esse agonista seletivo de receptores α_1 , encontrando supressão da força máxima e a uma dessensibilização de vasos isolados de coelhos tratados com doxorubicina (AHMADIASL, N. et al., 2002). A falta de sensibilidade à fenilefrina pode ser devida, pelo menos em parte, à já citada regulação negativa dos receptores α_1 causada pelo tratamento com doxorubicina, a qual, por sua vez, pode resultar em produção de espécies reativas de oxigênio (MURATA, T. et al., 2001b).

A vasopressina, assim como a fenilefrina e a noradrenalina desencadeia uma série de eventos intracelulares que levam à contração do músculo liso vascular tanto de maneira dependente quanto de maneira independente de cálcio (BAUER & PAREKH, 2003; CAVARAPE *et al.*, 2003). Porém, é importante ressaltar que a contração promovida pela vasopressina é mais dependente da entrada do cálcio pelos canais de membrana, enquanto a indução pela noradrenalina depende mais do cálcio liberado do retículo endoplasmático (CAUVIN *et al.*, 1988). Um estudo demonstrou que o composto Y-27632 (inibidor da enzima Rho-quinase) foi capaz de abolir a hiperreatividade a vasopressina em um modelo de sépsis. A avaliação *in vitro* da atividade do receptor V1a e das vias intracelulares que regulam o mecanismo contrátil induzido pela vasopressina revelaram a participação dos canais de cálcio de membrana e o aumento da atividade de proteínas da via Rho-A/ROCK no aumento da reatividade a esse vasoconstritor (GUARIDO, K. L., 2016).

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que o tratamento com doxorubicina induz a remodelamento do músculo liso vascular, o qual pode modificar as funções de contração e de elasticidade do músculo liso vascular. Reforçando essas alterações estruturais, os animais tratados com esse fármaco apresentam diminuição da pressão arterial e redução na capacidade de resposta a alguns agentes vasoconstritores, como a norepinefrina, vasopressina e KCl. Interessantemente, nessa condição, ocorre um aumento da resposta à vasopressina. Tais alterações podem comprometer a homeostase do sistema cardiovascular contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes submetidos à quimioterapia. Mais estudos são necessários para entender a o mecanismo da hiperresponsividade à vasopressina nessa condição.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S., PANDA, B. P., KOHLI, K., FAHIM, M. and DUBEY, K. Folic acid ameliorates celecoxib cardiotoxicity in a doxorubicin heart failure rat model. *Pharmaceutical biology*, n. 55, p. 1295-1303, 2017.
- AHMADIASL, N., ROSTAMI, A., MOHAMMADI, N. M. and RAJABI, F. Effects of noradrenaline and KCl on peripheral vessels in doxorubicin induced model of heart failure. *Pathophysiology*, n.8, p. 259-262, 2002.
- AL-ABBASI, F. A., ALGHAMDI, E. A., BAGHDADI, M. A., ALAMOUDI, A. J., EL-HALAWANY, A. M., EL-BASSOSSY, H. M., ASEERI, A. H. and AL-ABD, A. M. Gingerol Synergizes the Cytotoxic Effects of Doxorubicin against Liver Cancer Cells and Protects from Its Vascular Toxicity. *Molecules*, n. 21, 2016.
- ARCAMONE, F., CASSINELLI, G., FANTINI, G., GREIN, A., OREZZI, P., POL, C. and SPALLA, C. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*, n. 11, p. 1101-1110, 1969.
- BROZENA, S. C. and JESSUP, M. The new staging system for heart failure. What every primary care physician should know. *Geriatrics (Basel, Switzerland)*, n. 58, p. 31-36; quiz 38, 2003.
- BROZOVICH, F. V., NICHOLSON, C. J., DEGEN, C. V., GAO, Y. Z., AGGARWAL, M. and MORGAN, K. G. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders. *Pharmacological Reviews*, n.68, p. 476-532, 2016.
- BRUNTON, L. L., CHABNER, B. A. and KNOLLMANN, B. C. *As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman: 12.* BRUNTON, L. L., CHABNER, B. A. and KNOLLMANN, B. C.:
- CARDINALE, D., COLOMBO, A., BACCHIANI, G., TEDESCHI, I., MERONI, C. A., VEGLIA, F., CIVELLI, M., LAMANTIA, G., COLOMBO, N., CURIGLIANO, G., FIORENTINI, C. and CIPOLLA, C. M. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation*, n.131, p. 1981-1988, 2015.
- CHATTERJEE, K., ZHANG, J., HONBO, N. and KARLINER, J. S. Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology*, n.115, p. 155-162, 2010.
- CHEN, C.-T., WANG, Z.-H., HSU, C.-C., LIN, H.-H. and CHEN, J.-H. In vivo protective effects of diosgenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nutrients*, n.7, p. 4938-4954, 2015.
- CHILDS, A. C., PHANEUF, S. L., DIRKS, A. J., PHILLIPS, T. and LEEUWENBURGH, C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Research*, n.62, p. 4592-4598, 2002.

CLAIR, M. J., KING, M. K., GOLDBERG, A. T., HENDRICK, J. W., NISATO, R., GAY, D. M., MORRISON, A. E., MCELMURRAY, J. H., KROMBACH, R. S. and BOND, B. R. Selective vasopressin, angiotensin II, or dual receptor blockade with developing congestive heart failure. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, n.293, p. 852-860, 2000.

COLE, M. P., CHAISWING, L., OBERLEY, T. D., EDELMANN, S. E., PIASCIK, M. T., LIN, S.-M., KININGHAM, K. K. and ST. CLAIR, D. K. The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity. *Cardiovascular research*, n.69, p. 186-197, 2006.

DALSKE, H. F. and HARDY, K. Effect of low-dose doxorubicin on calcium content and norepinephrine response in rat aorta. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, n.24, p. 979-983, 1988.

DAOSUKHO, C., ITTARAT, W., LIN, S.-M., SAWYER, D. B., KININGHAM, K., LIEN, Y.-C. and CLAIR, D. K. S. Induction of manganese superoxide dismutase (MnSOD) mediates cardioprotective effect of tamoxifen (TAM). *Journal of molecular and cellular cardiology*, n.39, p. 792-803, 2005.

DAVIES, K. J. and DOROSHOW, J. H. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. I. Anthracycline radical formation by NADH dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, n.261, p. 3060-3067, 1986.

DI MARCO, A., CASSINELLI, G. and ARCAMONE, F. The discovery of daunorubicin. *Cancer Treatment Reports*, n.65 Suppl 4, p. 3-8, 1981.

DOROSHOW, J. H. and DAVIES, K. J. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry*, n.261, p. 3068-3074, 1986.

DRAFTS, B. C., TWOMLEY, K. M., D'AGOSTINO, R., JR., LAWRENCE, J., AVIS, N., ELLIS, L. R., THOHAN, V., JORDAN, J., MELIN, S. A., TORTI, F. M., LITTLE, W. C., HAMILTON, C. A. and HUNDLEY, W. G. Low to moderate dose anthracycline-based chemotherapy is associated with early noninvasive imaging evidence of subclinical cardiovascular disease. *Cardiovascular Imaging*, n.6, p.877-885, 2013.

DUQUAINE, D., HIRSCH, G. A., CHAKRABARTI, A., HAN, Z., KEHRER, C., BROOK, R., JOSEPH, J., SCHOTT, A., KALYANARAMAN, B., VASQUEZ-VIVAR, J. and RAJAGOPALAN, S. Rapid-onset endothelial dysfunction with adriamycin: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Vascular Medicine*, n.8, p. 101-107, 2003.

EWER, M. S. and EWER, S. M. Cardiotoxicity of anticancer treatments: what the cardiologist needs to know. *Nat Rev Cardiol*, n.7, p. 564-575, 2010.

FELKER, G. M., THOMPSON, R. E., HARE, J. M., HRUBAN, R. H., CLEMETSON, D. E., HOWARD, D. L., BAUGHMAN, K. L. and KASPER, E. K. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *The New England Journal of Medicine*, n.342, p.1077-1084, 2000.

FRANCIS, G. S., BENEDICT, C., JOHNSTONE, D. E., KIRLIN, P. C., NICKLAS, J., LIANG, C.-S., KUBO, S. H., RUDIN-TORETSKY, E. and YUSUF, S. Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation*, n.82, p.1724-1729, 1990.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, n.57, p.727-741, 1999.

GOLDSMITH, S. R. Congestive heart failure: potential role of arginine vasopressin antagonists in the therapy of heart failure. *Congestive Heart Failure*, n.8, p.251-256, 2002.

GRETHE, S., COLTELLA, N., DI RENZO, M. F. and PÖRN-ARES, M. I. p38 MAPK downregulates phosphorylation of Bad in doxorubicin-induced endothelial apoptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, n.347, p.781-790, 2006.

GUARIDO, K. L. Vasopressina no choque séptico: hiper-reatividade vascular renal associada ao aumento da atividade da via de sensibilização ao cálcio Rho-A/Rho-quinase. 2016.

HAYWARD, R. and HYDOCK, D. S. Doxorubicin cardiotoxicity in the rat: an in vivo characterization. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, n.46, p. 20-32, 2007.

HOLMES, C. L., PATEL, B. M., RUSSELL, J. A. and WALLEY, K. R. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest*, 120, 989-1002, 2001.
JUNQUEIRA, L. and CARNEIRO, J. Células do sangue. *LC JUNQUEIRA and J. CARNEIRO. Histologia básica. 10th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 224-237, 2004.*

JUNQUEIRA, L. C. and CARNEIRO, J. *Histologia básica: 10. JUNQUEIRA, L. C. and CARNEIRO, J.:*

KANMURA, Y., RAEYMAEKERS, L. and CASTEELS, R. Effects of doxorubicin and ruthenium red on intracellular Ca²⁺ stores in skinned rabbit mesenteric smooth-muscle fibres. *Cell Calcium*, n.10, p.433-439, 1989.

KATZ, S. D., HRYNIEWICZ, K., HRILJAC, I., BALIDEMAJ, K., DIMAYUGA, C., HUDAIHED, A. and YASSKIY, A. Vascular endothelial dysfunction and mortality risk in patients with chronic heart failure. *Circulation*, n.111, p.310-314, 2005.

KIRKHAM, A. A., EVES, N. D., SHAVE, R. E., BLAND, K. A., BOVARD, J., GELMON, K. A., VIRANI, S. A., MCKENZIE, D. C., STÖHR, E. J. and WABURTON, D. E. The effect of an aerobic exercise bout 24 h prior to each doxorubicin treatment for breast cancer on markers of cardiotoxicity and treatment symptoms: a RCT. *Breast cancer research and treatment*, n.167, p.719-729, 2018.

LENNEMAN, A. J., WANG, L., WIGGER, M., FRANGOUL, H., HARRELL, F. E., SILVERSTEIN, C., SAWYER, D. B. and LENNEMAN, C. G. Heart transplant survival outcomes for adriamycin-dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 111, 609-612, 2013.
MEYER-LINDENBERG, A., DOMES, G., KIRSCH, P. and HEINRICH, M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nature Reviews Neuroscience*, n.12, p.524-538, 2011.

MINOTTI, G., RECALCATI, S., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CORNA, G. and CAIRO, G. Doxorubicin cardiotoxicity and the control of iron metabolism: quinone-dependent and independent mechanisms. *Methods in Enzymology*, n.378, p.340-361, 2004.

MIZIA-STEĆ, K., GOSCIŃSKA, A., MIZIA, M., HABERKA, M., CHMIEL, A., POBORSKI, W. and GĄSIOR, Z. Anthracycline chemotherapy impairs the structure and diastolic function of the left ventricle and induces negative arterial remodelling. *Kardiologia Polska*, n.71, p.681-690, 2013a.

MIZIA-STEĆ, K., GOŚCIŃSKA, A., MIZIA, M., HABERKA, M., CHMIEL, A., POBORSKI, W. and GĄSIOR, Z. Anthracycline chemotherapy impairs the structure and diastolic function of the left ventricle and induces negative arterial remodelling. *Kardiologia Polska*, n.71, p.681-690, 2013b.

MURATA, T., YAMAWAKI, H., HORI, M., SATO, K., OZAKI, H. and KARAKI, H. Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery. *The British Journal of Pharmacology*, n.132, p.1365-1373, 2001a.

MURATA, T., YAMAWAKI, H., HORI, M., SATO, K., OZAKI, H. and KARAKI, H. Chronic vascular toxicity of doxorubicin in an organ-cultured artery. *British journal of pharmacology*, n.132, p.1365-1373, 2001b.

MURATA, T., YAMAWAKI, H., YOSHIMOTO, R., HORI, M., SATO, K., OZAKI, H. and KARAKI, H. Chronic effect of doxorubicin on vascular endothelium assessed by organ culture study. *Life Sciences*, n.69, p.2685-2695, 2001c.

NAITOH, M., SUZUKI, H., MURAKAMI, M., MATSUMOTO, A., ARAKAWA, K., ICHIHARA, A., NAKAMOTO, H., OKA, K., YAMAMURA, Y. and SARUTA, T. Effects of oral AVP receptor antagonists OPC-21268 and OPC-31260 on congestive heart failure in conscious dogs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, n.267, H2245-H2254, 1994.

NITISS, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, n.9, p.338-350, 2009.

NITOBÉ, J., YAMAGUCHI, S., OKUYAMA, M., NOZAKI, N., SATA, M., MIYAMOTO, T., TAKEISHI, Y., KUBOTA, I. and TOMOIKE, H. Reactive oxygen species regulate FLICE inhibitory protein (FLIP) and susceptibility to Fas-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Cardiovascular research*, n.57, p.119-128, 2003.

OCTAVIA, Y., TOCCHETTI, C. G., GABRIELSON, K. L., JANSSENS, S., CRIJNS, H. J. and MOENS, A. L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular

mechanisms to therapeutic strategies. *Journal of molecular and cellular cardiology*, n.52, p.1213-1225, 2012.

ONDRIAS, K., BORGATTA, L., KIM, D. H. and EHRLICH, B. E. Biphasic effects of doxorubicin on the calcium release channel from sarcoplasmic reticulum of cardiac muscle. *Circulation Research*, n.67, p.1167-1174, 1990.

ROBISON, T. W., GIRI, S. N., SCHIEDT, M., PARKER, H. R., ISHIZAKI, G. and CURRY, D. L. Effects of intravenous infusion of doxorubicin on blood chemistry, blood pressure and heart rate in rabbits. *Journal of Applied Toxicology*, n.5, p.382-387, 1985.

ROULEAU, J.-L., PACKER, M., MOYE, L., DE CHAMPLAIN, J., BICHET, D., KLEIN, M., ROULEAU, J. R., SUSSEX, B., ARNOLD, J. M. and SESTIER, F. Prognostic value of neurohumoral activation in patients with an acute myocardial infarction: effect of captopril. *Journal of the American College of Cardiology*, n.24, p.583-591, 1994.

SAEKI, K., OBI, I., OGIKU, N., SHIGEKAWA, M., IMAGAWA, T. and MATSUMOTO, T. Doxorubicin directly binds to the cardiac-type ryanodine receptor. *Life Sci*, n.70, p.2377-2389, 2002.

SBC. I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, n.96, p.1-52, 2011.

SHECHTER, M., MATETZKY, S., ARAD, M., FEINBERG, M. S. and FREIMARK, D. Vascular endothelial function predicts mortality risk in patients with advanced ischaemic chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure*, n.11, p.588-593, 2009.

SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. and JEMAL, A. Cancer Statistics, 2017. *CA A Cancer Journal for Clinicians*, n.67, p. 7-30, 2017.

SIMUNEK, T., STERBA, M., POPELOVA, O., ADAMCOVA, M., HRDINA, R. and GERSL, V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, n.61, p.154-171, 2009.

SOULTATI, A., MOUNTZIOS, G., AVGERINO, C., PAPAXOINIS, G., PECTASIDES, D., DIMOPOULOS, M.-A. and PAPADIMITRIOU, C. Endothelial vascular toxicity from chemotherapeutic agents: preclinical evidence and clinical implications. *Cancer treatment reviews*, n.38, p.473-483, 2012.

SWAIN, S. M., WHALEY, F. S. and EWER, M. S. Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials. *Cancer*, n.97, p.2869-2879, 2003.

THIBONNIER, M., CONARTY, D. M., PRESTON, J. A., WILKINS, P. L., BERTI-MATTERA, L. N., MATTERA, R. *Molecular pharmacology of human vasopressin receptors*. 1998.

TOKARSKA-SCHLATTNER, M., DOLDER, M., GERBER, I., SPEER, O., WALLIMANN, T. and SCHLATTNER, U. Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: particular sensitivity of the heart. *Biochimica et Biophysica Acta*, n.1767, p.1276-1284, 2007.

TSAI, C. S., WASHINGTON, C. and OCHILLO, R. F. Cardiovascular effects of doxorubicin. *General Pharmacology: The Vascular System*, 21, 729-733, 1990.
TSAMIS, A., KRAWIEC, J. T. and VORP, D. A. Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review. *Journal of the Royal Society Interface*, n.10, p.20121004, 2013.

VEJPONGSA, P. and YEH, E. T. Topoisomerase 2beta: a promising molecular target for primary prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, n.95, p.45-52, 2014.

VOLKOVA, M. and RUSSELL, R. Anthracycline cardiotoxicity: prevalence, pathogenesis and treatment. *Current cardiology reviews*, n.7, p.214-220, 2011.

WANG, G. W., KLEIN, J. B. and KANG, Y. J. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, n.298, p.461-468, 2001.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education*, n.27, p.201-206, 2003.

WIDMAIER, E. P., RAFF, H. and STRANG, K. T. *Vander's Human Physiology. The mechanisms of body function: 11.* WIDMAIER, E. P., RAFF, H. and STRANG, K. T.:
WU, S., KO, Y. S., TENG, M. S., KO, Y. L., HSU, L. A., HSUEH, C., CHOU, Y. Y., LIEW, C. C. and LEE, Y. S. Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, n.34, p.1595-1607, 2002.

ZAMORANO, J. L., LANCELLOTTI, P., RODRIGUEZ MUNOZ, D., ABOYANS, V., ASTEGGIANO, R., GALDERISI, M., HABIB, G., LENIHAN, D. J., LIP, G. Y., LYON, A. R., LOPEZ FERNANDEZ, T., MOHTY, D., PIEPOLI, M. F., TAMARGO, J., TORBICKI, A. and SUTER, T. M. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines: The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*, n.37, p.2768-2801, 2016.