



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

Vera Maria Araujo de Campos

**Efeito da radiação ionizante e quimioterápicos em tecido cardíaco e
expressão do peptídeo natriurético do tipo B**

Rio de Janeiro

2013

Vera Maria Araujo de Campos

**Efeito da radiação ionizante e quimioterápicos em tecido cardíaco e expressão do
peptídeo natriurético tipo B**



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

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida

Rio de Janeiro

2013

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

C128 Campos, Vera Maria Araujo de.
Efeito da radiação ionizante e quimioterápicos em tecido cardíaco e expressão do peptídeo natriurético tipo B / Vera Maria Araujo de Campos. – 2013.
62 f. : il.

Orientador: Carlos Eduardo Veloso de Almeida.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-Graduação em Biociências.

1. Cardiotoxinas - Efeitos adversos. 2. Câncer - Quimioterapia - Complicações e seqüelas - Teses. 3. Agentes antineoplásicos - Teses. 4. Marcadores biológicos de tumor - Teses. 5. Miocárdio - Doenças - Teses. 6. Radiação ionizante. I. Almeida, Carlos Eduardo Veloso de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.771.7-035.1:612.17

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

Assinatura

Data

Vera Maria Araujo de Campos

Efeito da radiação ionizante e quimioterápicos em tecido cardíaco e expressão do peptídeo natriurético tipo B.

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

Aprovada em 04 de março de 2013.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Veloso de Almeida
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Adenilson de Souza Fonseca
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr^a. Cláudia Vitória de Moura Gallo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr^a. Samara Cristina Ferreira Machado
Universidade Federal Fluminense - UFF

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos os elementos que foram essenciais a sua construção e elaboração.

A toda equipe do Laboratório de Ciências Radiológicas (LCR), por ter sido minha segunda casa, por ter disponibilizado todos os recursos que preciseis para a constituição desta dissertação, por terem acreditado em mim e me auxiliado em todos os sentidos. A colaboração de outros laboratórios comigo, mas entre todos eles, principalmente ao Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular, Laboratório de Farmacologia e Neurodesenvolvimento, Laboratório de Microscopia e Ultraestrutura Celular e ao Laboratório de Farmacologia Cardiovascular. Também gostaria de dedicar esse trabalho a Pós-Graduação em Biociências e Fisclinx, além das agências de fomento FAPERJ e CNPq, pois disponibilizaram condições para que desenvolvesse meu trabalho, tanto em questões de sustentabilidade quanto no desenvolvimento do meu aprendizado.

Claro que não posso deixar de citar meus amigos, familiares e a Deus, por ter me guiado, mesmo que algumas vezes por caminhos tortuosos, mas que me geraram grande aprendizado, e a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus colegas, amigos, familiares e marido. Não gostaria de citar nomes, pois sei que posso esquecer-me de alguém, e não me perdoaria, pois todos tiveram participação, em algum momento e de alguma forma, para ter chegado até aqui.

Obrigada colegas! Pelas risadas, palavras de conforto, e por compartilharem comigo o conhecimento de vocês. Obrigada amigos! Por tentarem me entender, mesmo isso sendo mega difícil até mesmo para mim, por tentarem me ensinar a viver um dia de cada vez (ainda chego lá!), por não me julgarem e me aceitarem como sou, mas, principalmente, por me amarem o suficiente para me dizerem o que pensam e serem sinceros comigo. Obrigada família! Por fazer da minha casa o refúgio perfeito de todas as dificuldades e problemas que possa ter enfrentado nesses dois anos. Por todo o amor incondicional, pelo investimento no meu crescimento e suporte em todos os momentos. Obrigada Léo! Por todo o apoio, compreensão e ajuda nos momentos de insegurança, conflito e instabilidade. Você me ajudou a acreditar na minha capacidade, me estimulou a continuar me dedicando, mesmo quando as adversidades apareciam, e me encorajou a vencer minhas limitações. Além de estar sempre ao meu lado, tanto para vibrar comigo pelas minhas, ou melhor, nossas conquistas; por ser sincero e fiel; além de, inúmeras vezes, ter me segurado, evitando que caísse e me machuca-se, nos enalços que tive no meio do percurso. Te amo!

Bom, há mais uma pessoa que gostaria de agradecer particularmente. Obrigada Prof. Carlos Eduardo de Almeida, por ter enxergado em mim potencial para conquistar esse título e por ter aceitado me orientar. Nada disso teria sido possível se não fosse pela sua disposição em me aceitar como sua orientanda.

Obrigada Universo! Pelo cenário e componente que fazem da minha tão fantástica! Obrigada Deus! por ter me abençoado com saúde, estabilidade e pelo conjunto de fatores que possibilitaram que chegasse até aqui..

Uma vez que você percebe que cria toda uma simbologia para se comunicar com a própria espécie, então descobre que os símbolos realmente não são bons ou maus, certos ou errados. Você os torna certos ou errados de acordo com suas crenças. Esse é o poder da convicção, mas a verdade está além das convicções. Quando você vai além dos símbolos, o que encontra é um mundo de perfeição onde tudo e todos na criação são perfeitos. Até o investimento da sua crença em cada palavra é perfeito. Até sua raiva, seu drama e suas mentiras são perfeitas. Até o inferno em que você às vezes vive é perfeito, porque só existe perfeição. Imagine só se você estivesse vivido o tempo todo sem ter aprendido todas as mentiras que integram o seu conhecimento, sem sofrer com o investimento de sua fé nessas mentiras, superstições e opiniões. Você seguiria a vida como o resto dos animais, ou seja, manteria a inocência por toda a sua vida.

No processo de domesticação você perde sua inocência, mas, ao perder a inocência, você começa a procurar o que perdeu, e isso te leva ao despertar da consciência. Uma vez que a recupera, você passa a ser totalmente responsável por sua própria evolução – e por cada escolha que faz na vida.

Quando você é educado pelo sonho do planeta, não tem escolha: aprende várias mentiras. Mas talvez seja tempo de desaprendê-las e reaprender como ir atrás da verdade, seguindo o próprio coração.

(Don Miguel Ruiz – O Quinto Compromisso)

RESUMO

CAMPOS, Vera Maria Araujo de. *Efeito da radiação ionizante e quimioterápicos em tecido cardíaco e expressão do peptídeo natriurético do tipo B*. 2013. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

A utilização de biomarcadores cardioespecíficos vem sendo recomendado como ferramenta útil na monitoração e identificação precoce de lesão cardíaca, em decorrência do potencial de cardiotoxicidade da terapêutica oncológica. O objetivo do presente estudo foi avaliar o nível plasmático do peptídeo natriurético do tipo B (BNP) e da expressão gênica do BNP e outros genes relacionados a sua síntese, a interleucina-6 (IL-6), fator β 1 de transformação de crescimento (TGF- β 1) e procolágeno tipo I, mediante a associação dos agentes antineoplásicos docetaxel e ciclofosfamida (TC) e da radiação ionizante (IR) no coração de ratas *Wistar*, 2 meses após o término do tratamento. Para isso, Ratas *Wistar* (3-4 meses, n=7) foram irradiadas no coração com dose única de 20Gy, em um campo ântero-posterior de 2x2cm², em acelerador linear com feixe de energia nominal de 6 MeV; outras (n=7) foram tratadas (4 ciclos, com 7 dias de intervalo) com docetaxel (12,5 mg/Kg) e ciclofosfamida (50 mg/Kg) e irradiadas após 7 dias do tratamento quimioterápico. Como controle (n=7), animais não irradiados e não tratados com quimioterápicos. Após 2 meses do fim do tratamento, a eutanásia dos animais foi realizada. Amostras de plasma e tecido cardíaco, ventrículo esquerdo (VE), foram coletadas. Por ensaio ELISA foi quantificada a concentração plasmática de BNP; parte do tecido cardíaco foi fixado, incluído em parafina e cortado em micrótomo, para assinalar a presença de BNP no VE, avaliação qualitativa, pela técnica de imunohistoquímica (IHQ); e a outra parte para a técnica RT-qPCR, onde foram avaliados a expressão relativa de mRNA dos genes do BNP, IL-6, TGF- β 1 e procolágeno tipo I. Na IHQ o grupo controle apresentou uma marcação pontual, enquanto que os grupos tratados apresentaram uma marcação mais difusa, sendo que o grupo TC+IR foi o que apresentou maior dispersão na marcação do BNP no tecido cardíaco. Embora não tenha sido observado no ensaio ELISA uma diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de BNP dos grupos tratados em relação ao controle, nota-se uma tendência de aumento no grupo TC+IR. Na análise por RT-qPCR, a expressão relativa de BNP foi similar ao apresentado no ELISA. O grupo TC+IR foi o grupo que apresentou maior expressão gênica de BNP, porém a diferença não é significativa em relação ao controle. A única análise em que se obteve diferença na expressão gênica em relação ao controle foi a do gene IL-6 que apresentou expressão reduzida. Todos os demais genes analisados por RT-qPCR apresentaram uma expressão similar ao controle. Assim, os resultados obtidos sugerem que o BNP não se apresentou como um bom biomarcador cardioespecífico para identificação precoce de lesão cardíaca, no período a qual foi avaliado. As ratas *Wistar*, 2 meses após a submissão do tratamento, não apresentaram um resultado diferenciado em relação ao controle, nos genes TGF- β 1 e procolágeno tipo I, sugerindo ausência de um quadro de remodelamento cardíaco. Entretanto, apresentou redução significativa do gene IL-6, no grupo TC+IR, propondo ação anti-inflamatória do BNP, que no mesmo grupo, apresentou uma tendência de aumento em sua expressão gênica.

Palavras-chave: Biomarcador. BNP. Tratamento contra o Câncer. Cardiotoxicidade. ELISA. RT-qPCR. IHQ.

ABSTRACT

The use of specific cardiac biomarkers has been recommended as a useful tool in the early identification and monitoring of cardiac injury, due to the potential cardiotoxicity of oncological therapy. The aim of this study is to investigate, analyze and evaluate the reaction of B-type natriuretic peptide (BNP), interleukin-6 (IL-6), transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and procollagen type I in its expression and release by the association of antineoplastic agents Docetaxel and Cyclophosphamide (TC) and ionizing radiation (IR) in the heart of Wistar rats, 2 months after the end of treatment. For this, Wistar rats (3-4 months, n = 7) were irradiated in the heart with a single dose of 20 Gy, in a anteroposterior field of 2x2cm² in linear accelerator with nominal energy beam of 6 MeV, other (n = 7) were treated (four cycles with a 7-day interval) with docetaxel (12.5 mg / kg) and Cyclophosphamide (50 mg / kg) and irradiated after 7 days of chemotherapy. As a control (n = 7), non-irradiated animals not treated with chemotherapy. 2 months after the end of treatment, euthanasia was performed. Samples of plasma and heart tissue, left ventricular (LV) were collected. The plasma concentration of BNP was quantified by ELISA, part of the heart tissue was fixed, embedded in paraffin and cut in microtome, to signal the presence of BNP in the LV, qualitative evaluation by immunohistochemistry (IHC), and the other party to technique RT-qPCR were evaluated in the relative expression of mRNA of the genes of BNP, ANP, IL-6, TGF- β 1 and procollagen type I. In the control group IHC showed a marking point, while the treated groups showed a more diffuse labeling, and the CT + RT group showed the greatest dispersion. Although it was not observed in the ELISA assay a significant difference between plasma concentrations of BNP treated groups compared to control, there is an increasing trend in the CT + RT group. In the analysis by RT-qPCR, the relative expression of BNP was similar to that shown in the ELISA. The CT + RT group was the group that showed higher gene expression of BNP, but the difference is not significant compared to control. The only analysis that which obtained difference in gene expression compared to control was the IL-6 gene that showed low expression. All other genes analyzed by RT-qPCR showed an expression similar to control. Therefore, the outcome is that BNP did not appear as a good specific cardiac biomarker for early identification of cardiac disease, within 2 months after treatment in Wistar rats, by effect of the action of cardiotoxic selected treatment protocols, since none of their quantitative assessments showed a differentiated result compared to control, however, there was no evidence that, in the meantime, there would be a scenario in development, or advanced of cardiac remodeling.

Keywords: Biomarker. BNP. Treatment against Cancer. Cardiotoxicity. ELISA. RT-qPCR. IHC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema de fatores que podem potencializar o risco de disfunção cardíaca na terapêutica oncológica	20
Figura 2 –	Procedimento de administração do poliquimioterápico TC nos animais.....	31
Figura 3 –	Procedimento de irradiação dos animais	32
Figura 4 –	Iniciadores utilizados para a análise de RT-PCR.....	38
Figura 5 -	Fotomicrografia da imunohistoquímica anti-BNP.....	42
Figura 6 –	Expressão relativa de mRNA de BNP.....	44
Figura 7 –	Expressão relativa de mRNA de IL-6 genes.....	44
Figura 8 –	Expressão relativa de mRNA do gen TGF- β 1.....	45
Figura 9	Expressão relativa de mRNA do gen procolágeno tipo I.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais Agentes Quimioterapicos Utilizados no Tratamento do Câncer.....	24
Tabela 2 – Distribuição dos animais de acordo com o tratamento.....	30
Tabela 3 - Média da concentrações plasmáticas de BNP	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang I	Angiotensina I
Ang II –	Angiotensina II
ANP –	Peptídeo Natriurético Atrial
BNP –	Peptídeo Natriurético do tipo B
CM –	Câncer de Mama
CNP –	Peptídeo Natriurético do tipo C
CTnI –	Subunidade I da Troponina
cTnT –	Subunidade T da Troponina
DC –	Doença Coronariana
DEPC –	Água tratada com dietil-pirocarbonato
DNA –	Ácido Desoxirribonucleico
ECA	Enzima conversora da angiotensina
ELISA –	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ET-1	Endotelina-1
FEVE –	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
GAPDH –	Gliceraldeído3-fosfato-desidrogenase
HA –	Hipertensão Arterial
HAS –	Hipertensão Arterial Sistêmica
IC –	Insuficiência Cardíaca
ICC –	Insuficiência Cardíaca Congestiva
IDT –	Integrated DNA Technologies
IHQ –	Imunohistoquímica
IL-1 β –	Interleucina 1 β
IL-6 –	Interleucina 6

IM –	Infarto do Miocárdio
IMA –	Infarto Agudo do Miocárdio
INCA –	Instituto Nacional de Câncer
mRNA –	Ácido Ribonucleico mensageiro
NPR-A –	Receptor de Membrana tipo A da Guanilil Ciclase
NPR-B –	Receptor de Membrana tipo B da Guanilil Ciclase
NPR-C –	Receptor de Membrana tipo C da Guanilil Ciclase
PA –	Pressão Arterial
RIHD –	Doença Cardiovascular Radioinduzida
SEM –	Erro padrão da média
SRA –	Sistema Renina Angiotensina
SRAA –	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TC –	Esquema referente à associação dos quimioterápico taxanos e ciclofosfamida
TGF- β 1 –	Fator β 1 de Transformação de Crescimento
TNF- α –	Fator de Necrose Tumoral α
VE –	Ventrículo Esquerdo
VEC –	Fluido Extracelular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	CÂNCER	16
1.1	Câncer de Mama e formas de tratamento	17
1.2	Cardio-Oncologia	19
1.3	Disfunção cardíaca: evento decorrente da Cardiotoxicidade	21
1.4	Cardiotoxicidade associado à radioterapia	22
1.5	Cardiotoxicidade associado à quimioterapia	23
1.6	Técnicas de Diagnóstico e Monitoramento de Complicações Cardíacas ..	24
1.6.1	<u>Biomarcadores</u>	25
1.6.1.1	Peptídeos Natriuréticos.....	26
1.6.1.1.1	Peptídeo Natriurético tipo B.....	27
2	OBJETIVO	29
2.1	Objetivo geral	29
2.2	Objetivos específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Administração dos quimioterápicos	30
3.3	Irradiação dos Animais	31
3.4	Análise histológico	33
3.4.1	<u>Imunohistoquímica</u>	33
3.4.1.1	Preparo das Amostras.....	34
3.4.1.2	Reações Imunohistoquímicas.....	34
3.5	Ensaio moleculares	35
3.5.1	<u>RT-qPCR</u>	35
3.5.1.1	Extração de RNA total.....	35
3.5.1.2	Purificação dos RNAs.....	36
3.5.1.3	Reação de Transcriptase Reversa.....	36
3.5.1.4	Elaboração dos <i>primers</i>	37
3.5.1.5	Avaliação dos Aplicons e PCR.....	38
3.5.2	<u>ELISA</u>	39
3.5.2.1	Coleta das amostras.....	39
3.5.2.2	Procedimento para realização do Kit ELISA.....	40

3.6	Análise estatística.....	41
4	RESULTADOS	42
4.1	Imunohistoquímica	42
4.2	ELISA	43
4.3	RTqPCR	43
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO - Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais	62

INTRODUÇÃO

Os avanços na terapêutica oncológica resultam no aumento da expectativa de vida dos pacientes. Todavia, entre 5 a 30% dos pacientes vêm apresentando complicações cardiovasculares, decorrentes do tratamento, que podem levá-los ao óbito. A implementação de um monitoramento contínuo dos pacientes que foram submetidos ao tratamento é uma estratégia essencial para reverter este quadro, visto que, a detecção prévia do desenvolvimento da disfunção cardíaca permite uma intervenção salutar na evolução da doença, reduzindo a morbimortalidade dos pacientes por cardiopatias consequentes dos efeitos colaterais do tratamento.

A utilização de biomarcadores cardioespecíficos vem sendo apontada como ferramenta útil na identificação precoce de lesão cardíaca induzida por quimioterápicos e pela radiação ionizante na radioterapia, uma vez que, nenhuma das técnicas estabelecidas atualmente, possui parâmetro sensível suficiente para detectar precocemente os efeitos colaterais da terapêutica oncogênica. O nível elevado do peptídeo natriurético do tipo B (BNP) plasmático é indicado como preditor de problemas cardíacos na área clínica. Logo, o objetivo deste trabalho é avaliar o nível do BNP através de análises moleculares de amostras coletadas do plasma e tecido cardíaco de ratas *Wistar* submetidos a protocolos de tratamento oncológicos, utilizados no combate ao câncer de mama.

1 O CÂNCER

O processo global de industrialização, ocorrido principalmente no século passado, desencadeou a redefinição de padrões de vida no trabalho, nutrição e consumo. Essas alterações de padrões provocaram uma grande modificação no perfil de saúde-doença no mundo. Houve uma diminuição da taxa de doenças infecciosas e aumento da taxa de doenças crônicas degenerativas, especialmente as cardiovasculares e câncer (Guerra et al, 2005). Os fatores de risco relacionados ao câncer podem ser encontrados no meio ambiente ou ser hereditários, todavia, a maioria deles está associada ao ambiente (geral - água, terra e ar; ocupacional - quando insalubre; social e cultural - estilo e hábitos de vida; e consumo – alimentos e medicamentos) (Almeida et al., 2005). O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, configurando-se como um dos mais importantes problemas de saúde pública na atualidade (INCA, 2012a).

Células normais, de todo o organismo vivo, estão em plena harmonia citológica, histológica e funcional. Trata-se de harmonia essencial à manutenção da vida. No entanto, para que esse fenômeno seja preservado, é necessária a regulação cuidadosa das diversas etapas envolvidas no ciclo celular. Apesar de não estar totalmente esclarecido, o controle do ciclo celular parece ser dependente de fatores estimulantes ou inibitórios, que estariam em equilíbrio constante. Mesmo em tecidos que apresentam alta rotatividade de células, como os tecidos epiteliais e sanguíneos, observa-se uma organização estrutural e uma massa celular rigorosamente controlada (Dalerba et al., 2007).

O câncer é uma doença celular, caracterizada por um desvio dos mecanismos de controle da proliferação e diferenciação das células. As células que sofreram transformação neoplásica proliferam excessivamente e formam tumores locais, que podem comprimir ou invadir estruturas normais adjacentes (Katzung, 2006). A metástase constitui o crescimento neoplásico secundário, à distância, sem continuidade com o foco primitivo (Gatenby & Gillies, 2008). O câncer é um processo comum a um grupo heterogêneo de doenças, que diferem em sua etiologia, frequência, manifestações clínicas, tratamentos e prognósticos (INCA, 2002). O diagnóstico precoce associado a tratamentos modernos e eficazes aumenta a possibilidade de cura e prolonga a vida do paciente.

1.1 Câncer de mama e formas de tratamento

Foi estimado para o biênio 2012/13 pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), que 520 mil brasileiros receberão diagnóstico de câncer, sendo 52.680 casos novos de câncer de mama (CM). O risco médio estimado é de 52 casos para cada 100 mil mulheres.

É consenso mundial que a maior incidência dos tumores malignos de mama ocorra em torno dos 50 anos. Entretanto, nos últimos anos têm sido observado um aumento da incidência dessa doença em mulheres com idade igual ou inferior a 35 anos (Liebens et al., 2008).

O crescente número, a cada ano, de casos diagnosticados, a elevada taxa de mortalidade registrada e a demanda de recursos financeiros para resolver os problemas de diagnóstico e tratamento definem o CM como um grave problema de saúde pública mundial (Amado et al., 2006).

Existem três tipos principais de tratamento contra o CM: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A determinação do tratamento oncológico a ser aplicado no paciente dependerá do estadiamento do tumor, classificado de acordo com normas estabelecidas pelo sistema TNM (INCA, 2002). A estratégia de tratamento mais utilizada contra o CM é a intervenção cirúrgica, que consiste na excisão do tumor. Entretanto, a cirurgia normalmente é acompanhada de radioterapia e/ou quimioterapia, para uma maior eficácia do tratamento.

A radioterapia é utilizada com a finalidade de diminuir o tamanho do tumor, reduzir a chance de recorrência e a possibilidade de desenvolver metástase, aumentando, conseqüentemente, à sobrevida do paciente (Almeida et al., 2005). Esta modalidade de tratamento oncológico tem como fundamento a aplicação da radiação ionizante no intuito de eliminar células neoplásicas por apoptose (Basavanraju e Easterly, 2002; Magne et al., 2006).

Uma dose pré-calculada de radiação é aplicada a um determinado volume de tecido, que engloba o tumor, buscando erradicar todas as células tumorais, com o menor dano possível às células normais circunvizinhas. A radiação ionizante ao interagir com os tecidos, causam ionizações e excitações em moléculas do meio, podendo ocasionar a formação de radicais livres (INCA, 2012b).

A resposta dos tecidos às radiações depende de diversos fatores, tais como a sensibilidade do tumor à radiação, sua localização, oxigenação e a taxa de dose. Para que o efeito biológico atinja maior número de células neoplásicas, e a tolerância dos tecidos normais seja respeitada, a dose total de radiação a ser administrada é habitualmente fracionada em

doses diárias iguais (INCA, 2012b). Aproximadamente 60% das mulheres acometidas pelo CM fazem uso da radioterapia (Bartelink et al., 2003; Senkus-Konefka e Jassem, 2006).

A quimioterapia, por sua vez, fundamenta-se na aplicação de fármacos que interferem na reprodução celular, levando as células malignas à morte. Estes fármacos podem ser ministrados isoladamente ou combinados (poliquimioterapia), apresentando assim resultados mais eficazes, obtendo respostas mais amplas a cada aplicação, diminuindo o risco de resistência e conseguindo atingir as células em diferentes fases do seu ciclo. (Nicolaou et al., 1994).

Um terço dos pacientes conseguem ser curados através de medidas locais, que são eficientes quando o tumor ainda não sofreu metástase. Todavia, nos demais casos, a neoplasia caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce de micrometástases, indicando uma abordagem sistêmica, no emprego de substâncias químicas isoladas ou em combinação, que pode ser efetuada em cerca de 60-70% dos casos de neoplasia maligna (Almeida et al., 2005).

O objetivo primário da quimioterapia é destruir células neoplásicas, preservando as normais. Entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando tanto células malignas quanto benignas, particularmente, as células benignas de rápido crescimento. Isto explica a maior parte dos efeitos colaterais imediatos da quimioterapia ser náuseas, perda de cabelo e susceptibilidade maior às infecções. Porém, o corpo recupera-se destes inconvenientes após o tratamento (Almeida et al., 2005; Müller, 2010).

Os diferentes fármacos utilizados no combate as neoplasias podem ser divididos em ciclo-celular específicos e não específicos. Os específicos atuam em uma das fases do ciclo celular. Os fármacos que não atuam em fases específicas da divisão celular acabam exercendo sua citotoxicidade de outra maneira. Por exemplo, agentes alquilantes induzem ligação cruzada e/ou fragmentação das hélices de DNA, interferindo na sua síntese e função. A ciclofosfamida necessita de uma ativação bioquímica no fígado a fim de atingir sua função antitumoral (Chabner et al., 2006).

Dentre a classe de produtos naturais temos os taxanos, docetaxel e paclitaxel, que atuam exercendo efeito citotóxico sobre a formação dos microtúbulos do fuso mitótico da célula cancerosa, por meio da ligação à tubulina. Na ausência do fuso mitótico, os cromossomos podem dispersar-se no citoplasma ou aglomerar-se, o que possivelmente leva a morte celular (Oliveira et al., 2002; Chabner et al., 2006).

Devido a essa característica é que se opta por usar, mais frequentemente, a poliquimioterapia, na qual mais de dois tipos de medicamentos de classificações

farmacológicas diferentes são aplicados, buscando-se um efeito mais abrangente sobre as células tumorais (Martin, 2003). É importante, sempre que possível, a associação de medicações com diferentes ações, buscando o aumento do efeito antitumoral sem elevar o grau de toxicidade (Lenihan e Esteva, 2006).

A escolha do melhor regime quimioterápico depende do estadiamento do tumor, e também da condição clínica do paciente. A quimioterapia neoadjuvante (que se inicia antes de qualquer tratamento, cirúrgico ou radioterapia) é cada vez mais usado no tratamento de CM em estágio inicial (Crow et al., 2004; Shen et al., 2012). Um dos regimes utilizados é a associação de taxanos (docetaxel) e ciclofosfamida, conhecido como esquema TC (Jones et al., 2006).

Vários estudos relatam que a associação do uso das técnicas de quimioterapia e radioterapia aumentam as chances de um tratamento contra o câncer de forma efetiva, porém também aumenta a probabilidade de que a paciente venha a desenvolver algum dos efeitos cardiotoxicos conseqüentes do tratamento (Amado et al., 2006; Bovelli & Roila, 2010; Chargari et al, 2010; D'Errico et al., 2012; Dodos et al, 2008).

1.2 Cardio-oncologia

As doenças cardiovasculares nos pacientes com câncer são eventos cada vez mais frequentes, em decorrência de avanços na terapêutica oncológica, que resultam tanto na melhora da qualidade de vida quanto no aumento da sobrevida dos pacientes. Nas últimas décadas, os progressos no tratamento oncológico resultaram também na maior exposição dos pacientes a fatores de risco cardiovasculares e a quimioterapia com potencial cardiotoxico (Kalil et al., 2011).

Quando as modalidades de radioterapia e quimioterapia são aplicadas em concomitância, dependendo do estadiamento do tumor, esperam-se, teoricamente, os maiores benefícios do tratamento. Todavia, tem sido reportado que a administração simultânea de ambas as modalidades pode conduzir a um aumento dos efeitos colaterais (figura 1) (Dolci et al., 2008)

Uma mudança de paradigma é observada em relação ao prognóstico oncológico, onde o paciente é visto como um portador de uma possível doença crônica, que ao longo da sua

evolução pode apresentar descompensações agudas, como as manifestações cardiovasculares (Kalil et al., 2011). A colaboração e a interação das áreas de Cardiologia e Oncologia têm contribuído para reduzir os efeitos cardiovasculares adversos e obter melhores resultados no tratamento do paciente com câncer (INCA, 2012c).

Atualmente, são essenciais para o cuidado adequado do paciente com câncer a identificação precoce do risco cardiovascular, a implementação de estratégias para a redução de risco, o diagnóstico correto da descompensação cardiovascular e a escolha da terapia eficaz. Esse conjunto de medidas visa reduzir o risco de mortalidade e melhorar a qualidade de vida do paciente, sem interferir, se possível, no tratamento específico do câncer (Kalil et al., 2011).

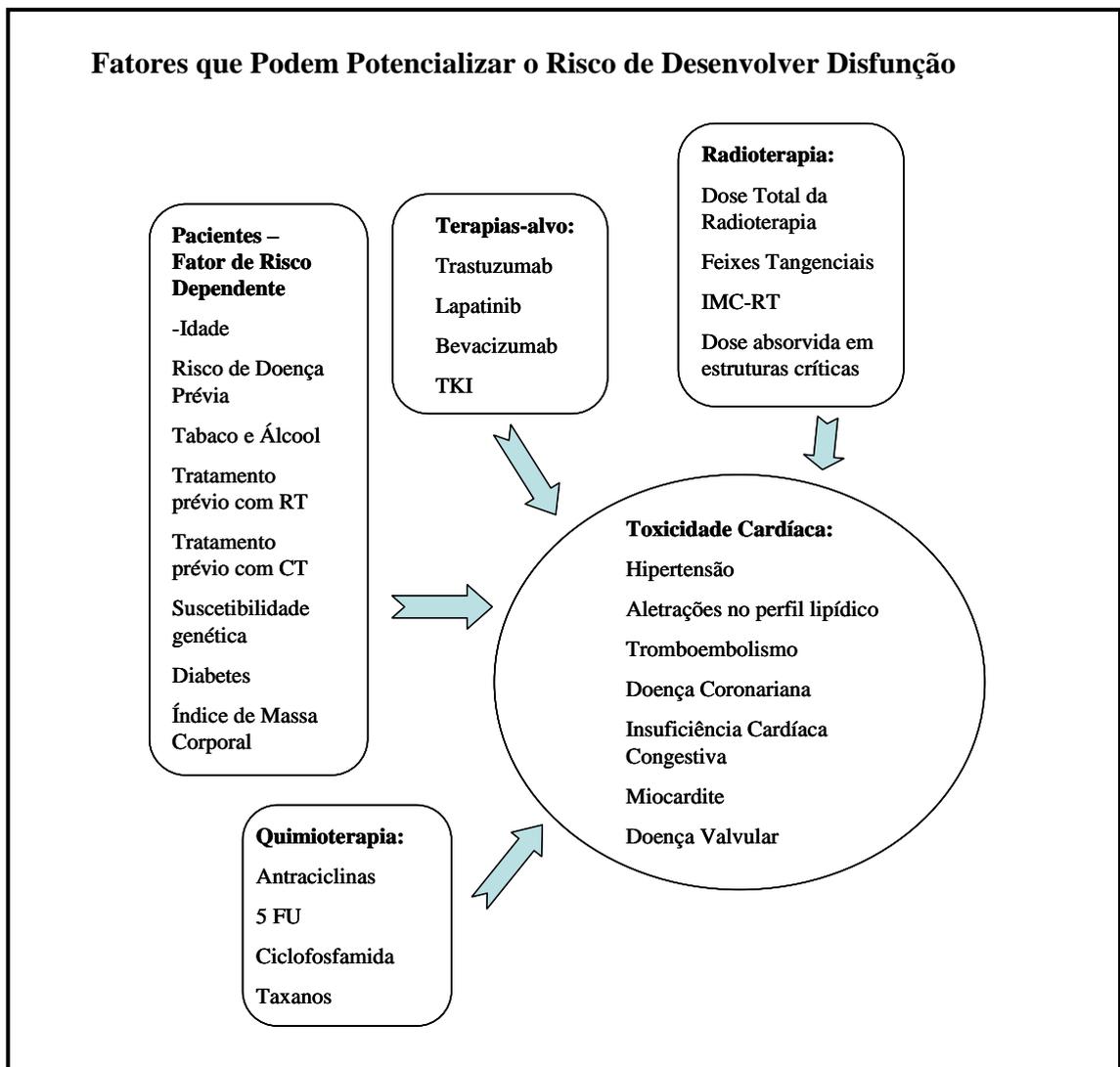


Figura 1. Fatores que podem potencializar o risco de desenvolver disfunção cardíaca. Fonte: Chargari et al., 2010, modificado.

1.3 Disfunção cardíaca: evento decorrente da cardiotoxicidade

A prevenção e o tratamento das doenças cardiovasculares em pacientes submetidos a terapia contra o câncer vêm ganhando destaque. As complicações cardíacas observadas estão associadas a uma série de alterações metabólicas sistêmicas que podem comprometer de forma significativa a qualidade e a expectativa de vida do paciente, mesmo após a cura do câncer, sendo reponsável por considerável morbidade (Kalil et al., 2011). A incidência de toxicidade cardíaca crônica depende de diferentes fatores de risco, que estão demonstrados no esquema da Figura 1.

A disfunção cardíaca apresentada por alguns pacientes, submetidos à radioterapia e/ou á quimioterapia, parece estar associada ao desenvolvimento de fibrose, em diferentes partes do coração. O remodelamento do tecido cardíaco pode comprometer o desempenho de bombeamento do coração, devido a alterações na complacência da sístole e/ou diástole (Bovelli e Roila., 2010; Dolci et al., 2008, Franchini, 2011).

A fibrose, tipicamente, resulta de uma inflamação crônica, definida como uma resposta imune, que persiste por vários meses, durante os quais a inflamação, o remodelamento do tecido e o reparo ocorrem em períodos simultâneos. Apesar da inflamação crônica possuir diferentes etiologias e manifestações clínicas, ela sustenta a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrinogênicas, que são fatores estimuladores da deposição de colágeno e do progressivo remodelamento do tecido (Wynn, 2008).

O desenvolvimento de cardiopatias, que possivelmente irão evoluir para a insuficiência cardíaca (IC), demanda o uso de terapias antineoplásicas menos agressivas, porém, isso provavelmente irá desencadear efeitos menos eficientes na ação contra o tumor (Dolci et al., 2008). A partir do momento que as cardiopatias progridem para IC, ocorre uma série de alterações histopatológicas no miocárdio, assim como alterações estruturais no ventrículo esquerdo (Pontes e Leães, 2004). A compreensão dos mecanismos de adaptação do coração permitem o estabelecimento de condutas preventivas e terapêuticas (Franchini, 2011).

1.4 Cardiotoxicidade associada à radioterapia

O coração é um órgão localizado na região torácica, especificamente, no mediastino médio. Sua localização faz dele um alvo da radiação quando pacientes com tumores na região do mediastino são submetidos à radioterapia, como parte do tratamento oncológico (Wondergem et al., 1996; Krüse et al., 2001; Salminen et al., 2006; Seemann et al., 2012).

As complicações aludidas do tratamento oncológico com radioterapia não estão associadas somente a pacientes com CM. A doença cardiovascular radioinduzida (RIHD) pode ser observada em pacientes irradiados para tratamento de doença de Hodgkin (ou linfoma de Hodgkin), câncer de pulmão, timoma, câncer de esôfago, câncer gástrico, etc. Um número considerável desses pacientes será submetido à radioterapia durante o tratamento da doença (Wondergem et al., 2001; Gaya e Ashford, 2005; Giordano et al., 2005; Seemann et al., 2012).

No CM, o VE e a coronária esquerda são as estruturas cardíacas que, normalmente, recebem maior dose (Raj et al., 2006; Schult-Hector e Trott, 2007), principalmente, quando o tumor se localiza na mama esquerda. Embora novas ferramentas permitam irradiar com maior precisão o alvo desejado, ainda assim, é possível observar a RIHD em pacientes. As lesões cardíacas são efeitos tardios da radioterapia, que podem se manifestar após anos ou décadas (Seemann et al., 2012; Chargari et al., 2010). O mecanismo molecular subjacente ao desenvolvimento de problemas cardíacos induzidos pela radiação ionizante não é bem compreendido.

As lesões provocadas pela radiação no tecido sadio podem estar associadas à gênese de uma série de doenças. Uma variedade de complicações cardíacas crônicas, ocasionalmente agudas, incluindo pericardite, tamponamento ou constrição, fibrose de artérias coronárias, infarto do miocárdio (IM), anormalidades valvares, fibrose miocárdica, podem ser observadas (Stewart, 1995; Affonso, 2004; Kalil et al., 2011).

Várias complicações cardíacas, em pacientes com CM, expostos à radioterapia, estão associadas ao processo de fibrose. A fibrose, em decorrência da radiação ionizante, tem sido observada em diferentes órgãos (pele, pulmão, coração e fígado). Entretanto, os mecanismos envolvidos na fibrose induzida pela radiação ionizante não estão totalmente esclarecidos (Sime e O'Reilly, 2001).

A injúria vascular causada pela radioterapia pode ser silenciosa e, aproximadamente, 50% dos pacientes assintomáticos desenvolvem irregularidades de perfusão cardíaca.

O intervalo de tempo médio para o desenvolvimento de doença coronária (DAC) é de aproximadamente 7 anos (Senkus et al., 2010). A degeneração de miócitos e seu preenchimento por fibroblastos, no miocárdio, podem refletir no funcionamento ventricular, conduzindo a um quadro de disfunção sistólica ou diastólica ou ambas. Cardiomiopatias dilatadas, hipertróficas e restritivas vêm sendo notificadas (Wong et al., 2001; Gaya e Ashford, 2005; Schultz-Hector e Trott, 2007).

1.5 Cardiotoxicidade associado à quimioterapia

Os efeitos adversos da quimioterapia, como por exemplo, o aumento da atividade inflamatória e as alterações de coagulação estão associados a um risco de desenvolver complicações cardiovasculares, como hipertensão arterial (HA), IC e doença coronariana (Ganz et al., 2002; Yeh et al., 2009).

Os mecanismos subjacentes a IC ainda não são bem compreendidos. Vários agentes neoplásicos são potencialmente cardiotoxícos, e os mais comumente associados à cardiopatia são as antraciclina (doxorubicina e epirubicina), taxanos (paclitaxel e docetaxel), agentes alquilantes (ciclofosfamida). A peroxidação lipídica e a formação de radicais livres pela antraciclina têm um papel importante na cardiotoxicidade. Quando comparados a outros órgãos, como rim e fígado, o coração tem níveis mais baixos de sistemas antioxidantes, aniquiladoras dos radicais livres, logo, ele se torna mais vulnerável e os danos podem ser irreversíveis (Dolci et al., 2008).

Como citado anteriormente, um dos esquemas terapêuticos utilizados para o tratamento de CM é a associação de taxanos e ciclofosfamida, conhecido como esquema TC (Jones et al., 2006; Lenihan et al., 2008), que é utilizado em pacientes com estágio inicial da doença. Os mecanismos precisos da cardiotoxicidade induzida por ciclofosfamida e taxanos ainda são desconhecidos. Todavia, uma das hipóteses elaboradas para a ciclofosfamida é de que ela provoque danos diretos ao endotélio, seguindo de extravasamento de metabólitos tóxicos, resultando em dano aos cardiomiócitos, hemorragia e edema. A ciclofosfamida está relacionada a disfunção ventricular em até 10% a 20% dos casos. Dentre os quimioterápicos mais associados à isquemia miocárdica encontra-se os quimioterápicos antimicrotúbulos (paclitaxel e docetaxel) (Yeh et al., 2009).

Entre os efeitos adversos dos quimioterápicos no sistema cardiovascular destaca-se, pela sua maior frequência e gravidade, a disfunção ventricular sistólica e IC. A ocorrência da disfunção ventricular sistólica e diastólica, assintomática ou sintomática, varia nas séries clínicas entre 5% e 30%, sendo mais frequentes em pacientes que apresentam os clássicos fatores de risco como: extremos de idade, disfunção ventricular prévia, hipertensão arterial, diabetes, uso de associação de quimioterápicos, radioterapia mediastinal, suscetibilidade genética, entre outros (Figura 1), além da dose administrada no paciente (Bovelli e Roila, 2010; Kalil et al., 2011).

Teoricamente, qualquer quimioterápico tem potencial para causar toxicidade. Na tabela 1 estão listados os quimioterápicos mais utilizados, relacionados à sua incidência de cardiotoxicidade e frequência de uso (Kalil et al., 2011).

Tabela 1: Principais Agentes Quimioterápicos Utilizados no Tratamento do Câncer e a Incidência de Cardiotoxicidade (Redução da Fração de Ejeção e/ou Insuficiência Cardíaca)

Agente Quimioterápico	Incidência (%) de disfunção ventricular ou insuficiência cardíaca	Frequência de uso
Antraciclina (doxorubicina)	5% a 35% (dose acima de 400mg/m ²)	++++
Agentes Alquilantes (ciclofosfamida)	5% a 25% dos casos	++++
Agentes antimicrotúbulos (docetaxel)	2% a 10% dos casos	+++

Fonte: Kalil et al., 2011. Modificada.

1.6 Técnicas de diagnóstico e monitoramento de complicações cardíacas

O monitoramento de sinais e sintomas de IC é aspecto fundamental no manejo de pacientes que se submetem a terapia oncológica cardiotoxicidade. Como a toxicidade pode se manifestar em qualquer momento, durante e após vários anos da finalização do tratamento,

faz-se necessária vigilância contínua das manifestações clínicas dos efeitos cardíacos quimio-radioinduzidos.

O reconhecimento do indivíduo em risco, a prevenção da disfunção ventricular esquerda assintomática e insuficiência cardíaca são, portanto, importantes objetivos no manejo desses pacientes, apesar das recomendações para embasar condutas, nesse contexto clínico, serem baseados em estudos com número pequeno de pacientes monitorados. Além das recomendações de diretrizes e bases internacionais ainda serem escassas (Kalil et al., 2011).

Existem vários procedimentos de monitoração para detecção de cardiomiopatia, porém, nenhuma das técnicas estabelecidas atualmente possui parâmetro sensível suficiente para detectar precocemente os distúrbios e sequelas cardíacas desenvolvidas pelos tratamentos antineoplásicos (Dietz et al., 2003; Dolci et al., 2008; Bovelli & Roila, 2010;). Por exemplo, o índice de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), avaliado na ecocardiografia, quando se apresenta alterado no exame, indica que já existe um quadro de disfunção instalado no coração (Bovelli e Roila, 2010). A única técnica que poderia representar um método mais confiável para avaliação dos danos do miocárdio seria a biópsia endomiocárdica, mas a viabilidade deste método é muito limitada na prática clínica, por se tratar de um procedimento invasivo (Dolci et al., 2008). Exames como angiografia, que são utilizados associados a radionuclídeos, ecocardiograma e ressonância magnética, possuem baixa sensibilidade para detecção precoce das alterações cardíacas geradas pelo tratamento contra o câncer, além destes exames serem de custo elevado. O uso de biomarcadores para identificação de cardiotoxicidade é estratégia atrativa, pois permite identificar dano precoce e subclínico; proporcionando janela terapêutica para o uso de medidas potencialmente cardioprotetoras, além de acompanhamento clínico intensivo de disfunção ventricular (Ewer & Ewer, 2010).

1.6.1 Biomarcadores

A utilização de biomarcadores cardioespecíficos vem sendo indicada como uma técnica promissora na identificação precoce de lesão cardíaca por quimioterápicos em dos pacientes oncológicos (Cardinale e Sandri, 2010). De forma geral, podemos classificar os métodos de monitoramento entre aqueles que identificam lesão funcional global do coração,

avaliada tradicionalmente pela FEVE, e aqueles que buscam identificar a lesão precoce do cardiomiócito, avaliação por biomarcadores (Dolci et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, o ideal seria que a detecção do desenvolvimento da cardiopatia ocorresse na fase latente, e não depois que já se instalou no órgão. Dessa forma, pois seria possível realizar uma intervenção, visando interromper o desenvolvimento da disfunção cardíaca, melhorando a qualidade de vida do paciente, além de reduzir o índice de mortalidade por infarto ou IC decorrentes do tratamento (Bovelli & Roila., 2010).

Atualmente, um dos problemas encontrados no uso de biomarcadores é devido ao fato de que não está bem estabelecido o momento ideal de sua análise no paciente, uma vez que ainda não existem estudos conclusivos. Porém, o ponto positivo está no fato de que para realizar a sua quantificação apenas é necessário um pequeno volume de sangue do paciente. O que possibilita a coleta recorrente de amostras, durante o período estabelecido de acompanhamento do paciente. Os biomarcadores mais testados nesse contexto são as troponinas e os peptídeos natriuréticos (Ewer & Ewer, 2010).

1.6.1.1 Peptídeos natriuréticos

Humanos produzem três tipos de peptídeos natriuréticos, o atrial (ANP), o tipo B (BNP) e o tipo C (CNP). O CNP é produzido pelas células endoteliais e macrófagos, enquanto que o ANP e BNP são sintetizados pelo músculo cardíaco (Sullivan et al., 2005). O coração participa na regulação da homeostase cardiovascular, como um órgão endócrino (Ogawa et al., 2001). ANP e BNP ligam-se ao receptor de membrana tipo A (NPR-A), da guanilil ciclase, ativando a via de sinalização do cGMP (Sullivan et al., 2005; McGrath et al. 2005).

O ANP é expresso e armazenado, em grandes concentrações, em grânulos atriais, sendo liberado dentro da circulação em resposta à tensão gerada na parede do átrio. O ANP também pode ser produzido nos ventrículos, porém é encontrado em concentrações menores, dependendo da condição fisiopatológica do coração, e não foi detectada, nesta região, grânulos de armazenamento (Costa, 2007; Kruse et al., 2001). Dados sugerem que o nível plasmático de ANP pode refletir o mau funcionamento do coração e sua concentração possa ser utilizada como um marcador da disfunção cardíaca induzida pela radiação (Wondergem et al., 2001; Kruse et al., 2002).

1.6.1.1.1 Peptídeo natriurético tipo B

Durante a última década a compreensão dos peptídeos natriuréticos ANP e BNP expandiram-se rapidamente, e, atualmente, o BNP vem desempenhando um papel importante como ferramenta de diagnóstico, para identificação de presença ou risco de desenvolver problemas cardíacos na área clínica (Yoshimura et al., 2001; Sullivan et al., 2005; Gwechenberger et al., 2003; Bruggink et al., 2006; Palazzuoli et al., 2010).

O BNP foi inicialmente purificado de extrato de cérebro de porco, sendo por este motivo denominado anteriormente de “brain natriuretic peptide”. No entanto, foi posteriormente encontrado em concentrações mais elevadas nos ventrículos cardíacos de pacientes, ou animais, que sofreram estiramento cardíaco, como ocorre na insuficiência cardíaca congestiva ou IM. Mediante isso, ele passou a ser denominado de peptídeo natriurético tipo B (Kuwahara et al., 2010).

Um dos principais estímulos que levam a produção e liberação do BNP pelo coração é a sobrecarga de pressão, volume e aumento da tensão parietal no VE, que estimulam alterações fisiológicas nos cardiomiócitos ventriculares ativando a sua síntese (Cardinale e Sandri, 2010). A doença cardíaca hipertensiva descreve uma fase de remodelação no miocárdio, que pode ocorrer decorrente da perpetuidade do estímulo da sobrecarga de pressão ou da liberação de substâncias hipertróficas (Watson et al., 2012). Neste remodelamento observa-se a transformação estrutural do tecido cardíaco e subsequente deficiência funcional do órgão, que também são elementos relacionados com o aumento da expressão de BNP (Menon et al., 2009). Além disso, já foi demonstrado que o BNP exibe efeito anti-fibrótico, reduzindo a síntese de colágeno, por possuir ação antagonista ao TGF- β 1 (Watson et al., 2012), a Ang II, e endotelina-1 (ET-1) (Majalahti et al., 2007). Entretanto, numerosos estudos estão relacionando a expressão de BNP a estados patológicos distintos dos relacionados à sobrecarga hemodinâmica crônica (Xia et al., 2011), o que não ocorre com o ANP (Ogawa et al., 2008).

Existem relatos de pacientes que não possuem o quadro de IC, mas possuem doenças cardiovasculares, como por exemplo, isquemia miocárdica aguda (IMA) e síndrome coronariana aguda, que apresentam maiores níveis de circulação de BNP do que os pacientes que apresentam IC (Palazzuoli et al., 2011). Além disso, alguns ensaios relataram elevados índices plasmáticos de BNP em pacientes com isquemia miocárdica, independentemente, se estes possuíam FEVE deficiente ou normal (Goetze et al., 2003; Xia et al., 2011). Portanto, o

mecanismo de regulação de síntese de BNP em IMA pode ser diferente do mecanismo de sobrecarga hemodinâmica crônica, ou seja, um novo fator, sem ser o de estiramento das células, pode influenciar a regulação de BNP. Dentro desse contexto, alguns estudos sugerem o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, particularmente a interleucina-6 (IL-6), na regulação da síntese do BNP (Goetze et al., 2003; Ogawa et al., 2004; Casals et al., 2009). No entanto, a influência de uma reação inflamatória, em quadros de isquemia miocárdica, ainda não está clara (Xia et al, 2011).

Existem estudos na literatura demonstrando que outros fatores podem aumentar a expressão de BNP. Entre eles estão a redução da tensão de oxigênio (Goetze et al., 2003; Xia et al., 2011), a rejeição de aloenxerto cardíaco (Ogawa et al., 2004), e a expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Ma et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O propósito deste trabalho foi simular dois protocolos da terapêutica oncológica: radioterapia (IR) e radioterapia associada à quimioterapia (TC) em modelo animal com o objetivo de avaliar após 2 meses de tratamento, o nível plasmático e expressão gênica do peptídeo natriurético do tipo B (BNP) e avaliar a expressão de genes envolvidos no processo de fibrose no tecido cardíaco das ratas *Wistar* submetidas ao tratamento.

2.2 Objetivos específicos

As amostras do coração e sangue coletados na eutanásia dos Ratos *Wistar* tratados e controle foram utilizadas para realizar as seguintes análises:

- Avaliar qualitativamente a expressão de BNP no ventrículo esquerdo, através da técnica de imunohistoquímica
- Avaliar a alteração da concentração de BNP plasmático pelo ensaio ELISA
- Avaliar as alterações na expressão de componentes moleculares envolvidos no processo de fibrose (TGF- β 1 e procolágeno tipo I)
- Avaliar a alteração na expressão da citocina pró-inflamatória IL-6.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Ratas *Wistar (Rattus norvegicus)*, com idade aproximada de 3 meses, pesando entre 250 e 300 gramas, foram mantidos em biotério, com ciclo de luminosidade e temperatura controlados (ciclos claro/escuro de 12-12 horas e 21°C, respectivamente). Os animais permanecerem em caixas de polipropileno apropriadas contendo maravalha, e receberam água potável e ração padrão para roedores *ad libitum*. Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, cada um contendo 7 animais, conforme pode ser observado no quadro abaixo. A distribuição dos animais, nos diferentes grupos experimentais, foi realizada de forma aleatória. Os protocolos de manuseio e experimentação foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os procedimentos experimentais respeitaram os procedimentos para o uso cinetífico de animais, de acordo com a Lei nº 11.794 de 08 de Outubro de 2008 (Anexo 1).

Tabela 2: Distribuição dos animais de acordo com o tratamento realizado

Grupos	Nº de animais	Tratamento
Controle	7	Sem tratamento
TC+IR	7	Quimioterapia (docetaxel + ciclofosfamida) + Irradiação (20 Gy)
IR	7	Irradiação (20 Gy)

3.2 Administração dos quimioterápicos

Para a realização da administração do poliquimioterápico TC, os animais foram anestesiados (ketamina/xilasina – na ordem de 2 para 1, sendo aplicados 0,1 mL por grama, por via intramuscular), colocados em posição supina sobre a bancada. O quimioterápico foi

injetado pela via intraperitoneal (ip). Sendo realizados quatro ciclos de administração, com intervalo de sete dias entre eles. Cada animal recebeu 10 mg/Kg/dia de ciclofosfamida e 1,5 mg/Kg/dia de docetaxel. A dose administrada para cada um dos fármacos, em cada ciclo, foi dimensionada de acordo com a dose equivalente dos 4 ciclos de quimioterapia em humanos (HEDs), para ratos. Esses valores foram obtidos através da fórmula de conversão toxicológica (FDA, 2005). Após sete dias do último ciclo de quimioterapia, os animais do grupo TC + IR foram irradiados. O grupo controle recebeu o volume equivalente ao volume da quimioterapia de solução salina (NaCl 0,9%), também em quatro ciclos, espaçados por sete dias entre eles.



Figura 2: Procedimento de administração do poliquimioterápico TC, por via intraperitoneal, em ratos *Wistar*, com aproximadamente 3 meses de idade.

Após o término dos procedimentos, os animais retornaram as caixas de origem e permaneceram sob observação constante até o próximo ciclo de tratamento. Sete dias após a finalização dos ciclos de quimioterapia o grupo TC+IR foi exposto à radiação ionizante.

3.3 Irradiação dos animais

Antes da irradiação, foi realizada uma simulação, com a finalidade de determinar a geometria espacial para o posicionamento do animal durante a irradiação. O animal foi submetido a uma tomografia computadorizada, com o objetivo de realizar o planejamento do procedimento. Com as imagens adquiridas realizou-se o planejamento da irradiação no volume cardíaco do rato, a geometria espacial e o tamanho do campo de irradiação (Ferreira-

Machado, 2008).

Durante o procedimento de irradiação, os animais foram anestesiados (ketamina/xilasina, intramuscular), e imobilizados em posição supina no suporte de isopor. Isso garantiu a permanência do rato na mesma posição no decorrer do procedimento (figura 3). A localização do coração do animal foi determinada por tato, e foi feita uma marcação em sua devida localização. Posteriormente, o animal acomodado no suporte foi levado para a sala onde fica localizado o acelerador linear, o animal imobilizado foi colocado sobre a cama, onde foi realizado o enquadramento da região do coração ao campo de irradiação do aparelho (campo 2x2 cm). Foi posicionado sobre a pele do animal um “bólus” de 0,5 cm, no local do campo de irradiação. “Bólus” é um material com densidade equivalente ao tecido, e é utilizado para deslocar o máximo da curva de dose, direcionado à superfície para o centro do coração. Dessa forma, o “bólus” converge a dose máxima para o alvo desejado, absorvendo seu espalhamento, e protegendo a pele da exposição a radiação

As ratas foram irradiados com dose única de 20 Gy, através do acelerador linear Varian® (Clinac 2100) com feixe de raio-X de energia nominal de 6 MeV e taxa de dose de 240 cGy/ min. O máximo de dose é alcançado a 1,5 cm de profundidade.

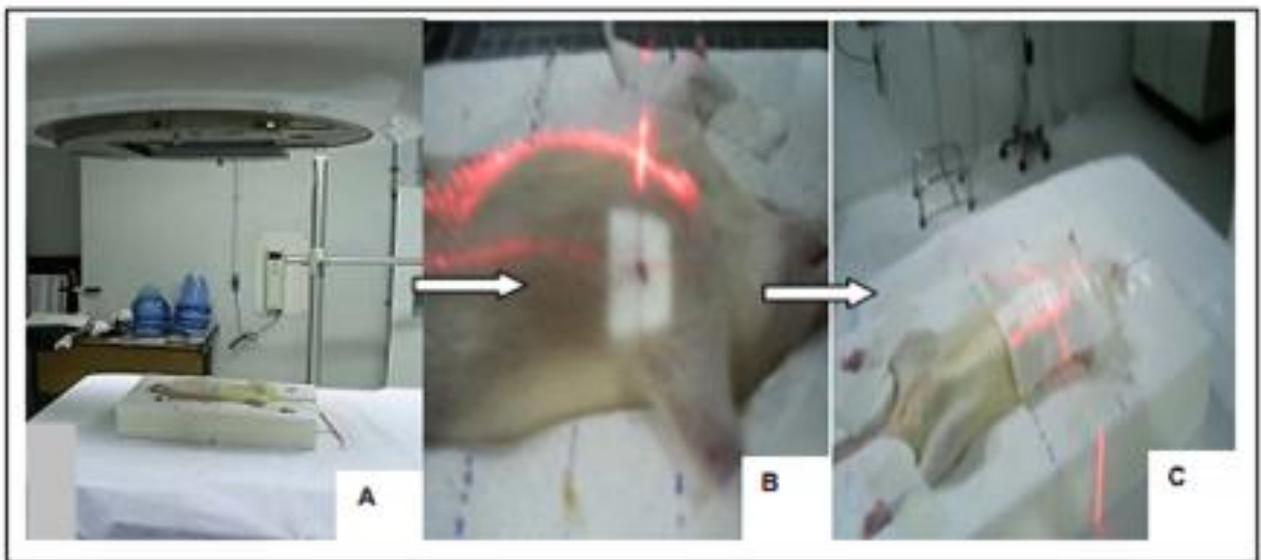


Figura 3: (A) Geometria espacial para a irradiação do animal. (B) Projeção luminosa do campo de irradiação na superfície do tórax. (C) Colocação do bólus na superfície do tórax. Adaptado Ferreira-Machado, 2008.

A dose de 20 Gy foi utilizada por apresentar bioequivalência com as doses de 45 a 60 Gy em pacientes expostos à radioterapia para CM. A irradiação foi realizada no Hospital

Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/ UFRJ).

O único procedimento de tratamento a qual o grupo IR foi submetido foi a radiação ionizante. Já o grupo TC+IR foi submetido a 4 ciclos de quimioterapia, com intervalo de uma semana entre eles, para após uma semana, ser exposta a irradiação. Ambos os grupos (TC+IR e IR) foram expostos no mesmo período a radiação ionizante.

No grupo controle as ratas foram submetidas a procedimentos que simularam o protocolo de tratamento. Para mimetizar o tratamento de quimioterapia, as ratas do grupo controle foram anestesiadas e foi administrado intraperitonealmente o mesmo volume que foi administrado dos fármacos nas ratas do grupo TC+IR, porém de soro fisiológico. No procedimento de radioterapia, as ratas do grupo controle foram deslocadas, junto com as demais, até o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ) onde as ratas que foram submetidas ao tratamento foram irradiadas, entretanto, as ratas do grupo controle apenas foram submetidas a anestesia. Finalizado o procedimento todos os animais retornaram para o biotério do Laboratório de Ciências Radiologia, onde ficaram sob observação, sob as mesmas condições mencionadas anteriormente, até o momento da eutanásia, que foram dois meses finalizado o tratamento.

3.4 Análise histológica

3.4.1 Imunohistoquímica

3.4.1.1 Preparo das amostras:

As amostras do VE coletadas, no momento da eutanásia, foram embebidas em paraformaldeído 3%, utilizado como fixador, até o momento do processamento do material.

As amostras foram lavadas em água corrente por 20-30 minutos. Em seguida, as amostras foram imersas em álcool, em banhos sucessivos de 1 hora, em diluições crescentes de 70%, 80%, 90%, 100% de álcool. Posteriormente, as amostras passaram por imersão de álcool absoluto + Xilol, ambos na mesma proporção, por 30 minutos. Depois passaram por

dois banhos de 15 minutos em Xilol, para, em seguida, dar início a sua inclusão em parafina. Na inclusão em parafina, as amostras passaram por dois banhos de imersão em parafina líquida, sendo cada um deles de 1 hora, realizados em recipientes distintos. A parafina, para se manter líquida, foi condicionada em estufa, com temperatura em torno de 55°C. Após o segundo banho em parafina líquida, o material foi retirado do cassete e inserido na forma de emblocamento, que foi preenchida com a parafina líquida, proveniente do segundo banho. Depois que a parafina solidificou, as amostras foram desemblocadas e identificadas. Foram realizados cortes seriados de 5 µm do material emblocado com pelo menos três animais de cada grupo, para realizar a imunohistoquímica (IHQ).

3.4.1.2 Reações imunohistoquímicas:

As lâminas com os cortes foram lavadas 6x por 5 minutos em PBS 0,1 M, triton 0,3%, pH 7,04, e incubadas em BSA 5% por 1 hora em PBS 0,1 M, pH 7,4. Após este período foi aplicado anticorpo policlonal anti-BNP (Abcam ab19645) diluído 1:100 em PBS 0,1 M, pH 7,4, por 1 hora a temperatura ambiente, ficando em seguida reagindo por *overnight* na geladeira a 4°C. No dia seguinte foram feitas 6 lavagens de 5 minutos com PBS 0,1 M, pH 7,4, e os cortes foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, conjugado a ALEXIA-488 (Invitrogen), diluído em PBS 0,1 M pH 7,4, na diluição de 1:400. Após 40 minutos, o excesso de anticorpo foi lavado novamente, por 6x de 5 minutos, com PBS 0,1 M pH 7,4, sendo então as lâminas montadas utilizando N-Propil-galato, como meio de montagem. As lâminas foram fotomicrografadas com câmara digital acoplada a um microscópio de epifluorescência (Olympus BX40 – Tóquio, Japão).

3.5 Ensaios moleculares

3.5.1 RT-qPCR

A técnica quantitativa de *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR) pode auxiliar na compreensão de vários processos fisiológicos, devido a sua grande sensibilidade para detectar transcritos em pequenas quantidades. A RT-qPCR é uma adaptação da clássica ferramenta PCR, que permite acompanhar, a cada ciclo, a amplificação do DNA alvo, através de corantes fluorescentes. O corante SYBER Green liga-se a fitas duplas de DNA alvo, permitindo determinar a quantidade de moléculas de DNA sintetizadas a cada ciclo de amplificação. Essa técnica foi utilizada para verificar alterações nos níveis gênicos de TGF- β 1, procolágeno tipo I, BNP, IL-6, no tecido cardíaco de ratas *Wistar* submetidas aos tratamentos, em relação ao controle no período de 2 meses após os procedimentos.

3.5.1.1 Extração de RNA total

O ventrículo esquerdo do coração dos animais, 2 meses após o tratamento, foi lavado com 0,9% NaCl, o ápice foi seccionado (aproximadamente 100mg) e inserido em tubo cônico de 1,5 mL contendo 300 μ L do reagente Trizol (Invitrogen). O material coletado foi triturado, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica esterilizada, e o volume final ajustado para 1mL do reagente Trizol e em seguida congelado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas em freezer -70°C até o procedimento de extração de RNA total. Para a extração do RNA total, as amostras foram descongeladas, homogenizadas e incubadas por 5 minutos a 27°C. Em seguida centrifugadas (12.000 xg, 10 minutos, 4°C), para a retirada do excesso de componentes celulares de elevado peso molecular (membrana celular, polissacarídeos, DNA e proteínas de alto peso molecular). Os sobrenadantes foram transferidos para tubos novos de 1,5 mL e a esses foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio.

Essa mistura foi homogenizada por inversão por 30 segundos e mantida por 5 minutos a temperatura ambiente. Depois, as amostras foram centrifugadas (12.000 xg, 15 minutos,

4°C). A fase aquosa de cada extração foi transferida para tubos novos de 1,5mL, aos quais foram adicionados 0,5 mL de isopropanol e a mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram, então, centrifugadas (10 minutos, 12.000 xg, 4°C), e os precipitados de RNA obtidos lavados com etanol gelado 75%, diluído em água tratada com dietil-piromcarbonato 0,1% (DEPC). Essa mistura foi homogenizada por inversão por 30 segundos. Após a lavagem, os precipitados foram novamente centrifugados (12.000 xg, 10 minutos, 4°C) e, por fim, reconstituídos em 20 µL de água tratada com DEPC 0,1%. As concentrações foram estabelecidas por meio da densidade óptica a 260nm (Biophotometer).

3.5.1.2 Purificação dos RNAs

Para eliminar possíveis contaminações com DNA genômico, os RNAs obtidos foram submetidos a reações de digestão com DNase, seguindo protocolo da RQ1 RNase-free DNase (Promega). Em seguida, o RNA, proveniente dessa reação foi purificado com kit RNeasy (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Dando seqüência, as concentrações de cada amostra, que foram estabelecidas pela densidade óptica a 260nm (Biophotometer).

3.5.1.3 Reação de transcriptase reversa

Cada reação, para sintetizar o DNA complementar (cDNA), foi constituída de 1 µL de mistura de dNTPs (10 mM de cada, Invitrogen), 1µL de RNA total (1 µg/µL), 1µL de Oligo-(dT) (500 µg/mL, IDT) e 9µL de água DEPC durante 65°C por 5 minutos, seguido de incubação no gelo por pelo menos 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 4 µL de 5X RT *Buffer* (250mM Tris-HCL, 375 mM KCl, 15mM MgCl₂ pH 8.3), 2 µL DTT (0,1M), 1 µL de inibidor de RNase (40U/µL, Invitrogen) e 1 µL de MMLV RT (200 U/µL, Invitrogen), incubando por 37°C durante 50 minutos. A reação foi inativada, mantendo-se durante 15 minutos a 70°C. Os cDNAs foram diluídos para concentrações, estimada de 3 ng/µL, com base na adição inicial de 1 µg em um total 20 µL (50 ng/µL) de volume final de reação,

dividido em alíquotas e armazenados a -70°C até o uso.

3.5.1.4 Elaboração dos *primers*

Os iniciadores foram desenhados de acordo com instruções contidas no manual do *Power SYBER® Green PCR Master Mix* and RT-PCR (Applied Biosystems), com auxílio da ferramenta disponível *on-line* na página da *Integrated DNA Technologies* (IDT). As sequências dos mRNAs foram obtidas no banco de dados do genoma de ratos disponível *online* na página da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As especificidades dos oligonucleotídeos foram determinadas previamente *in silico* diante de sua homologia a dados de mRNA de rato, através da ferramenta *BLAST Rat Sequences*, realizando buscas de baixa expectativa. Os melhores iniciadores foram determinados, quando possuíam homologia (Hits), exclusivamente com seus alvos. Na figura 5, encontra-se a relação dos primers elaborados a partir dos mRNA obtidos.

Iniciadores Utilizados para Análise da Expressão Diferencial com PCR em tempo Real

Gene Alvo	5'- PRIMER – 3'	Gene Alvo	5' - PRIMER – 3'
GAPDH	F ATGATTCTACCCACGGCAAG R CTACGTTCACTTCCAAGGGAAGA	ANP	F AGGTCAAGCTGCTTCGGGGGT R CACCGCAAGGGCTTGGGATCT
TGF-β1	F TTGCCCTCTACAACCAACACAA R GGCTTGCACCCACGTAGTAGTA	BNP	F CTGGGAAGTCCTAGCCAGT R GCCTTGGTCCTTTGAGAGC
Procolágeno	F TCTGTGTGGATTGGTGGCTCT R CCATGTAGGCTACGCTGTTCTTG	IL-6	F CAAAGCCAGAGTCATTGAGAGC R CTTAGCCACTCCTTCTGTGAC

Figura 4: Quadro de iniciadores, senso (F) e antisenso (R), foram elaborados a partir dos mRNA obtidos.

3.5.1.5 Avaliação dos amplicons e PCR

Antes das reações definitivas, para verificação das diferenças da expressão, foram realizadas reações testes, nas quais não só foi possível determinar condições ideais de iniciadores e cDNA, mas também a especificidade *in vitro* dos alvos amplificados pelos iniciadores abordados nas análises. A amplificação de um produto específico foi apurada por intermédio da análise da Curva de *Melting*, pelo programa Opticon Monitor 2.03 (MJ Research).

Para análise da determinação da eficiência de amplificação e especificidade dos primers foram realizadas reações a partir de uma curva padrão, dos genes analisados, variando a massa de cDNA em 15 ng, 3 ng, 0,6 ng e 0,024 ng em 20 μ l de reação, que também possuía 0,8 μ M de cada oligo específico (senso e anti-senso) e 1X *Power SYBER Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems).

Para a determinação da quantidade de mRNA, nas diferentes condições experimentais, foram utilizados para cada reação 1 ng ou 1,5 ng de cDNA, 0,8 μ M de cada oligonucleotídeo e 1X *Power SYBER Green PCR Master Mix* em 20 μ L de reação. O resultado final é representado pela média de cada grupo no período de 2 meses após o fim do tratamento. As amostras de cada indivíduo, componente dos respectivos grupos, foram avaliadas em duplicata.

Nas reações para análise de RT-qPCR, as amostras foram submetidas à incubação inicial no termociclador Applied 7500 (Applied Biosystems) de 1 ciclo de 50°C por 2 minutos seguidos por 1 ciclo de 95°C por 10 minutos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minutos.

Os resultados da RT-qPCR foram analisados com auxílio do programa Applied 7500 software versão 2.0.1. As massas dos produtos amplificadas de cada gene foram determinadas através da interpolação dos resultados dos pontos experimentais com dados gerados pela curva padrão. Os dados de massa de cada ponto experimental, nas suas diferentes condições, foram normalizados com a massa obtida do gene GADPH (gene constitutivo). A seguir, para calcular a diferença de expressão, dividiu-se a massa normalizada do gene alvo dos grupos tratados pela massa normalizada do gene alvo do grupo controle. Cada indivíduo do grupo controle teve sua expressão determinada pela razão entre o valor de cada indivíduo com a média desse grupo a fim de determinar as variações individuais dentro do grupo controle. As determinações para os cálculos do RT-qPCR estão disponíveis em [Livak e Schmittgen,

2008].

Os dados obtidos pelo programa Applied 7500 software, versão 2.0.1, foram transpostos para o programa Excel 2000 (Microsoft), para realização dos cálculos. Os gráficos foram obtidos através do programa GraphPad Prism 5.03 (La Jolla, CA, USA).

3.5.2 Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA

Os métodos imunoenzimáticos envolvem o uso de anticorpos, componentes chaves de todos os imunoenaios, sendo caracterizados por sítios de reconhecimento, presentes nas suas estruturas, que possibilitam interações altamente específicas com os antígenos. As técnicas imunohistoquímicas foram desenvolvidas como métodos de análise de macromoléculas (enzimas, hormônios), e posteriormente para moléculas pequenas (drogas, fármacos), tendo seu maior êxito no campo da química clínica.

3.5.2.1 Coleta das amostras

As amostras de sangue foram coletadas por punção do átrio, após a abertura da caixa torácica do animal, com seringa de 3,0 mL, contendo anticoagulante citrato de sódio 0,1 M, na proporção de 1:10 de sangue coletado. O sangue coletado foi transferido para tubo de ensaio e centrifugado por 10 min, 2000 xg. O plasma coletado foi dividido em alíquotas de 200 µl, congelado em nitrogênio líquido, e posteriormente armazenado em freezer -70°C, até o momento de sua utilização.

3.5.2.2 Procedimento para realização do kit ELISA

A dosagem do biomarcador BNP foi realizada através do kit de ELISA comercializado pela empresa Abcam® (Cambridge, UK). Para a quantificação do BNP foi utilizado o kit BNP 45 *Rat* (ab108816), tipo sanduíche, de alta sensibilidade.

Os padrões de concentração e as amostras do plasma foram pipetadas na microplaca, composta por 96 poços, que é revestida com o anticorpo policlonal para o BNP. O anticorpo presente na microplaca, eventualmente, irá aprisionar as moléculas de BNP tanto nas amostras como na curva-padrão. Após uma sequência de lavagens, para retirar as substâncias não ligadas, anticorpos policlonais conjugados as enzimas peroxidase são adicionados à placa e se ligam as moléculas do BNP. Mais uma sequência de lavagens é realizada, para remover qualquer ligação antígeno-anticorpo inespecífica. Em seguida, o substrato da enzima e seu respectivo cromógeno são aplicados, e as enzimas conjugadas presentes em cada amostra e nos padrões de concentração reagem com seus substratos, cujo produto de reação, uma vez formado, reage com o cromógeno promovendo o aparecimento da cor, cuja intensidade é diretamente proporcional a atividade enzimática, e conseqüentemente, à concentração do BNP nas amostras. Ao final do ensaio a reação enzimática é inibida com a adição de uma solução ácida e é então realizada a mensuração da densidade óptica (450 nm) de cada um dos 96 poços da microplaca, através de um Leitor Universal de Microplacas (Bio Tek modelo ELX 800, EUA).

A concentração do BNP é determinada fazendo a correlação do valor de densidade óptica das amostras com o valor de densidade óptica da curva-padrão, gerada através do ajuste logístico de 4 parâmetros, e com auxílio de um programa de análise de dados adequado (KC Junior, Bio Tek, USA) sendo a sensibilidade do kit de 30 pg/mL e a reprodutibilidade intra-ensaio de 4,6%.

Para a análise estatística e construção dos gráficos os dados obtidos pelo programa KC Junior, Bio TeK-USA foram transpostos para o programa GraphPad Prism 5.03 (La Jolla, CA, USA).

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos pelo ensaio ELISA e pela técnica de RT-qPCR foram representadas por médias e erro padrão da média (SEM). As comparações entre os grupos foram efetuadas pela análise de variância (ANOVA) one-way e pós-teste Tukey. Diferença significativa com um $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise imunohistoquímica anti-BNP no ventrículo esquerdo de ratas *Wistar*:

Após a coleta das amostras foi realizado a IHQ com a finalidade de avaliar a presença do BNP no VE dos animais. As imagens capturadas por fotomicrografia estão dispostas na figura 6, onde estão apresentadas as imagens referentes aos grupos controle, controle positivo (realizado com tecido cerebral do animal), TC+IR e IR.

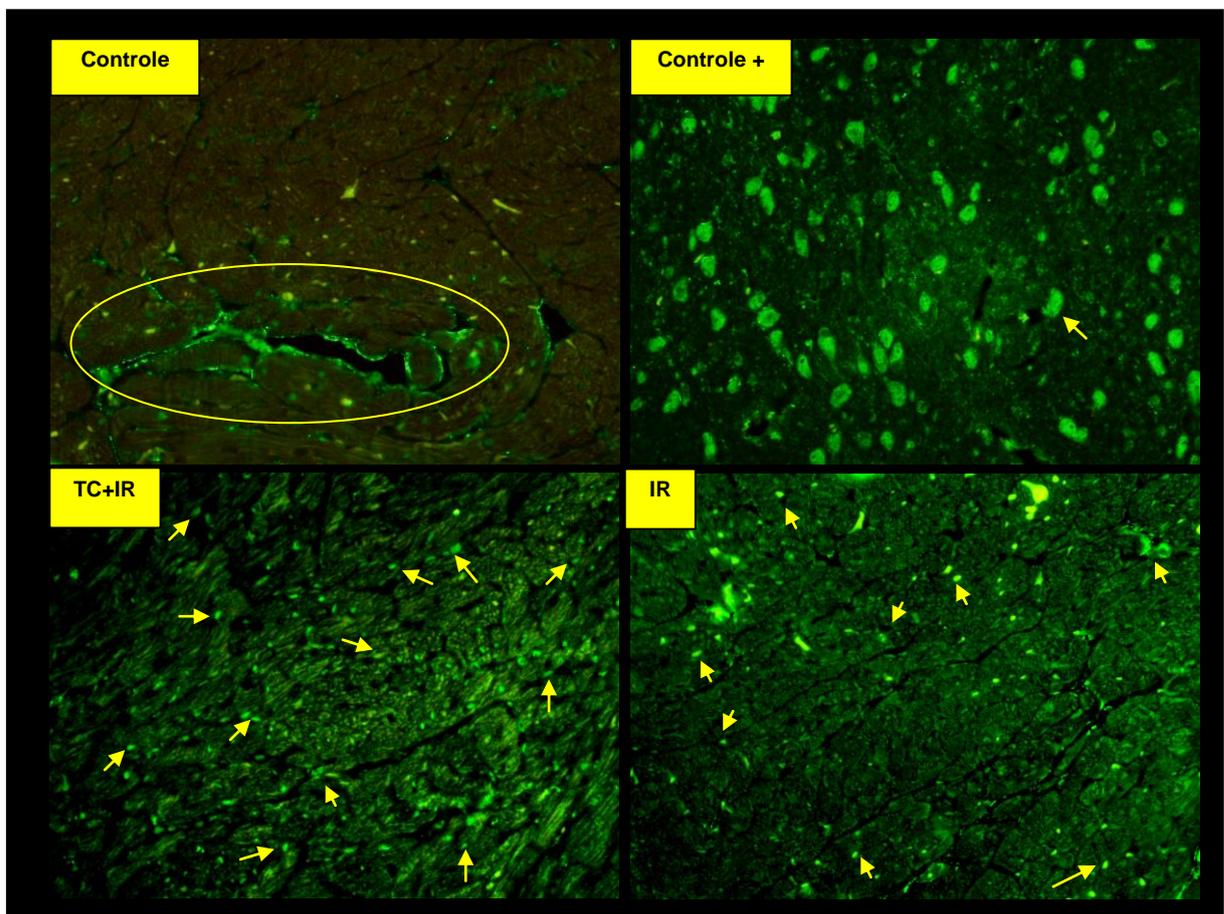


Figura 5: Fotomicrografia de IHQ anti-BNP, indicado por setas, no VE (controle, TC+IR e IR) e cérebro (controle positivo) de ratas *Wistar* de 2 meses após ter finalizado o tratamento.

O grupo controle apresenta expressão da marcação apenas na região de vasos. Porém, nos grupos TC+IR e IR, essa marcação não é visualizada. Nesses grupos a sinalização é dispersa e se apresenta de forma difusa, ao longo de todo o VE. Através de uma avaliação

qualitativa, o grupo TC+IR foi o grupo que apresentou uma marcação de BNP mais difusa.

4.2 Análise do plasma sanguíneo por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA*

As médias da concentração plasmática de BNP, quantificadas por ELISA, dos grupos controle, TC+IR e IR estão apresentadas na tabela 3. Embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos, nota-se uma tendência de aumento na concentração plasmática de BNP no grupo TC+IR em relação ao controle.

Tabela 3: Média das concentrações plasmáticas de BNP

Grupos	Concentração plasmática de BNP (ng/mL)
Controle	0,095 ± 0,011
TC+IR	0,175 ± 0,033
IR	0,067 ± 0,007

Média das amostras plasmáticas de BNP ± erro padrão da média (SEM) das amostras. n=7.

4.3. Quantificação da expressão gênica por RT-PCR

O resultado da expressão do BNP por RT-qPCR (figura 6) apresenta um perfil similar ao obtido pelo ELISA. O grupo TC+IR é o que apresenta um maior nível de expressão gênica BNP, porém, a diferença em relação ao controle não é significativa.

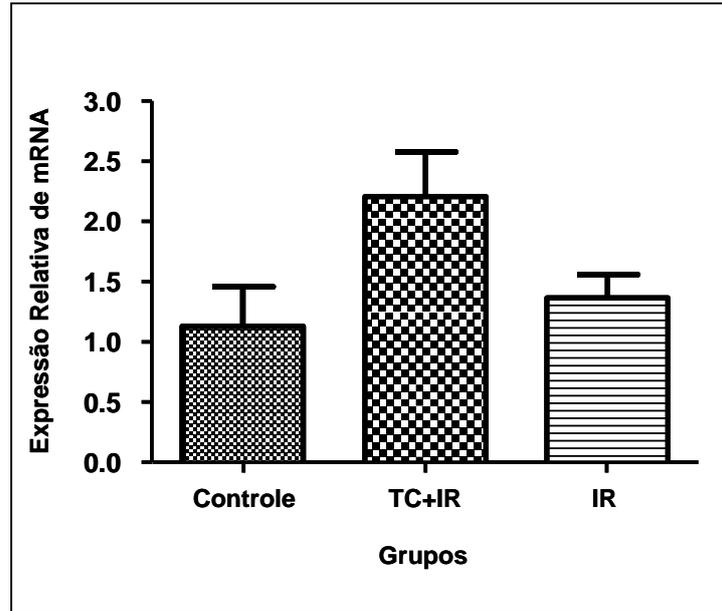


Figura 6: Expressão relativa de mRNA de BNP nos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro na figura apresentam o erro padrão da média (SEM).

Outras proteínas, como IL-6, TGF- β 1 e procolágeno tipo I, também foram avaliadas quanto a sua expressão, uma vez que estão relacionadas com a síntese de BNP, mediante as vias de sinalização do processo inflamatório, proliferação celular ou remodelamento tecidual. Os histogramas da expressão relativa de mRNA dos genes IL-6, TGF- β 1 e procolágeno tipo I, estão, respectivamente, nas figuras 7, 8 e 9.

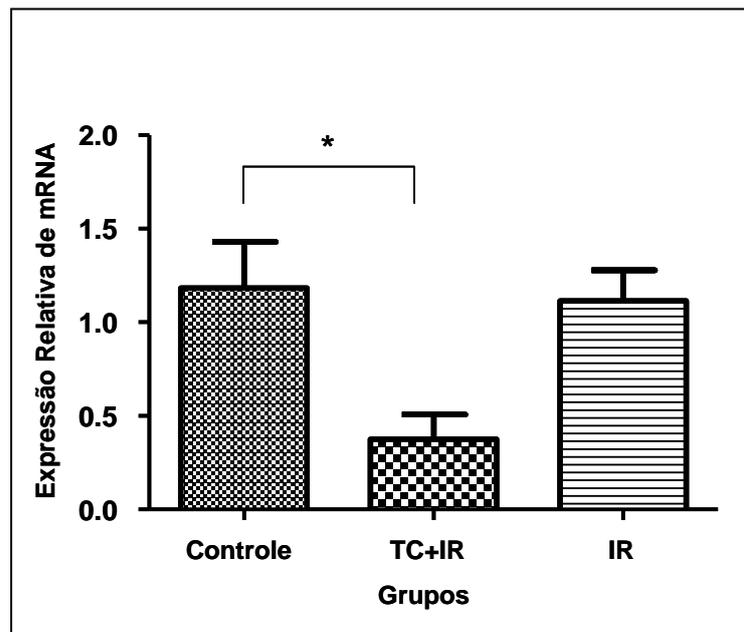


Figura 7: Expressão relativa de mRNA de IL-6 nos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro da figura representam o erro padrão da média (SEM). * $p < 0,05$.

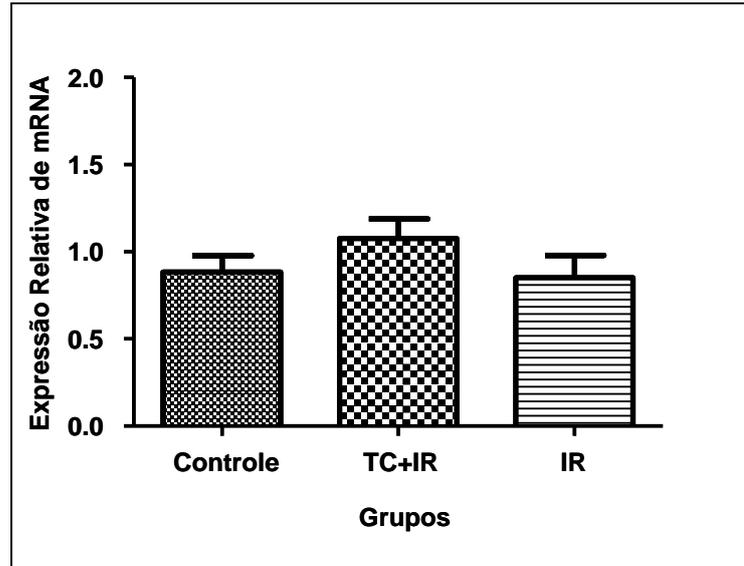


Figura 8: Expressão relativa de mRNA de TGF- β 1 nos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro da figura representam o erro padrão da média (SEM).

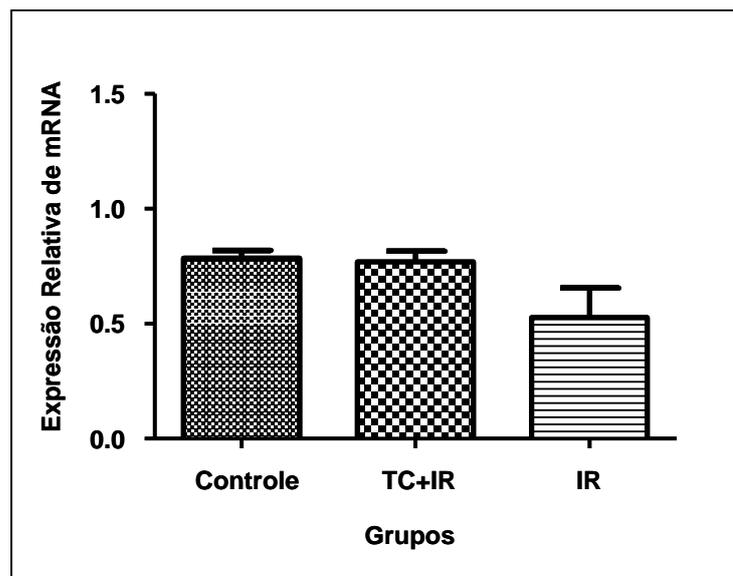


Figura 9: Expressão relativa de mRNA de procolágeno tipo I nos grupos controle, TC+IR e IR. As barras de erro da figura representam o erro padrão da média (SEM).

O único grupo que obteve resultado com diferença significativa em relação ao controle foi o grupo TC+IR na análise da expressão da IL-6, sendo a sua expressão menor do que a do controle. Todos os demais apresentaram uma expressão similar ao controle.

5 DISCUSSÃO

Os avanços da terapia oncológica conduziram uma melhora na sobrevida dos pacientes, o que possibilitou a constatação de manifestações de doenças cardiovasculares decorrentes do tratamento (Yeh e Bickford, 2009; D'Errico et al., 2012). A percepção de que efeitos adversos das terapias contra o câncer poderiam desencadear disfunção cardíaca propiciou o reconhecimento da necessidade de implantar protocolos de identificação precoce de risco de desenvolver essa enfermidade (Dietz, 2003; Perik et al., 2005; Dolci et al., 2008). A vantagem da identificação precoce é a possibilidade de intervenção médica que interrompe a manifestação da doença cardiovascular, preservando o coração e reduzindo os índices de morbimortalidade consequentes da exposição ao tratamento (Menon et al., 2009; Kalil et al., 2011). Apesar de já ser utilizado como ferramenta de diagnóstico na área clínica (Yoshimura et al., 2001; Palazzuoli et al., 2010), o BNP é um dos biomarcadores cardioespecíficos que está sendo avaliado para ser utilizado como preditor de disfunção cardíaca promovida pela terapêutica oncológica (Cardinale e Sandre, 2010; Bovelli e Roila, 2010; Ewer e Ewer, 2010; Chargari et al., 2011).

Pelos resultados obtidos neste estudo, no intervalo de tempo avaliado, o BNP não se apresentou como um bom biomarcador preditor de lesão cardíaca induzida pela terapêutica oncológica, uma vez que, para desempenhar esta função, deveria apresentar uma alteração mais significativa no nível de sua expressão. Resultados obtidos por Jingu e colaboradores em 2007 sugerem que a concentração plasmática de BNP pode ser um bom preditor de dano induzido pela técnica terapêutica de radioterapia, porém apenas foi observado alteração significativa da concentração plasmática de BNP a partir do 3º mês, após o tratamento.

Estudos sugerem que a exposição do paciente às técnicas terapêuticas contra o câncer, principalmente quimio e radioterapia, induzem danos que tendem a ser progressivos e podem desencadear disfunção cardíaca assintomática ou sintomática, depois de alguns anos do tempo do tratamento (Chargari et al., 2010; Crippa et al., 2002; Crown et al., 2004; Cardinale et al., 2004; Kruse et al., 2002). O padrão atual de detecção de cardiotoxicidade e monitoração da função cardíaca apenas possui a capacidade de detectar alterações quando um comprometimento funcional já tenha ocorrido (Cardinale e Sandri, 2010; Kalil et al., 2010; Cardinale et al., 2000). A dosagem de BNP pode ser utilizada na identificação de pacientes que necessitem de acompanhamento cardiológico, visto que estudos relatam a associação do aumento do nível de BNP com o potencial cardiotoxíco da terapia oncológica (Perik et al.,

2005; Jingu et al., 2007; Krawczuk-Rybak et AL., 2011; Daugaard et al., 2005).

Os mecanismos que estimulam a expressão e liberação de BNP podem ser decorrentes da sobrecarga hemodinâmica (Ramos et al., 2006; Samesina & Amoedo), do uso de quimioterápicos cardiotoxicos como as antraciclinas (Daugaard et al., 2005; Pichon et al., 2005), da isquemia miocárdica (Goetze et al., 2003; Haaff et al., 2011) e da exposição à radiação ionizante (D'Errico et al., 2012). Todavia, a alteração da exposição de BNP quanto à exposição com cilofosfamida e docetaxel não está clara.

Não se observou nenhuma alteração significativa na comparação dos grupos tratados em relação ao controle, na análise realizada pelo ELISA; porém, observa-se uma tendência no aumento da concentração plasmática do BNP no grupo TC+IR. Sabe-se que as lesões cardíacas induzidas por estes tratamentos são progressivas (Eidem, 2008; Floyd et al., 2005; Gallucci et al., 2011) e a tendência de aumento do nível plasmático apresentada pelo grupo TC+IR, 2 meses depois de ter finalizado o tratamento, pode ser interpretada como uma elevação decorrente ainda da fase de adaptação do coração, na tentativa de reverter os danos causados. Caso a capacidade de adaptação do tecido cardíaco seja ultrapassada, terão início as alterações denominadas como irreversíveis, que conduzirão à insuficiência (Samesina & Amoedo, 2001; Agrawal et al., 2010).

Após o resultado obtido pelo ensaio ELISA, foram necessários mais experimentos que pudessem esclarecer a resposta do BNP ao tratamento neste período. Para tal, realizaram-se ensaios de IHQ, nas quais o propósito foi verificar a marcação do BNP no VE dos animais, através de uma avaliação qualitativa. Os resultados obtidos em animais tratados (TC+IR) demonstraram marcação de maneira mais difusa do que a obtida no controle, que é mais pontual. A marcação anti-BNP no VE dos animais parece ser mais evidente no grupo TC+IR, provavelmente devido a este grupo ter sido submetido a dois tratamentos potencialmente cardiotoxicos (Yeh et al., 2009; Kalil et al., 2011; Seemann et al., 2012).

Complementando este ensaio, foi realizada uma avaliação quantitativa de RT-qPCR, pois, pelo RT-qPCR poderíamos não só quantificar esta expressão, mas também de outros genes que estão relacionados a sua expressão, para obter mais informações que pudessem auxiliar na interpretação de sua resposta ao tratamento neste período.

A análise do resultado por RT-qPCR sugere que a expressão do BNP está de acordo com os resultados obtidos pelo ensaio ELISA. Ambos apresentaram perfis semelhantes. A semelhança dos resultados entre o nível de expressão gênica e o nível da concentração plasmática de BNP estão de acordo com dados da literatura onde é mencionado que o BNP não é armazenado em grânulos nos ventrículos, sendo liberado mediante a sua transcrição e

síntese (Sullivan et al., 2005; Ogawa et al., 2001).

Na maioria dos casos, o aumento do nível de BNP está sendo relacionado ao desencadeamento de uma série de cascatas de eventos bioquímicos, que, através de modificações nos mecanismos de transdução celular determinam a formação de um tecido cardíaco com proporcionalidades de fibras diferentes do tecido normal, com relação a fibras elásticas, fibras colágenas e células musculares cardíacas. Entre eles, o BNP está associado ao TGF- β 1 e procolágeno tipo I, devido a sua ação anti-proliferativa (Ogawa et al., 2001; Samesina e Amoedo, 2001; Ramos et al., 2006); e ao IL-6, por suas propriedades anti-inflamatórias (Ogawa et al., 2004; Masters et al., 1999; Jarai et al., 2009; Tanaka et al., 2004; Gwechenberger et al., 2003).

Dados demonstraram que o TGF- β 1 está presente no sítio de lesões teciduais e age promovendo a proliferação de fibroblastos, aumentando a síntese de componentes da matriz extracelular (colágeno, fibronectina e proteoglicanas) e inibindo os processos que levam à degradação da matriz extracelular (Sime e O'Reilly, 2001). O colágeno tipo I, formado a partir da clivagem do procolágeno tipo I, representa 80% do colágeno presente na matriz extracelular do tecido cardíaco (Lijnen et al., 2000).

O desenvolvimento do tecido fibrótico no coração não, necessariamente, substituirá as células parenquimais. Têm-se descrito, na literatura, sobre dois tipos de resposta fibrótica, uma reativa e outra reparativa. A fibrose reparativa é a que está relacionada com a perda de células parenquimais e seu preenchimento pela fibrose, na tentativa de manter a estrutura do tecido cardíaco. A fibrose reativa, por sua vez, tem sido referida como o espessamento de fibras de colágeno preexistentes e aumento de fibras entre miócitos viáveis (Lijnen et al., 2000).

A expressão relativa do mRNA dos genes do TGF- β 1 e procolágeno tipo I não apresentaram alterações nos resultados da RT-qPCR em relação ao controle. Acredita-se que, nesse período, o coração ainda se encontre em adaptação aos danos induzidos. A tendência de aumento observada no nível de expressão de BNP no grupo TC+IR pode ter influenciado na manutenção da expressão de TGF- β 1 e procolágeno I em nível basal. Em estudos realizados anteriormente pela nossa equipe, foram detectadas alterações significativas de TGF- β 1 e procolágeno tipo I do intervalo de 4 meses depois do término do tratamento (Ferreira-Machado et al., 2010). Além de que, o mesmo modelo experimental foi utilizado pela equipe para analisar alterações da fisiologia cardíaca provocadas pela terapêutica contra o câncer, onde foram encontradas alterações significativas após 5 meses do fim do tratamento, o que valida o modelo experimental utilizado (Salata et al., 2012).

A inflamação crônica pode ser induzida por vários estímulos, incluindo agentes químicos, radiação e injúrias mecânicas, e a IL-6 é uma das citocinas pró-inflamatórias amplamente expressas nesse processo (Wynn, 2008). Quando comparamos o nível de expressão da IL-6, o grupo TC+IR apresenta diminuição significativa de sua expressão em relação ao controle.

Existem vários trabalhos que relacionam processo inflamatório à produção de hormônios cardíacos (BNP) tanto pelos cardiomiócitos (Ma et al., 2004; Ogawa et al., 2004; Meirovich et al., 2008) quanto pelos fibroblastos (Jarai et al., 2009). Além disso, já existem trabalhos que testam a infusão de BNP como método de tratamento contra insuficiência cardíaca, e os resultados obtidos mostram que o BNP apresenta efeito similar a do enalapril, reduzindo os níveis de citocinas inflamatórias, incluindo o IL-6 (Pan et al., 2011). O mesmo parece ocorrer quando comparamos os resultados obtidos da expressão relativa dos genes BNP e IL-6 no grupo TC+IR, onde o nível de expressão do BNP parece estar aumentando e o nível de expressão do IL-6 pode estar sendo inibido por esse aumento.

6 CONCLUSÃO:

Os resultados obtidos sugerem uma tendência de aumento do nível de BNP plasmático e cardíaco no período de tempo avaliado. Concomitantemente a este resultado, observou-se uma diminuição significativa na expressão gênica da citocina pró-inflamatória IL-6. Dessa forma, sugere-se que na fase inicial da cardiotoxicidade induzida por tratamentos quimio e radioterápicos o BNP possa desempenhar papel anti-inflamatório. Entretanto, estudos adicionais são necessários para se avaliar estes parâmetros em tempos diferentes após os tratamentos aqui avaliados.

Sugere-se que seja implantado em hospitais universitários e/ou no INCA a monitoração com biomarcadores encontrados no plasma sanguíneo e avaliação por exames de imagem dos pacientes do sistema único de saúde, tanto antes como durante e após serem submetidos a terapêutica contra o câncer. Pois dessa forma, poderia ser desenvolvido uma pesquisa epidemiológica que possibilitaria uma análise mais abrangente se estes biomarcadores, como a troponina I e T, BNP e ANP poderiam complementar a monitoração dos pacientes e realmente prever o desenvolvimento de insuficiência cardíaca.

REFERÊNCIA

- Affonso Júnior, RJ, Oshima CTF, Kimura ET, Silva MRR, Egami MI, Segreto RA, Segreto, HRC. Expressão da Proteína TGF β 1 em Coração Irradiado in Vivo. *Radiol Brás.* 2004: 37.
- Agrawal R, Agrawal N, Koyani C, Singh R. Molecular Targets and Regulators of Cardiac Hypertrophy. *Pharmacology Research.* 2010:61, 269-280.
- Almeida VL, Leitão A, Regina LCB, Montanari CA, Donnici CL. Câncer e Agentes Neoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos Que Interagem Com o DNA: Uma introdução. *Química Nova.* 2005:28(1),118-129.
- Amado F, Lourenço, MTC, Deheinzelin D. Metastatic Breast Cancer: Do Current Treatments Improve Quality of Life? A prospective Study. *Sao Paulo Med J.* 2006:124(4),203-7.
- Auner HW, Tinchon C, Linkesch W, Tiran A, Quehenberger F, Link H, et al. Prolonged Monitoring of Troponin T for the Detection of Anthracycline Cardiotoxicity in Adults with Hematological Malignancies. *Ann Hematol.* 2003:82(4),218-22.
- Brandão AA, Rodrigues CI, Consolim-Colombo F, Plavnik FL, Malachias MV, Kohlmann O Jr., et al./Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão, Sociedade Brasileira de Nefrologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq. Bras. Cardiologia.* 2010:95(1),1-51.
- Bartelink H. Radiotherapy to the Conserved Breast, Chest Wall, and Regional Nodes: is There a Standard? *Breast.* 2003:12(6),475-82.
- Basaravaju SR, Easterly CE. Pathophysiological Effects of Radiation on Atherosclerosis Development and Progression, and the Incidence of Cardiovascular Complications. *Med Phys.* 2002:29(10), 2391-403.
- Berberich W, Schnabel K, Berg D, Lamprecht E. Boost Irradiation of Breast Carcinoma: Teletherapy vs. Brachytherapy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001:94(2),276-82.
- de Bold AJ, Kenneth KYM, Zhang Y, de Bold MLK, Bensimon M, Khoshbaten A. The Physiological and Pathophysiological Modulation of the Endocrine Function of the Heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001:79,705-714.
- Boughey JC, Buzdar AU, Hunt KK. Recent Advances in the Hormonal Treatment of Breast Cancer. *Curr Probl Surg.* 2008:45(1),13-55.
- Bovelli DGP, Roila F. Cardiotoxicity of Chemotherapeutic Agents and Radiotherapy-Related Heart Disease: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology.* 2010:21(5),277-282.
- Branton MH, Koop JB. TGF-beta and Fibrosis. *Microbes Infect.* 1999:1(15),1349-65.

Bruggink AH, Jonge N, van Oosterhout MFM, Wichen DFV, Koning E, et al. Brain Natriuretic Peptide is Produced Both by Cardiomyocytes and Cells Infiltrating the Heart in Patients with Severe Heart Failure Supported by a left Ventricular Assist Device. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2006;25(2),174-180.

Bujak M, Frangogiannis NG. The Role of TGF-beta Signaling in Myocardial Infarction and Cardiac Remodeling. *Cardiovasc Res*. 2007;1;74(2),184-95.

Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, Tricca A, Civelli M, Lamantia G, et al. Left Ventricular Dysfunction Predicted by Early Troponin I Release After High-dose Chemotherapy. *Journal Am. Coll. Cardiology*. 2000;36(2),517-22.

Cardinale D, Sandri MT, Martinoni A, Borghini E, Civelli M, Lamantia G, et al. Myocardial Injury Revealed by Plasma Troponin I in Breast Cancer Treated with High-dose Chemotherapy. *Ann. Oncology*. 2002;13(5),710-5.

Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo M, Boeri M, Lamantia G, et al. Prognostic Value of Troponin I in Cardiac Risk Stratification of Cancer Patients Undergoing High-dose Chemotherapy. *Circulation*. 2004;109(22),2749-54.

Cardinale D, Sandri MT. Role of Biomarkers in Chemotherapy Induced Cardiotoxicity. *Progress in Cardiovascular Disease*. 2010;53(2),121-9.

Cardinale D, Colombo A, Torrisi R, Sandri MT, Civelli M, Salvatia M, et al. Trastuzumab-induced Cardiotoxicity: Clinical and Prognostic Implications of Troponin I Evaluation. *Journal Clin. Oncology*. 2010;28(25),3910-6.

Casals G, Ros J, Sionis A, Davidson MM, Morales-Ruiz M, Jiménez W. Hypoxia Induces B-Type Natriuretic Peptide Release in Cell Lines Derived from Human Cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297,550-555.

Chabner BA, Amrein PC, Druker BJ, Michaelson MD, Mitsiades CS, Goss PE, Ryan DP, Ramachandra S, et al. *Qumioterapia das Doenças Neoplásicas*. In GOODMAN & GILMAN (Ed.). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill. Seção 9. p.1185-1252, 2006.

Chargari C, Kirov KM, Bollet MA, Magné N, Védrine L, Cremades S, Beuzeboc P, Fourquet A, Kirova YM. Cardiac Toxicity in Breast Cancer Patients: From a Fractional Point of View to a Global Assessment. *Cancer Treatment Reviews*. 2010.

Cohen SI, Bharati S, Glass J, Lev M. Radiotherapy as a Cause of Complete Atrioventricular Block in Hodgkin's Disease an Electrophysical-pathological Correlation. *Arch. Intern. Med*. 1981;141(5),676-9.

Costa DV. *Possível Papel dos Peptídeos Natriuréticos na Excreção Renal de Sódio Através da Modulação da Atividade da Na⁺-APTase*. Dissertação de Mestrado – UFRJ, 2007.

Crippa CG, d'Acampora AJ, Araújo EJ, Marasciulo AC, Hallal ALC, Gondin G. Breast Cancer in Young Women: a Study on the Probability of Disease-free Survival. *Revista Brasileira de Mastologia*. 23 Vol. 12 – nº 4, 2002.

Cutuli B. Strategies in Treating Male Breast Cancer. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8(2),193-202.

Crown J, O'Leary M, Ooi Wei-Seong. Docetaxel and Paclitaxel in the Treatment of Breast Cancer: A Review of Clinical Experience. *The Oncologist*. 2004;9(2),24-32.

Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer Stem Cells: Models and Concepts. *Annu. Rev. Med*. 2007;58,267-84.

Daugaard G, Lassen U, Bie P, Pedersen EB, Jesen KT, Abildgaard U, Hesse B et al. Natriuretic Peptide in the Monitoring of Anthracycline Induced Reduction in Left Ventricular Ejection Fraction. *The European Journal of Heart Failure*. 2005;7,87-93.

D'Errico MP, Grimaldi L, Petruzzelli MF, Giancolo EAL, Tramacere F, Monetti A, Placella R et al. N-terminal Pro-B-type Natriuretic Peptide Plasma Levels as a Potential Biomarker for Cardiac Damage After Radiotherapy in Patients With Left-Side Breast Cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol Phys*. 2012;82(2), e-239-46.

Dietz BKGH. Late-onset Cardiotoxicity of Chemotherapy and Radiotherapy. *The Journal of Medicine*. 2003;61(6),228-231.

Dodos F, Halbsguth T, Erdmann E et al. Usefulness of Myocardial Performance Index and Biochemical Markers for Early Detection of Anthracycline-induced Cardiotoxicity in Adults. *Clin. Res. Cardiol*. 2008;97,318-326.

Dolci A, Dominici R, Cardinale D, Sandri MT, Panteghini M. Biochemical Markers for Prediction of Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity. Systematic Review of the Literature and Recommendations for Use. *Am J Clin Pathol*. 2008;130,688-695.

Eidem BW. Identification of Anthracycline Cardiotoxicity: Left Ventricular Ejection Fraction is not Enough. *Journal Am. Echocardiogr*. 2008;21(12),1290-2.

Ewer MS, Ewer SM. Cardiotoxicity of Anticancer Treatments: What's the Cardiologist Needs to Know. *Nat. Rev. Cardiology*. 2010;7(10),564-75.

Ewertz M, Jensen AB, Late Effects of Breast Cancer Treatment and Potentials for Rehabilitation. *Acta Oncol*. 2011;50(2),187-93.

FDA (2010) Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers [Homepage na Internet]. EUA. United State Food and Drug Administration [acesso em 2010 Sept 12]. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/cber/gdlns/dose.htm>>

FDA (2005) Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers [Homepage na Internet]. EUA. United State Food and Drug Administration [acesso em 2010 Sept 12]. Disponível em:
<<http://www.fda.gov/download/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm078932.pdf>>

Ferreira-Machado, SC. Efeito da Radiação Ionizante no Coração de Ratos Wistar. Tese de Doutorado- UFRJ, 2008.

Ferreira-Machado SC, Rocha NN, Mencalha AL, Melo LDB, Salata C, Ribeiro AF, Torres TS, Mandarim-de-Lacerda CA et al. Up-regulation of Angiotensin-converting Enzyme and Angiotensin II type 1 Receptor in Irradiated Rats. *Int. Journal Radiat. Biol.* 2010;10 (Oct),880-887.

Floyd DJ, Nguyen DT, Lobins RL, Bashir Q, Doll DC, Perry MC. Cardiotoxicity of Cancer Therapy. *Journal Clin. Oncology.* 2005;23(30),7685-96.

Franchini KG. Hipertrofia Cardíaca: Mecanismos Moleculares. *Revista Bras. Hipertens.* 2011;8(1): Janeiro/Março.

Freitas AG, Kemp C, Louveira MH, Fujiwara SM, Campos L F de et al. Mamografia Digital: Perspectiva Atual e Aplicações Futuras. *Radiol Brás.* vol.39, no.4, p.287-296, 2006.

Gallucci G, Cocco M, Storto G, Lapadula L, Tartarone A, Nappi A, et al. The Clinical Impact of a Cardiac Follow-up in Breast Cancer Survivors: An Observation Study. *International Journal Immunopathol. Pharmacol.* 2011;23(4),1221-7.

Ganz PA, Desmond KA, Leedham B, Rowland JH, Meyerowitz BE, Belin TR. Quality of Life in Long Term, Disease-free Survivors of Breast Cancer: a Follow-up Study. *Journal Natl. Cancer Inst.* 2002;94(1),39-49.

Gatenby RA, Gillies RJ. A Microenvironmental Model of Carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 2008;8(1),56-61.

Gaya AM, Ashford RF. Cardiac Complications of Radiation Therapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2005;17(3),153-9.

Germanakis I, Anagnostatou N, Kalmanti M. Troponins and Natriuretic Peptides in Monitoring of Anthracycline Cardiotoxicity. *Pediatr. Blood Cancer.* 2008;51(3),327-33.

Giordano SH, Kuo YF, Freeman JL, Buchholz TA, Hortobagyi GN, Goodwin JS. Risk of Cardiac Death After Adjuvant Radiotherapy for Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005;16;97(6),419- 24.

Godinho, ER; Kock, HA. Rastreamento do Câncer de Mama: Aspectos Relacionados ao Médico. *Radiol Brás.* 2004;37 (2),91-99.

Goetze JP, Christoffersen C, Perko M, Arendrup H, Rehfeld JF, Kastrup J. Increase Cardiac BNP Expression Associated With Myocardial Ischemia. *The FASEB Journal* artigo expresso on line 10.1096/fj.02-0796fje. Abril, 2003.

Gomes MAM, Neto NCM, Bispo IGA. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. *Ver SOCERJ.* 2009;22(6), 398-403.

Gottdiener JS, Katin MJ, Borer JS, Bacharach SL, Green MV. Late Cardiac Effects of Therapeutic Mediastinal Irradiation. Assessment by Echocardiography and Radionuclide Angiography. *N. Engl. Journal Med.* 1983;10;308(10),569-72.

Guerra MR, Gallo CVM, Azevedo G, Medonça S. Risco de Câncer no Brasil: Tendência e Estudos Epidemiológicos Mais Recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2005;51(3),227-234.

Guglin M, Aljayeh M, Saiyad S, Ali R, Curtis AB. Introducing a New Entity: Chemotherapy-induced Arrhythmia. *Europace.* 2009;11(12),1579-86.

Guo Z, Liao Y, Cheng X, Li B, Liu Y, Ge H, Zhang L, Wang M, Guo H. The Dynamic Change of TGF-beta1 in the Myocardial Remodeling of Rat After Myocardial Infarction. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2006;26(4),417-20.

Gustavsson A, Eskilsson J, Landberg T, Svahn-Tapper G, White T, Wollmer P, Akerman M. Late Cardiac Effects After Mantle Radiotherapy in Patients with Hodgkin's Disease. *Ann Oncology.* 1990;1(5),355-63.

Gwechenberger M, Hülsmann M, Berger R, Graf S, Springer C, Stanek B, Pacher R. Interleukin-6 and B-type Natriuretic Peptide Are Independent Predictors for Worsening of Heart Failure in Patients With Progressive Congestive Heart Failure. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2003;23(7).

Haaf P, Reichlin T, Corson N, Twerenbold R, Reiter M, Steuer S, Bassetti S et al. B-type Natriuretic Peptide in the Early Diagnosis and Risk Stratification of Acute Chest Pain. *Clinical Research Study.* 2011;124, 444-452.

INCA. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer. [homepage na internet] Estimativa/2012. Acesso em 2012 Aug 08. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>.(a)

INCA. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer [homepage na internet] Conteúdo. Radioterapia. Acesso em 2012 July 11. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/conteudoview.asp?id=100>>.(b)

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil). Ações de Enfermagem para o Controle do Câncer: uma Proposta de Integração Ensino - serviço. 2.ed. - Rio de Janeiro: INCA, 2002.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Cardio-Oncologia: A Nova Era da Medicina Voltada a Interação entre Duas Doenças Frequentes – Tratar o Câncer e Preservar o Coração. Rio de Janeiro: Rede Câncer, Set. 2012, . 12-15.

Jarai R, Kaun C, Weiss TW, Speild WS, Rychli K, Maurer G, Huber K, Wojta J. Human Cardiac Fibroblast Express B-type Natriuretic Peptide Fluvastatin Ameliorates its Up-regulation by Interleukin-1 α , Tumor Necrosis Factor- α and Transforming Growth Factor- β . *J. Cell Mol. Med.* 2009;13(11-12), 4415-21.

- Jingu K, Nemoto K, Kaneta T, Oikama M, Ogawa Y, Aringa H, Takeda K et al. Temporal Change in Brain Natriuretic Peptide After Radiotherapy for Thoracic Esophageal Cancer. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2007;69(5), 1417-23.
- Jones, SE., Savin MA, Holmes FA, O'Shaughnessy JA, Blum JL, Vukelja s. Phase III Trial Comparing Doxorubicin Plus Cyclophosphamide With Docetaxel Plus Cyclophosphamide As Adjuvant Therapy for Operable Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2006;24(34),5381-5387.
- Kalil Filho R, Hajjar LA, Bacal F, Hoff PM, Diz M del P, Galas FRBG, et al. I Diretriz Brasileira de Cardio-Oncologia da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Brás. Cardiologia.* 2011;96(2/1),1-52.
- Kamila C, Jenny B, Per H, Jonas B. How to Treat Male Breast Cancer. *Breast.* 2007;16 Suppl 2:S147-54.
- Krawczuk-Rybak M, Dakowics L, Hrymewicz A, Maksymiuk A, Zelazowska-Rutkowska B, Wysocka J. Cardiac Function in Survivors of Acute Lymphoblastic Leukaemia and Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Paediatrics and Child Health.* 2011;47, 455-59.
- Katzung BB. *Farmacologia Básica Clínica*, 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. p.579.
- Kruse JJ, Bart CI, Visser A, Wondergem J. Changes in Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Procollagen Type I mRNA in the Rat Heart After Irradiation. *International Journal Radiat. Biol.* 1999;75(11),1429-36.
- Krüse JJ, Zurcher C, Strootman EG, Bart CI, Schlagwein N, Leer JW, Wondergem J. Structural Changes in the Auricles of the Rat Heart After Local Ionizing Irradiation. *Radiother Oncol.* 2001;58(3),303-11.
- Kruse JJ, Strootman EG, Bart CI, Visser A, Leer JWH, Wondergem J. Radiation-induced Changes in Gene Expression and Distribution of Atrial Natriuretic Peptide (ANP) in Different Anatomical Regions of the Rat Heart. *Int J Radiat Biol.* 2002;78(4),297-304.
- Kuwahara K, Nakao K. Regulation and Significance of Atrial and Brain Natriuretic Peptides as Cardiac Hormones. *Endocrinal Journal.* 2010;57(7), 555-65.
- Kuwahara K, Kinoshita H, Kuwabara Y, Nakagawa Y, Usami U, Minami T, Yamada Y, Fujiwara M, Nakao K. Myocardin-Related Transcription Factor A is a Common Mediator of Mechanical Stress – and Neurohumoral Stimulation-Induced Cardiac Hypertrophic Signaling Leading to Activation of Brain Natriuretic Peptide Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology.* Set 2010, p. 4131-4148.
- Leinung S, Horn LC, Backe J. Male breast Cancer: History, Epidemiology, Genetic and Histopathology. *Zentralbl Chir.* 2007;132(5),379-85.
- Lenihan D, Massey MR, Baysinger KB. Superior Detection of Cardiotoxicity During Chemotherapy Using Biomarkers. 2007;13(2),S151.

Lenihan, DJ; Esteva, FJ. Multidisciplinary Strategy for Managing Cardiovascular Risks When Treating Patients With Early Breast Cancer. *The Oncologist*. 2008;13 (12),1224-1334.

Liebens E, Carly B, Pastijn A, Fastrez M, Vandromme J. Desire for a Child and Breast Cancer. *Acta Chir Belg*. 2008;108(1):83-7.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of Cardiac Fibrosis by Transforming Growth Factor-beta(1). *Mol Genet Metab*. 2000;71(1-2).418-35.

Ma KK, Ogawa T, de Bold AJ. Selective Upregulation of Brain Natriuretic Peptide at the Transcriptional and Translational Levels by Pro-Inflammatory Cytokines and by Conditioned Medium Derived from Mixed Lymphocyte Reaction via p38 MAP Kinase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2004;36, 505-513.

Magné N, Toillon RA, Bottero V, Didelot C, Houtte PV, Gérard JP, Peyron JF. NF-kappaB modulation and ionizing radiation: mechanisms and future directions for cancer treatment. *Cancer Lett*. 2006;18;231(2),158-68.

Majalahti T, Suo-Palosaari M, Sárman B, Hautala N, Pikkarainen S, Tokola H et al. Cardiac BNP Gene Activation by Angiotensin II *in vivo*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;273,59-67.

Marks LB, Yu X, Prosnitz RG, Zhou SM, Handenberg PH, Blazing M, Holliis D, Lind P, Tisch A, Wong TZ, Borges-Neto S. The Incidence and Functional Consequences of RT-associated Cardiac Perfusion Defects. *International Journal Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2005;1;63(1),214-23.

Martin M, Villar A, Sole-Calvo A, Gonzalez R, Massuti B, Lizon J, Camps C, Carrato A, Casado A, Candel M T, Albanell J, Aranda J, Munarriz B, Campbell J and Diaz-Rubio E. Doxorubicin in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. FAC regimen, day 1, 21) versus methotrexate in combination with fluorouracil and cyclophosphamide (i.v. CMF regimen, day 1, 21) as adjuvant chemotherapy for operable breast cancer: a study by the GEICAM group. *Annals of Oncology*. 2003;14,833-842.

Masters RG, Davies RA, Vernot JP, Hendry PJ, Smith SJ, de Bold AJ. Discordant Modulation of Natriuretic Peptide During Acute Cardiac Allograft Rejection in Humans. *Circulation: J. American Heart Association*. 1999;100, 287-91.

MacGrath MF, Kuroski MLB, de Bold AJ. The Endocrine Function of the Heart. *Endocrinology and Metabolism*. 2005;16(10).

Menon SG, Mills RM, Schellenberger U, Saqhir S, Potter AA. Clinical Implications of Defective B-Type Natriuretic Peptide. *Clin Cardiol*. 2009;32(12),36-41.

Meirovich YF, Veinot JP, de Bold MLK, Hadadd H, Davies RA, Masters RG, Hendry PJ et al. Relationship Between Natriuretic Peptide and Inflammation: Proteomic Evidence Obtained During Acute Cellular Cardiac Allograft Rejection in Humans. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2008;27(1), 31-38.

Molina L, Dalben I, De Luca L. Análise das Oportunidades de Diagnóstico Precoce para as Neoplasias Malignas de Mama. *Rev Assoc Med Brás*. 2003;49(2),185-90.

Monteiro APS, Arraes EPP, Pontes LB, Campos MSS, Ribeiro RT, Gonçalves REB. Auto-exame das Mamas: Frequência do Conhecimento, Prática e Fatores Associados. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 2003, v.25 n.3.

Müller JJ. Atividade Antineoplásica da Epotilona. Porto Alegre: LUME, Repositório Digital, 2010. [acesso em 2012 Sept 12]. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/26820>>.

Murad AM. Tratamento Sistêmico do Câncer de Mama - Atualização: 2000. *Revista da Sociedade Brasileira de Cancerologia.* 2000: n° 9.

Nicolaou KC, Roschangar F, Vourloumis D. Chemical and Biology of Taxol. *Angew Chem., Int. Ed.* 1994, 33, 15.

Ogawa Y, Tamura N, Chusho H, Nakao K. Brain Natriuretic Peptide Appears to Act Locally as an Antifibrotic Factor in the Heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2001:79,723-729.

Ogawa T, Vatta M, Bruneau BG, de Bold AJ. Characterization of Natriuretic Peptide Production by Adult Heart Atria. *American Journal of Physiology.* 1999: 276(6)Pt 2,H1977-H1986,

Ogawa T, Veinot JP, Davies RA, Haddad H, Smith SJ, Masters RG, Hendry PJ et al. Neuroendocrine Profiling of Human Receiving Cardiac Allografts. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2004:24(8), 1046-54.

Ogawa T, Veinot JP, Mercedes L, Bold K, Georgalis T, Bold AJ. Angiotensin II receptor antagonism reverts the selective cardiac BNP upregulation and secretion observed in myocarditis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008:294,2596-2603.

Oliveira RB, Alves RJ. Agentes Antineoplásicos Biorredutíveis: Uma Nova Alternativa para o Tratamento de Tumores Sólidos. *Quim Nova [online].* 2002:25(6a),976-984.

Palazzuoli A, Gallotta M, Quatrini I, Nuti R. Natriuretic Peptide (BNP and NT-proBNP): Measurement and Relevance in Heart Failure. *Vascular Health and Risk Management.* 2010:6,411-18.

Pan Y, Zhu W, Ma J, Xin P, Han B, He Y, Wang Y et al. Therapeutic Effects of Continuous Infusion of Brain Natriuretic peptides on Postmyocardial Infarction Ventricular Remodelling in Rats. *Archives of Cardiovascular Disease.* 2011:104, 17-28.

Paszat LF, Mackillop WJ, Groome PA, Zhang-Salomons J, Schulze K, Holowaty E. Radiotherapy for Breast Cancer in Ontario: Rate Variation Associated with Region, Age and Income. *Clin Invest Med.* 1998:21(3),125-34.

Perik PJ, Vries EGE, Boomsma F, Van der Graaf WTA, Sleijferi DT, Van Veldhuisen DJ e Gietema JÁ. Use of Natriuretic Peptide for Detecting Cardiac Dysfunction in Long-term Disease-free Breast Cancer Survivors. *Anticancer research.* 2005:25,3651-58

Pichon MF, Cvitkovic F, Hacene K, Delaunay J, Lokiec F, Collignon MA, Pecking AP. Drug-induced Cardiotoxic Studies by Longitudinal B-type Natriuretic Peptide Assays and Radionuclide Ventriculography. *In vivo*. 2005;19,567-76.

Pontes MRN, Leães PE. Remodelamento Ventricular: dos Mecanismos Moleculares e Celulares ao Tratamento. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*. 2004;AnoXIII(n°3), 1-7.

Raj KA, Marks LB, Prosnitz RG. Late Effects of Breast Radiotherapy in Young Women. *Breast Dis*. 2006;23,53-65.

Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations Regarding Quantitation in M-mode Echocardiography: Results of a Survey of Echocardiographic Measurements. *Circulation*. 1978;8(6),1072-83.

Sakaguchi H, Kodama A, Tomonari M, Ando Y, Tabuchi M, To H, Araki R, Kitahara T, Sasaki H, Ohdo S, Higuchi S. Pre-administration of Docetaxel Protects Against Adriamycin-induced Cardiotoxicity. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(3),443-50.

Salata C, Ferreira-Machado SC, Mencialha AL, Andrade CBV, Campos VMA, Mandarim-de-Lacerda CA, deAlmeida CE. Chemotherapy and Radiotherapy Regimens to Breast Câncer Treatment Induce Changes in mRNA levels of Renin-Angiotensin System related Genes in Cardiac Tissue. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2012;1-7.

Salminen EK, Pukkala E, Kiel KD, Hakulinen TT. Impact of Radiotherapy in the Risk of Esophageal Cancer as Subsequent Primary Cancer After Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006;65(3),699-704.

Salvatici M, Cardinale D, Spaggiari L, Veglia F, Tadesco CC, Solli P, et al. Atrial Fibrillation After Thoracic Surgery for Lung Cancer: Use of Single Cutt-off Value of N-terminal pro-B type Natriuretic Peptide to Identify Patients at Risk. *Biomarkers*. 2009;15(3),259-65.
Sawyer DB, Peng X, Chen B, Pentassuglia L, Lim CC. Mechanisms of Anthracycline Cardiac Injury: Can We Identify Strategies for Cardioprotection? *Prog. Cardiovasc. Dis*. 2010;53(2),105-13,.

Samsesina N e Amoedo C. Hipertrofia Ventricular Esquerda. *Ver. Brás. Hipertens*. 2001;8, 316-20.

Senkus-Konefka E, Jassem J. Complications of Breast-Cancer Radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2006;18(3),229-35.

Senkus E, Jassen J. Cardiovascular Effects os Systemic Cancer Treatment. *Cancer Treat Rev*. 2010 Nov 30 [Epub ahead of print].

Schimmel, KJ; Richel, DJ; Van den Brink, RBA; et al. Cardiotoxicity of Citotoxic Drugs. *Cancer Treatment Reviews*. 2004;30,181-191.

Schult-Hector S, Troot KR. Radiation-induced Cardiovascular Disease: Is the Epidemiological Evidence Compatible with the Radiobiologic Data? *Int. J. Radiol. Oncol. Biol. Phys*. 2007;67(1),10-18.

- Seemann I, Gabriels K, Visser NL, Hoving S, te Poele JA, Pol JF, Gijbels MJ, Janssen BJ, van Leeuwen FW, Daemen MT, et al. Irradiation Induced Modest Change in Murine Cardiac Functions Despite Progressive Structural Damage to the Myocardium and Microvasculature. *Radiotherapy and Oncology*. 2012;103,143-150.
- Shen K, Qi Y, Song N, Tian C, Rice SD, Gabrin MJ, Brower SL et al. Cell Line Derived Multi-Gene Predictor of Pathologic Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: A Validation Study on Oncology 02-103 Clinical trial. *BCM Medical Genomics*. 2012;5,1-8.
- Shimoyama M., Murata Y., Sumi K., Hamazoe R., Komuro I..Docetaxel Induced Cardiotoxicity. *Heart*. 2001;86,219.
- Silva LB, Ferreira CA, Blacher C, Leães P, Haddad H. Peptídeo Natriurético Tipo-B e Doenças Cardiovasculares. *Arq Brás Cardiol*. 2003;81(5),529-534.
- Sime, PJ, O'Reilly, MA. Fibrosis of the Lung and Other Tissues: New Concepts in Pathogenesis and Treatment. *Clinical Immunology*. 2001;99 n3,308-319.
- Stewart JR, Fajardo LF, Gillette SM, Constone LS. Radiation Injury to the Heart. *International Journal. Radiation Oncology Biol. Phys*. 1995;31 n5,1205-1211.
- Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'Malignant' than Cancer? Five-years Survival Following a First Admission for Heart Failure. *Eur. Journal Heart Fail*. 2001;3(3),315-22.
- Sullivan DR, West M, Jeremy R. Utility of Brain Natriuretic Peptide (BNP) Measurement in Cardiovascular Disease. *Heart and Lung Circulation*. 2005;14,78-84.
- Sumanta K Pal; Barrett H Childs; Mark Pegram. Emergence of Non Anthracycline Regimens in the Adjuvant Treatment of Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119,25-32.
- Schultz-Hector S, Trott KR. Radiation-induced Cardiovascular Diseases: is the Epidemiological Evidence Compatible with the Radiobiologic data? *International Journal Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2007;1-67(1),10-18.
- Tanaka T, Kanda T, Saegusa S, Moriya J, Kurabayashi M. Interleukin-6-induced Reciprocal Expression of SERCA and Natriuretic Peptide mRNA in Cultured Rat Ventricular Myocytes. *The Journal of Intern. Medical Research*. 2004;32,57-61
- Taniguchi I, Clinical Significance of Cyclophosphamide-induced Cardiotoxicity . *Intern. Med*. 2005;44,89-90.
- Tsumato T, Wada A, Maeda K, Naoko M, Hayashi M, Tsurtsui T et al. Angiotensin II type 1 Receptor Antagonist Decrease Plasma levels of Tumor Necrosis Factor Alfa, Interleukin-6 and Soluble Adhesion Molecules in Patients With Chronic Heart Failure. *Journal of American College of Cardiology*. 2000;35(3), 714-21.
- Vesely DL e de Bold AJ. Cardiac natriuretic Peptides Gene Expression and Secretion in Inflammation. *Journal of Investigative Medicine*. 2009;57(1),29-32.

Watson JC, Phelan D, Xu M, Collier P, Neary R, Smolenski A, Ledwidge M, McDonald K, Baugh J. Mechanical Stretch Up-regulate the B-type Natriuretic Peptide System in Human Cardiac Fibroblasts: a Possible Defense Against Transforming Growth Factor- β Mediated Fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2012;5,9.

Wondergem J, Franken NAP, van der Laarse A, Persons CCM, Van Ravels FJM, Reijnart ICM, Strootman EG. Changes in Cardiac Performance and Sympathetic Stimulation During and After Fractionated Radiotherapy in a Rat Model. *Radiotherapy and Oncology*. 1996;38,33-40.

Wondergem J, Franken NAP, Chin A, van Ravels FJM, Leer JWH. Additive Effects of Concomitant Multiple Low-dose Doxorubicin and Thoracic Irradiation on ex-vivo Cardiac Performance of the Rat Heart. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 1998;124,148-154.

Wondergem J, Strootman EG, Frölich M, Leer JWH, Noordijk EM. Circulating Atrial Natriuretic Peptide Plasma Levels as a Marker for Cardiac Damage After Radiotherapy. *Radiotherapy and Oncology*. 2001;58,295-301.

Wynn TA. Cellular and Molecular Mechanisms of Fibrosis. *Journal Pathology*. 2008;214(2),199-210.

Xia WJ, Yi-Yi H, Yi-Li C, Sheng-Long C, Jian-Gui H. Acute Myocardial Ischemia Directly Modulates the Expression of Brain Natriuretic Peptide at the Transcriptional and Translational Levels via Inflammatory Cytokines. *European Journal of Pharmacology*. 2011;670,7-12.

Yeh ET, Tong AT, Lenihan DJ, Yusuf SW, Swafford J, Champion C, et al. Cardiovascular Complication of Cancer Therapy: Diagnosis Pathogenesis and Management. *Circulation*. 2004;109(25),3122-31.

Yeh ET, Bickford CL. Cardiovascular Complications of Cancer Therapy: Incidence, Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(24),2231-2247.

Yoshimura M, Yassue H, Ogawa H. Pathophysiological Significance and Clinical Application of ANP and BNP in Patients with Heart Failure. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001;79,730-735.

ANEXO - Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/010/2012 sobre “**Avaliação dos efeitos do tratamento para o câncer de mama em ratos Wistar**”, sob a responsabilidade de **Carlos Eduardo Veloso de Almeida**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **29/02/2012**. Este certificado expira em **29/02/2016**.

Rio de Janeiro, 29 de Fevereiro de 2012.

Profa. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

*Prof.^a Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof.^a Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8*

/ ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br